



N° d'Ordre : 215 - 2011

Année : 2011

THESE EN COTUTELLE

ENTRE

L'UNIVERSITE DE LYON (FRANCE)

ET

L'UNIVERSITE D'ANTANANARIVO (MADAGASCAR)

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON I ET L'UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

ECOLES DOCTORALES

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 6 janvier 2005 relatif à la cotutelle internationale de thèse.)

(Arrêté du 7 août 2006 relatif à la formation doctorale)

Présentée et soutenue publiquement le **8 novembre 2011**

Par

Fara Nantenaina RAHARIMALALA

**ROLE DES MOUSTIQUES *CULICIDAE*, DE LEURS COMMUNAUTES MICROBIENNES, ET DES
RESERVOIRS VERTEBRES, DANS LA TRANSMISSION D'ARBOVIRUS A MADAGASCAR**

Directeur de Thèse : Monsieur Patrick MAVINGUI

Co-Directeur de Thèse : Madame Bakoly Olga RALISOA

JURY :

PRESIDENT : Monsieur Victor JEANNODA, Professeur, Université d'Antananarivo

RAPPORTEUR : Madame Anna-Bella FAILLOUX, Directrice de recherche, Institut Pasteur, Paris

RAPPORTEUR : Monsieur A. RASAMINDRAKOTROKA, Professeur Titulaire, Université d'Antananarivo

RAPPORTEUR : Monsieur Henri Jonah RATSIMBAZAFY, Professeur HDR, Université d'Antananarivo

EXAMINATEUR : Monsieur Marc LEMAIRE, Professeur, Université de Lyon 1

EXAMINATEUR : Madame Bakoly Olga RALISOA, Professeur Titulaire, Université d'Antananarivo

EXAMINATEUR : Monsieur Patrick MAVINGUI, Directeur de Recherche, CNRS, Lyon 1



UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Secrétaire Général

M. A. Bonmartin

M. le Professeur G. Annat

M. le Professeur D. Simon

M. le Professeur J-F. Mornex

M. G. Gay

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

UFR d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Directeur : M. le Professeur P. Farge

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

Département Sciences de la Terre

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire de Lyon

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Ecole Supérieur de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Institut de Science Financière et d'Assurances

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. le Professeur F. Gieres

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Directeur : M. N. Siauve

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Directeur : Mme S. Fleck

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

Directeur : M. C. Collignon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Directeur : M. P. Fournier

Directeur : M. G. Pignault

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Directeur : M. R. Bernard

UNIVERSITE D'ANTANANARIVO

Président de l'Université

M. le Pr. ANDRIANTSIMAHAVANDY Abel

Vice-Président chargé de la Formation, de la Recherche et des Relations Internationales

Mme le Pr. ANDRIAMIHAJA Bakolinirina

Vice-Président chargé des Ressources

M. le Pr. RAKOTOARISOA Jean Eric

Vice-Président chargé du Partenariat et des TIC

M. le Dr. HARIJAONA Jean-Jules

COMPOSANTES DE L'UNIVERSITE

Faculté de Médecine

M. le Doyen le Pr RAPELANORO RABENJA F.

Faculté des Sciences

M. le Doyen ANDRIANANTENAINA Bruno

Faculté de Droit, d'Economie, de Gestion et de Sociologie

M. le Doyen RANOVONA Andriamaro

Faculté des Lettres et Sciences Humaines

M. le Doyen RANARIVONY Richard

Ecole Supérieure des Sciences Agronomiques

M. le Directeur RASOARAHONA Jean

Ecole Supérieure Polytechnique d'Antananarivo

M. le Directeur le Pr ANDRIANARY Philippe

Ecole Normale Supérieure

M. le Directeur : Pr. d'ESR ANDRIANARIMANANA J. C.

REMERCIEMENTS

Faire une thèse est parmi les plus grandes décisions de la vie qu'il ne faut jamais prendre à la légère. Je remercie Dieu Tout Puissant pour la force et la santé qu'Il m'a données tout au long de ma vie. Ce travail de thèse n'aurait pas pu être effectué sans l'aide technique et morale de nombreuses personnes. Je tiens à remercier de tout mon cœur toutes les personnes qui ont contribué à sa réalisation. En premier lieu :

- Aux Dirigeants des deux Universités de cotutelle : Université Claude Bernard et Université d'Antananarivo, sans votre autorisation de partenariat, cette thèse n'aurait pas eu lieu, je vous en remercie.
- A mes deux Directeurs de thèse : Madame Ralisoa Bakoly Olga et Monsieur Mavingui Patrick. Sans l'aide inconditionnelle de votre part, je ne serai pas capable d'arriver au bout de ces quatre années de thèse. Toutes mes reconnaissances vous seront à jamais dues.
- Madame Ralisoa, merci d'avoir cru en moi et d'avoir accepté d'être mon « modèle scientifique », vous êtes l'une des personnes les plus strictes mais de plus grand cœur que Dieu m'a permis de côtoyer.
- Monsieur Patrick Mavingui, former une pure entomologiste pour devenir un « expert » en microbiologie n'a pas été une chose facile à faire. Mais votre grande générosité et votre patience ont été la force qui me poussait à persévérer jusqu'au bout.
- A Monsieur Jeannoda qui a accepté de Présider le jury. A Madame Failloux, Monsieur Rasamindrakotroka, Monsieur Ratsimbazafy et Monsieur Lemaire, membres de jury de cette thèse. C'est un grand honneur et un grand privilège pour moi de vous avoir comme juges dans l'examen de ce travail. Merci pour votre temps précieux.
- A tous les enseignants de la Faculté des Sciences de l'Université d'Antananarivo, je vous remercie de tout cœur de m'avoir formé pour devenir « une relève » digne de votre rang.
- Mes plus profondes gratitude s'adressent aussi à tous les enseignants, techniciens et étudiants du Département d'Entomologie.
- Merci à tous mes collègues du laboratoire d'Ecologie Microbienne de Lyon. Sans votre soutien et votre aide, je n'aurai jamais pu finir tous les travaux que j'ai effectués là-bas.

- Je tiens aussi à remercier tout particulièrement tous mes amis : Claire, Karima, Vincent, Amélie, Maria Pia, Amel, Lamia, Florence, Bonnie, Paule, Rondro, Sasa (Sahondra), Doria. Sans votre soutien et amitié ce travail de thèse aurait été encore plus dur à effectuer.
- Merci à Van, Tahiana et Aina pour les aides techniques qu'ils m'ont apporté, quelque fois au-dessus de leur force !!!
- Je voudrai aussi remercier tout particulièrement la famille Ratefiarivony (Mamisoa, Hianja, Misetra et Tsatsangy) pour m'avoir si généreusement prêté leur ordinateur quand j'avais eu la plus grosse frayeur de ma vie !!

Un grand merci pour « La Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB, ancien IFB)» qui a financé cette thèse. Ce travail a été subventionné par le contrat FRB-CD-AOOI-07-012, et mené à bien dans le cadre du GDRI "Biodiversité et Développement Durable à Madagascar" et du COST action F0701 "Arthropod Symbioses: from fundamental to pest disease management".

Je tiens à remercier en particulier Madame Raveloson, notre Chef de Département d'Entomologie, et Monsieur Ravelonandro, Directeur du CNRE, tous deux co-coordonnateurs du projet IFB à Madagascar, qui m'ont apporté un grand soutien lors des difficultés que j'ai rencontrées au cours de cette thèse.

Et pour finir, ma plus profonde gratitude est pour toute ma famille. Merci d'avoir été toujours là pour moi, dans toutes les épreuves. Maman, tu as fait beaucoup de sacrifices pour que je sois là aujourd'hui, je n'ai qu'un seul mot à dire « merci !».

TABLE DES MATIERES

| | |
|--|-----------|
| UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1 | 1 |
| UNIVERSITE D'ANTANANARIVO | 2 |
| Remerciements | 3 |
| TABLE DES MATIERES | 5 |
| LISTE DES ABREVIATIONS | 8 |
| LISTE DES FIGURES | 9 |
| INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS | 12 |
| PREMIERE PARTIE | 15 |
| Synthèse Bibliographique | 15 |
| Chapitre 1..... | 16 |
| Les moustiques vecteurs majeurs d'arbovirus | 16 |
| A- Etat des connaissances antérieures..... | 16 |
| 1- Historique | 16 |
| 2- Présentation et systématique | 17 |
| 3- Clé de détermination des genres | 18 |
| B- Aspects écologiques et importance médicale des vecteurs majeurs d'arbovirose :..... | 24 |
| 1- Le genre <i>Aedes</i> | 24 |
| 2- Le genre <i>Culex</i> | 24 |
| 3- Le genre <i>Mansonia</i> | 25 |
| 4- Le genre <i>Eretmapodites</i> | 25 |
| C- Biologie et écologie des vecteurs majeurs d'arbovirus | 26 |
| 1- Les œufs | 27 |
| 2- Les larves | 27 |
| 3- Les nymphes..... | 27 |
| 4- Les adultes..... | 28 |
| Chapitre 2..... | 30 |
| Les communautés microbiennes des moustiques..... | 30 |
| A- Contexte général..... | 30 |
| B- Exemple de symbiose facultative entre les communautés microbiennes et les insectes: <i>Wolbachia pipientis</i> | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 1- Systématique | 33 |
| 2- Les manipulations génétiques induites par <i>Wolbachia</i> sur ses hôtes | 35 |
| 3- Progression des recherches sur l'utilisation de <i>Wolbachia</i> comme complément de lutte antivectorielle | 37 |
| Chapitre 3..... | 39 |
| Les arbovirus transmis par les moustiques..... | 39 |
| A- Définitions | 39 |
| 1- Arbovirus. | 39 |
| 2- Vecteurs..... | 39 |
| 3- Compétence et capacité vectorielles. | 39 |
| B- Transmission des arbovirus..... | 41 |
| 1. L'infection du vecteur..... | 42 |
| 2. Le développement de l'agent pathogène chez l'arthropode vecteur | 42 |
| 3. La transmission au vertébré et la virémie..... | 43 |
| 4. Les organes ciblent des arbovirus chez l'hôte vertébré..... | 44 |
| 5. Les différents types de transmission des arbovirus chez le moustique et chez l'hôte sensible | 45 |
| C- Prévalence des arbovirus émergents et ré-émergents majeurs | 46 |
| 1. Le chikungunya..... | 47 |
| 2. La dengue | 51 |
| 3. Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (VFVR) | 59 |
| 4. Les vecteurs des trois arbovirus étudiés | 63 |
| D- Les réservoirs des arbovirus..... | 71 |
| DEUXIEME PARTIE..... | 73 |
| Mémoire Expérimental | 73 |
| Chapitre 1..... | 74 |
| Biogéographie des moustiques vecteurs d'arbovirus à Madagascar | 74 |
| 1- Contexte général et objectifs | 74 |
| 2- Publication..... | 75 |
| Chapitre 2..... | 95 |
| Etude des communautés microbiennes des moustiques vecteurs | 95 |

| | |
|---|------------|
| 1- Contexte et objectifs | 95 |
| 2- Publication N°1 | 97 |
| 3- Publication N°2 | 110 |
| Chapitre 3..... | 122 |
| Recherche d'arbovirus chez les moustiques et les lémuriens | 122 |
| 1- Contexte et objectifs..... | 122 |
| 2- Publication | 123 |
| DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES | 142 |
| 1- Enquêtes entomologiques et biogéographie des moustiques vecteurs | 143 |
| 2- Caractérisation des bactéries endosymbiotiques dans les populations naturelles de moustiques de Madagascar | 146 |
| 3- La prévalence du virus de la FVR chez les lémuriens de Madagascar | 149 |
| 4- Les causes et facteurs aggravants les émergences et les réémergences des arbovirus dans le cas de Madagascar | 149 |
| 5- Conclusion et perspectives générales..... | 151 |
| Bibliographie :..... | 153 |
| ANNEXES..... | 179 |
| Annexe 1: Extraction d'ADN à partir d'individu de moustique | 180 |
| Annexe 2: Extraction d'ARN à partir de pool de moustique | 181 |
| Annexe 3 : Composition d'une réaction de mix de PCR avec BSA pour 25µl :..... | 182 |
| Annexe 4 : Protocole pour la RT-PCR quantitative :..... | 183 |
| RESUME | 186 |
| ABSTRACT | 186 |

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide desoxyribonucléique

ARN: Acide ribonucléique

BDDM: Biodiversité et Développement Durable à Madagascar

CHIK V : Virus du chikungunya

CO1: Cytochrome-Oxydase subunit 1

DENV : Virus de la dengue

DF : Dengue Fever

DHF : Dengue Haemorrhagic Fever

DSS : Dengue Shock Syndrome

FRB (/IFB): Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité

GDRI: Groupement Durable de la Recherche Internationale

GTR: Gene Time Reversible

IC : Incompatibilité Cytoplasmique

Mgcl2 : Chlorure de magnésium

ML: Maximum Likelihood

MP: Maximum Parsimony

mtDNA: Acide desoxyribonucléique mitochondrial

ND5: NADH déshydrogenase sous unité 5

NJ: neighbor-joining

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

qRT-PCR : quantitative Retro-Transcription- Polymerase Chain Reaction

RVFV: Virus de la Fièvre de la Vallée du Rift

LISTE DES FIGURES

| | |
|---|-----|
| Figure 1. Photos récapitulatives des différents stades de trois genres | 21 |
| Figure 2. Photo récapitulative des caractères distinctifs entre <i>Aedes aegypti</i> et <i>Aedes albopictus</i> | 22 |
| Figure 3. Photos récapitulatives des caractères distinctifs des genres <i>Culex</i> , <i>Mansonia</i> et <i>Eretmapodites</i> | 23 |
| Figure 4. Cycle de développement des moustiques (Source : IRD) | 26 |
| Figure 5. Relation phylogénétique de quelques endosymbiotes chez les insectes. Les différentes couleurs représentent les différents phénotypes induits. (Moran et al., 2008) | 31 |
| Figure 6. Phylogénie de <i>Wolbachia</i> . (a) : Position phylogénétique simplifiée de <i>Wolbachia</i> au sein des Rickettsiales. (b) : Arbre phylogénétique des principaux clades de <i>Wolbachia</i> . D'après Lo et coll. (2007) et Werren (2008), modifié par Zouache et coll. (2009). | 35 |
| Figure 7 . Représentation des quatre phénomènes de manipulation des hôtes Arthropodes par <i>Wolbachia</i> (Werren, 2008)..... | 36 |
| Figure 8. Interdépendance entre la compétence et la capacité vectorielles (Rhodain, 1989)..... | 40 |
| Figure 9 . Représentation schématique du cycle de transmission des arbovirus..... | 41 |
| Figure 10 . Schéma représentatif de l'organisation générale d'un moustique. Les cercles représentent les principales barrières. | 43 |
| Figure 11. Les différents organismes cibles des arbovirus dans l'hôte humain. | 45 |
| Figure 12. Distributions des arbovirus dans le Monde de 1990-2000 (Gubler, 2002)..... | 47 |
| Figure 13. Les différents foyers de chikungunya recensés dans le Monde entre 2005-2006. Source WHO/OMS. | 32 |
| Figure 14. Représentation schématique de structure du virus de la dengue..... | 53 |
| Figure 15. Représentation schématique de l'organisation génomique du virus de la dengue | 54 |
| Figure 16. Manifestations cliniques de la dengue. Adapté de George, R. & Lam, S.K (1997) | 56 |
| Figure 17. Répartition de la FVR : en bleu, les pays ayant eu des épisodes épidémiques ou ayant une circulation endémique du virus ; en vert, les pays où le virus a été isolé sans épidémie. | 62 |
| Figure 18. Distribution géographique d' <i>Aedes aegypti</i> et d' <i>Aedes albopictus</i> dans le monde (Chevillon et al., 2008) | 66 |
| Figure 19. Répartition d' <i>Aedes albopictus</i> et d' <i>Aedes aegypti</i> dans la zone dusud-ouest de l'Océan Indien (Delatte et al., 2008). | 67 |
| Figure 20. Cycle naturel du VFVR par Zeller (1997). | 68 |
| Figure 21. Perspectives générales..... | 152 |

LISTE DES TABLEAUX

| | |
|---|----|
| Tableau 1. Classification taxonomique des vecteurs majeurs d'arbovirus :..... | 18 |
| Tableau 2. Distribution et différentes fonctions des symbiontes à l'intérieur des variétés de classe d'insectes (Aksoy and Rio, 2005) | 32 |
| Tableau 3. Les arbovirus les plus importants provoquant des maladies à l'homme avec leurs répartitions dans le Monde (Gubler, 2002)..... | 44 |
| Tableau 4. Différentes espèces d'arthropodes trouvées naturellement infectées par le VFVR (Moutailler, 2007). | 70 |

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

INTRODUCTION GENERALE ET OBJECTIFS

Ces dernières années les maladies infectieuses, et en particulier les «arbovirus» pour «Arthropod Borne Virus», connaissent une recrudescence inquiétante. Depuis leur découverte, le nombre d'arbovirus, responsables d'arboviroses, ne cesse d'augmenter et de s'étendre géographiquement. Les connaissances actuelles font désormais état de plus de 600 types de virus vectorisés par des arthropodes, dont une centaine serait impliquée dans des pathologies humaines tel le chikungunya, la dengue et la fièvre de la Vallée du Rift, arboviroses majeures dans le Monde. L'apparition imprévisible de ces maladies à transmission vectorielle montre bien que peu de choses sont connues sur l'écologie des agents étiologiques, leur maintien dans l'environnement en période inter-épidémique et les facteurs à l'origine des émergences ou réémergences. Ces maladies vectorielles représentent une menace dans les îles de l'Océan Indien avec l'émergence et la résurgence de pathologies virales comme l'attestent les récentes épidémies d'arboviroses qui les ont touchées.

Dans la plupart des cas, les mesures prophylactiques et thérapeutiques associées aux maladies arbovirales sont souvent peu efficaces, parfois inadaptées, voire inexistantes. Il est plus que primordial de développer de nouveaux moyens de surveillance et de lutte contre ces arboviroses. Etant donné qu'actuellement l'utilisation des agents chimiques soulève des questions du fait de l'émergence des résistances et des effets négatifs sur les organismes non cibles (Baleta A., 2009), l'exploitation d'autres moyens de lutte plus respectueux de l'environnement est encouragée (OMS). Par exemple, l'utilisation des communautés bactériennes endosymbiotiques comme biopesticides est mise en avant dans la lutte anti-vectorielle et antivirale. En effet, la grande majorité des insectes héberge naturellement des communautés bactériennes qui peuvent jouer un rôle majeur dans la réduction des infections transmises par les arthropodes vecteurs. C'est notamment le cas des bactéries du genre *Wolbachia*, qui sont transmises verticalement à travers les ovocytes et qui sont connues pour manipuler la reproduction des hôtes en induisant des phénomènes comme la féminisation des mâles, la parthénogénèse, le «male killing» et l'incompatibilité cytoplasmique (Sinkins *et al.*, 1995a, b ; Kittayapong *et al.*, 2000, 2002a, b; Brownstein *et al.* 2003 ; Dobson *et al.*, 2004). Des travaux récents ont montré que *Wolbachia* était capable de limiter la dissémination des virus de la dengue chez les moustiques (Moreira *et al.*,

2009 ; Bian et al., 2010). Plus étonnant encore, cette activité inhibitrice *in insecta* de *Wolbachia* a été également montrée vis-à-vis des parasites comme *Brugia pahangi*, *Plasmodium berghei* et *Plasmodium gallinaceum* (Kambris et al., 2009 et 2010; Moreira et al., 2009). En dehors de *Wolbachia*, peu d'études portent sur les interactions multipartites entre le pathogène, le moustique et les nombreuses populations bactériennes symbiotiques associées. Ces observations suggèrent que pour mieux appréhender la dynamique de transmission des arboviroses et de maintien en période inter-épidémique, il est nécessaire de prendre en compte le système vectoriel dans son ensemble et donc chacun des partenaires en interaction : arthropodes vecteurs, virus, communautés bactériennes, et réservoirs.

Dans cette optique, ce projet de thèse est centré sur l'île de Madagascar qui est caractérisée par une forte biodiversité endémique dans des conditions climatiques contrastées et des modifications importantes des habitats en raison des activités anthropiques croissantes. Les évènements anciens mais aussi récents d'épidémies d'arboviroses ont affecté les populations humaines et les animaux domestiques de cette grande île de l'Océan Indien. Les objectifs visent à 1) identifier les moustiques vecteurs majeurs de la dengue et de la fièvre de la Vallée du Rift à Madagascar, 2) apporter un complément d'information sur la relation des communautés microbiennes et les vecteurs d'arboviroses, et enfin 3) établir si les populations de différentes espèces de lémuriers peuvent constituer des réservoirs vertébrés de ces arboviroses.

Le choix des arbovirus étudiés est basé sur (i) les récentes épidémies qui ont sévi à Madagascar, (ii) la connaissance établie de pathologies humaines associées à ces virus, (iii) la démonstration, à travers les travaux antérieurs de sérologie (Rhodain et al., 1982) et des tests de compétence vectorielle des moustiques vecteurs majeurs de ces arbovirus (Vazeille et al., 2001), des contacts existants ou ayant existés entre ces virus et les lémuriers, et (v) la diversité des situations prévalant chez l'homme depuis l'absence de cas cliniques jusqu'à l'existence reconnue d'épidémie d'envergure à Madagascar (Morvan et al., 1991 ; Andrianarisoa et al., 2007 ; Ratsitorahina et al., 2008).

La première partie bibliographique est constituée de trois chapitres. Elle est consacrée à la connaissance globale des moustiques vecteurs d'arbovirus, leur historique et systématique, en présentant quelques genres vecteurs majeurs répertoriés dans le Monde. Cette partie aborde également le volet des communautés bactériennes associées aux moustiques vecteurs, et les réservoirs vertébrés potentiels des arbovirus. La deuxième partie concerne l'étude expérimentale

structurée en trois chapitres présentés sous forme d'article. Le premier chapitre correspond à l'étude de la biogéographie des moustiques vecteurs d'arbovirus à Madagascar. Le second chapitre porte sur l'étude des communautés microbiennes des moustiques vecteurs. Le troisième chapitre décrit la recherche du virus de la fièvre de la vallée du rift chez les moustiques et les lémuriens. Enfin, la troisième partie de ce manuscrit porte sur une discussion générale et des perspectives de l'ensemble des travaux effectués durant cette thèse.

PREMIERE PARTIE

SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE 1.

LES MOUSTIQUES VECTEURS MAJEURS D'ARBOVIRUS

A- Etat des connaissances antérieures

1- Historique

Les moustiques, appelés communément ainsi de par certaines caractéristiques qui leurs sont propres, sont présents sur la quasi-totalité de la planète (sauf en Antarctique où le grand froid règne pendant toute l'année). De par leur capacité d'adaptation, ils ont réussi à coloniser tous les types de milieux (forestiers, savanes, urbains...) à partir du moment où un point d'eau douce, limpide ou saumâtre, même réduite ou temporaire, est disponible. Vers la fin du XIX^{ème} siècle, des scientifiques ont pu prouver que les moustiques ne provoquent pas seulement des nuisances par leurs piqûres mais en plus, ils peuvent transmettre de très graves maladies telles la filariose en 1878, le paludisme en 1880 et la fièvre jaune (arbovirose) en 1900. Ces découvertes stimulent alors un grand intérêt pour ces insectes.

- Ainsi, Frederick Vincent Theobald, travaillant au British Museum de Londres dans son ouvrage en six volumes : «*A Monograph of the Culicidae of the World*», paru de 1901 à 1910, créa de nombreux genres pour déboucher sur une classification de la famille comprenant six sous-familles.
- En 1932, Frederick Wallace Edwards inclut au rang de sous-famille les dixines et chaoborines dans la famille des Culicidae. Les moustiques formant la sous-famille des Culicinae sont alors divisés en trois tribus : Anophelini, Toxorhynchitini et Culicini. Ces dernières sont ensuite divisées en cinq groupes : *Sabethes*, *Uranotaenia*, *Theobaldia* (actuel *Culiseta*), *Aedes* et *Culex*.
- En 1957, Stone supprima les Dixinae et Chaoborinae de la Famille des *Culicidae*.
- En 1959, Knight, Stone et Starke, reconnaissent trois sous-familles dans leur ouvrage : «*A synoptic Catalog of the Mosquitoes of the World (Diptera, Culicidae)*»: Anophelinae, Toxorhynchitinae et Culicinae, ces derniers divisés en deux tribus : les Culicini et les Sabethini. Les Dixidae et Chaoboridae ont un statut de famille.
- En 1962, Belkin réintègre Chaoborinae et Dixinae mais subdivise les Culicinae en dix tribus.

- En 1977, Knight et Stone, pour la réédition de leur catalogue, adoptent dans son ensemble la classification de Belkin en excluant toutefois Chaoboridae et Dixidae.
- En 1998, Harbach & Kitching inclurent la sous famille des Toxorhynchitinae dans la sous famille des Culicinae, la ramenant au rang de tribu (Toxorhynchitini).
- En 2000, Reinert et al., divisèrent, sur la base des génitalia mâles et femelles, le prolifique genre *Aedes* en deux genres : *Aedes*, conservant vingt trois sous-genres et le genre *Ochlerotatus* (anciennement sous-genre du genre *Aedes*) comptant vingt et un sous-genres.
- En 2004, puis en 2009, Reinert et al., proposèrent de diviser la tribu des Aedini en soixante trois genres au lieu de douze mais ils furent peu suivis.

En 1959, 2462 espèces de moustiques furent décrites et validées de par le monde (Stone, 1961). En 1992, 3209 espèces furent montrées et un total actuel atteignant 3528 espèces réparties en 44 genres et 145 sous-genres. La classification morphologique étant très peu fiable, de nouvelles techniques d'analyse génétique couplée aux techniques d'analyse morpho taxonomique classique permettent de progresser rapidement dans ce domaine. Mais malgré tout, la classification phylogénétique n'est toujours pas totalement définie. Si certaines tribus sont monophylétiques (*Aedini*, *Culicini* et *Sabethini*), la phylogénie de la plupart des tribus reste incertaine.

A Madagascar, les études portées sur les *Culicidae* ont été surtout centrées sur les vecteurs du paludisme, en particulièrement aux *Anopheles* (Doucet 1951; Chauvet et al., 1964; Grjebine, 1966). C'est vers les années 70 que les entomologistes ont commencé à s'intéresser aux genres *Culex* de Madagascar, plus précisément à *Culex pipiens fatigans* (actuel *Culex quinquefasciatus*) qui constitue une nuisance principale (Chauvet et al., 1971) et qui est le vecteur majeur de *Wuchereria bancrofti*, parasite responsable de la filariose à Mahajanga (Brunhes, 1975). C'est pendant cette même période que Subra et Ravaonjanahary (1973, non publié) ont aussi commencé à approfondir les études sur *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, deux vecteurs potentiels d'arbovirus à Madagascar même si en 1904, Ventrillon avait déjà commencé à s'intéresser à la prévalence d'*Aedes albopictus*.

2- Présentation et systématique

Les moustiques appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, aux clades des métazoaires triploblastiques coelomates. Possédant une symétrie bilatérale, leur corps est métamérisé et est recouvert de cuticules chitineuses appelé exosquelettes. Leurs appendices articulés leur permettent

de se mouvoir. De par leurs carapaces bien développées, ils sont issus du sous-embranchement des Euarthropodes. Plusieurs super-classes y sont incluent dont les Mandibulates, où se trouve la classe des Insectes. Classée dans l'ordre des Diptères et le sous-ordre des Nématocères, la famille des *Culicidae* est caractérisée par des individus aux antennes longues et fines à multiples articles, des ailes pourvues d'écailles, et par des femelles possédant de longues pièces buccales (labre, hypopharynx, mandibules, maxilles) en forme de trompe rigide de type piqueur-suceur. Au repos, cette trompe est enveloppée par le labium et l'ensemble constitue le proboscis. Nous limiterons notre étude aux moustiques vecteurs majeurs d'arboviroses et le tableau n°1 montre la classification des différents genres impliqués.

Tableau 1. Classification taxonomique des vecteurs majeurs d'arbovirus :

| | |
|---------------------------|--|
| Règne | Animalia |
| Sous-règne | Metazoaires |
| Embranchement | Arthropoda |
| Sous-embranchement | Euarthropoda |
| Super-classe | Mandibulates |
| Classe | Insectes (ou Hexapoda) |
| Sous-classe | Endopterygota |
| Super-Ordre | Mécoptéroïdes |
| Ordre | Diptera |
| Sous-ordre | Nematocera |
| Famille | Culicidae |
| Sous-famille | Culicinae |
| Genres | <i>Aedes ; Culex ; Mansonia ; Erethmapodites</i> |

3- Clé de détermination des genres

La clé de détermination des genres vecteurs majeurs d'arbovirus, appartenant à la sous famille des *Culicidae* utilisée, est celle provenant de «The Synoptic Catalog of the Mosquitoes of the World» (Stone et al., 1959) et des autres suppléments (Stone, 1961, 1963, 1967, 1970).

Pour les adultes :

- Chez la femelle : Antennes courtes, épaisses, effilées, base du premier flagellomère avec une touffe de soie, les fémurs moyens et postérieurs avec de grosses touffes d'écailles érigées. Chez le mâle : Antennes avec les deux terminales flagellomères assez épais ; fémur postérieur avec écailles apicales très large et touffues ; palpes très courts comme chez la femelle. *AEDEOMYIA* Théobald.
- Chez la femelle : Griffes des tarsi postérieurs très petits et peu visibles, tous les tarsi avec pulvilli bien développé. Chez le mâle : Pulvilli présent (très clair sur la patte postérieure), griffes du tarse postérieur exceptionnellement petites ; palpes variés, dans certain cas très courte par rapport au proboscis. *CULEX* Linnaeus.
- Surface supérieure des ailes avec, pour l'ensemble ou la plupart, des écailles très large, la plupart souvent asymétrique d'apparence «poivre – sel», les soies acrosticales sont très peu développées mais par contre les soies postspiraculaires sont présentes. Pour les femelles : le segment abdominal VIII est petit et habituellement rétracté sous le VII. Le tergite VIII a des soies épaisses courtes, courbées en crochet. Pour les mâles, les palpes sont plus longs que le proboscis. Le génitalia a un gonocoxite avec des rangées de soies dures. *MANSONIOIDES* Theobald.
- Chez la femelle : Para-tergite mince et nue, postnotum habituellement avec un groupe de petites soies; derrière la tête, pleura et bords du corner post latéral des tergites abdominaux, avec de larges écailles argentées. Chez le mâle : Para-tergite mince et nue, postnotum souvent avec des groupes de petites soies ; derrière la tête, pleura et corners postéro-latéral des tergites abdominales avec des très nettes écailles argentées. En Afrique tropicale seulement. *ERETMAPODITES* Théobald.

Pour les pupes :

- Pagaies lisses sur les deux bords, profondément fendus à l'apex; soies apical, aussi long que les pagaies au moins jusqu'à la moitié, soies 5-IV-VI avec de longues, effiloché branche médiane et de courtes branches latérales. *AEDEOMYIA* Théobald.
- Trompes avec des trachéoles sous-basales très développés ou soie 9-VIII très écartée du bord du segment postérieur céphalique, ou souvent les deux à la fois. *CULEX* Linnaeus. Trompes modifiées pour une insertion subaquatique des tissus des plantes. *MANSONIOIDES* Théobald.

- Pagaies petites, avec de long, délicats poils sur tout le bord. Soies apicales des pagaies longues et épaisses. Soie 8-c plus longue et épaisse que celle de la 9-c. ERETMAPODITES Théobald.

Pour les larves :

- Antennes larges et aplaties, certains poils thoraciques très longs, d'autres étoilés ; pointe du siphon avec une paire de crochet et des soies ramifiées. AEDEOMYIA Théobald.
- Siphon à un poil sub-ventral, généralement bien étiré vers le milieu, parfois formant une rangée médio-ventrale mais jamais avec une deuxième paire découlant de la base d'un autre à proximité. CULEX Linnaeus.
- Siphon modifié pour percer les tissus des plantes, avec l'extrémité des pointes sclérosées. Partie des antennes apicales 0,5 moins longs que la partie proximale. Larves ont seulement 1-3 écailles en peignes dont les extrémités sont courbées. MANSONIOIDES Théobald.
- Soies de la tête et des antennes 4 et 7 très petites, délicates et discrètes ; dents des peignes jamais en ligne régulière. Siphon environ 3,5 fois de sa largeur à la base, généralement très court ; pecten avec au plus sept dents, habituellement moins (quelques fois absent) ; brosse ventrale avec quatre (rarement cinq) paires épais, fortement plumeuses ; certaine d'entre elles généralement unique. ERETMAPODITES Théobald.

Des photos récapitulatives des différences observées entre les genres ont été dressées et sont présentées dans les figures 1, 2 et 3.

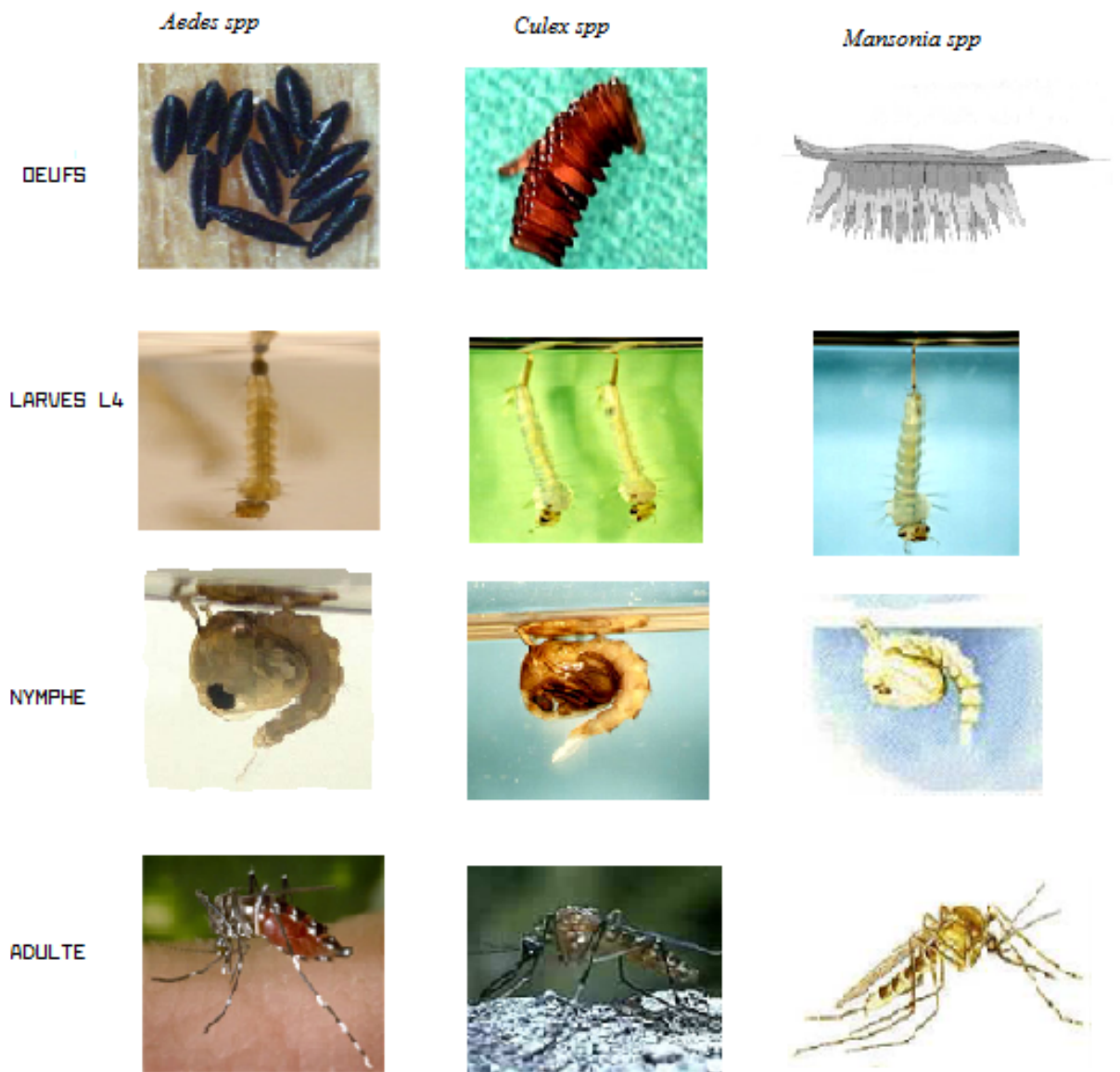


Figure 1. Photos récapitulatives des différents stades de trois genres

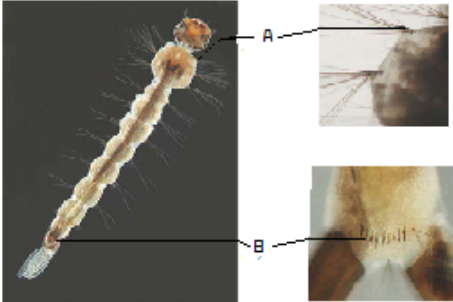
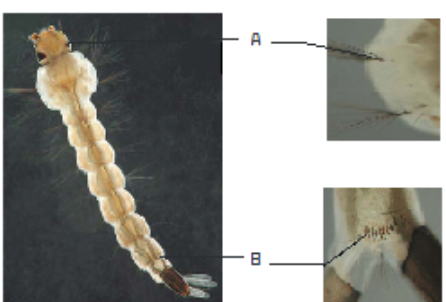
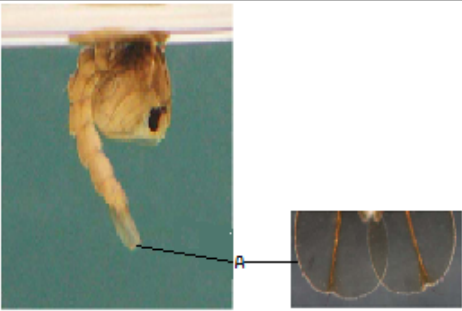
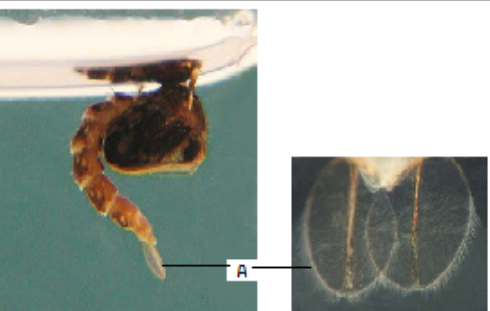


| | <i>Aedes aegypti</i> | <i>Aedes albopictus</i> |
|--------|---|---|
| LARVES |  <p>A: crochet noir dur sur les côtés du thorax B: peignes en fourches sur une rangée</p> |  <p>A: présence ou non de crochet sur les côtés du thorax B: peignes en épines droites sur une seule rangée</p> |
| NYMPHE |  <p>A: palettes nettoires touffues</p> |  <p>A: palettes nettoires très touffues à soies très longues</p> |
| ADULTE |  <p>A: des écailles blanches sur le clypéus B: extrémités des palpes gris-argentées C: scutum avec des écailles en forme de lyres gris-argentées</p> |  <p>A: clypéus noir B: scutum à bande gris-argenté au milieu C: 5ème segment de la tarse en blanc</p> |

Figure 2. Photo récapitulative des caractères distinctifs entre *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*.


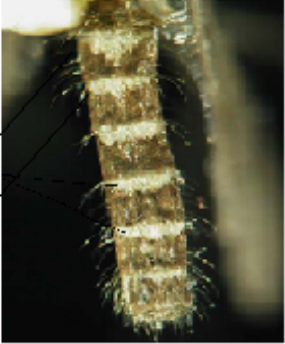





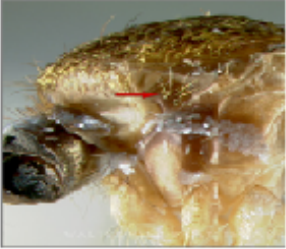

| | |
|--|--------------------------------------|
|   <p>larges bandes en forme de M, très accentué sur IV et V</p> | <p><i>Culex quinquefasciatus</i></p> |
|   <p>soies postspiraculaires présentes (flèche rouge)</p> <p>extrémité de l'abdomen émoussée chez la femelle (flèche rouge)</p>   <p>absence de pulvilli (flèche rouge)</p> <p>griffes de la tarse (I-II-III) simples (flèches rouges)</p> | <p><i>Mansonia</i></p> |
|    <p>moustique brun-jaunâtre avec une large plaque, de grande taille, plat avec des écailles argentées entre les yeux, au-dessus des antennes</p> <p>soies postspiracles présentes (flèche rouge)</p> <p>soies préspiracles absents (flèche rouge)</p> | <p><i>Eretmapodites</i></p> |

Figure 3. Photos récapitulatives des caractères distinctifs des genres *Culex*, *Mansonia* et *Eretmapodites*.

B- Aspects écologiques et importance médicale des vecteurs majeurs d'arbovirose :

Nous rapportons ici les principales données acquises en rapport au rôle épidémiologique des genres *Aedes*, *Culex*, *Mansonia* et *Eretmapodites* dans différentes régions du monde. Elles ne sont donc pas exhaustives.

1- Le genre *Aedes*

Créé par Meigen en 1818, le genre *Aedes* contient des espèces d'extrême importance médicale, en particulier pour le sous-genre *Stegomyia* : *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* car elles peuvent héberger des arbovirus tels la Dengue, le Chikungunya et même la fièvre jaune. Originnaire d'Afrique, *Aedes aegypti* a été longtemps considérée comme le seul vecteur de ces maladies dans les endroits où ces arboviroses sévissaient (Gubler, 1997). Cependant, de par son adaptation progressive à la proximité de l'environnement humain, lui fournissant une source de nourriture en abondance (homme et animaux domestiques), ainsi que des milieux favorables au développement larvaire (collections d'eau dans des gîtes artificiels tels les pneus usagés, des seaux à l'abandon...), *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, 1894), moustique originaire d'Asie du Sud-Est (Hawley, 1988 ; Smith, 1956) s'est avérée être un redoutable vecteur (Reiter et al., 2006). De par cette adaptation, la colonisation de nouveaux endroits par *Aedes albopictus* s'est accentuée par les échanges commerciaux intercontinentaux des pneus usagés, ou des containers qui constituent de très bons sites de pontes dans lesquels les œufs peuvent survivre plusieurs semaines à l'état quiescent (Reiter, 1998). Bien que capable de transmettre un grand nombre d'arbovirus (Mitchell 1995, Turell 1988), l'espèce a généralement été considérée comme «un vecteur secondaire» parce qu'il n'est pas un vecteur spécifique à l'hôte. Néanmoins, il a été responsable de la transmission de chikungunya (CHIK) au cours des dernières épidémies explosives sur les îles de La Réunion et Maurice, où le "classique" vecteur, *Aedes aegypti*, est pratiquement absent (Reiter et al. 2006, Schuffenecker et al., 2006).

2- Le genre *Culex*

Culex (Linnaeus, 1758) appartient à la Famille des *Culicidae* et à la sous famille des *Culicinae*. Il contient plusieurs espèces vecteurices responsables de maladies telles : la Fièvre de la Vallée du Rift causant en 1950-51 en Kenya 500 000 avortements des cheptels , et rien qu'en 2006-2007, elles ont

causé une importante épidémie à Madagascar (Raveloson , 2010), la filariose, la Fièvre du Nil occidental (West Nil) ... Les individus sont capables de s'adapter à différents biotopes, tant dans les milieux urbains que ruraux, dans les eaux propres que polluées (surtout pour l'espèce de *Culex pipiens* spp). Ils sont actifs pendant toute l'année mais leurs activités diminuent durant les mois où il fait froid. Ils atteignent leur densité maximale pendant les saisons chaudes. En plus d'une compétence vectorielle à transmettre le virus, les femelles possèdent des préférences trophiques variées, une prolificité importante et d'une longue période d'activité. Les femelles infectées de cette espèce sont capables de transmettre le virus à leur progéniture (Farajollahi et al., 2005 ; Murgue et al., 2001). Cette transmission verticale fait de ces moustiques le premier suspect dans le maintien et la transmission des arbovirus (Faraj et al., 2006).

3- Le genre *Mansonia*

Mansonia appartient à la Famille des *Culicidae*, à la sous-famille des *Culicinae*. Il y a deux sous-genre : *Mansonia* et *Mansonioides* et ils renferment en totalité 24 espèces. Certaines espèces sont de redoutables nuisances de par les piqûres qu'elles infligent en masse. Il y a des espèces anthropophiles. Certaines ont été trouvées infectées naturellement ou expérimentalement par des arbovirus ou microfilaires qu'ils peuvent transmettre à l'homme (Laurence, 1960 ; White, 1989). Des espèces du genre *Mansonia* transmettent une filariose lymphatique : la filariose de Malaisie (*Brugia malayi*). Des espèces vivant dans des marécages ouverts (*M.uniformis*, *M. annulifera*, *M. indiana*) sont vectrices de la maladie, de l'Inde jusqu'en Asie de l'Est. Des espèces zoophiles rurales (*M. bonneae*, *M. dives* et *M. uniformis*) sont vectrices en Thaïlande, Malaisie et aux Philippines. Le sous-genre *Mansonioides* est celui qui existe à Madagascar et il a deux espèces : *M. uniformis* et *M. africanus*. Les aires de distribution de ces deux espèces sont assez différentes. Si *M. africanus* ne se trouve qu'en Afrique, *M. uniformis* a une aire de distribution assez large tel à l'Est de Chine (Feng, 1938) ; au Sud de Cambodia, Thaïlande et Inde (Mattingly & Brown, 1955). Et c'est aussi l'espèce que l'on trouve à Madagascar.

4- Le genre *Eretmapodites*

Le genre *Eretmapodites* appartient à la sous-famille des *Culicinae* et de la tribu des *Aedini*. Il rassemble 48 espèces, uniquement présentes en région afrotropicale, y compris Madagascar et les Comores. C'est le seul genre de moustique dont la zone de répartition est restreinte à la région

afrotropicale. Les espèces sont forestières et se rencontrent dans les endroits ombragés. Se nourrissant de préférence sur les mammifères, et occasionnellement sur l'homme, près du sol au niveau des genoux, dans les zones ombragées, elles piquent durant la journée ou au crépuscule mais ne pénètrent pas dans les habitations. Des tests en laboratoire ont permis de prouver qu'elles peuvent transmettre des arbovirus, tels la fièvre de la Vallée du Rift (Smithburn et al, 1948), le chikungunya (Gilotra & Shah, 1967) ou la fièvre jaune (Bauer, 1928).

C- Biologie et écologie des vecteurs majeurs d'arbovirus

Comme chez tous les insectes diptères, le développement du moustique se divise en deux phases bien distinctes :

- une phase aquatique pré-imaginale : pour la période larvaire (période de croissance, mobile), et la période nymphale (moins mobile),
- une phase aérienne : pour l'adulte (période de reproduction sans croissance). La figure 3 montre schématiquement les différentes phases.

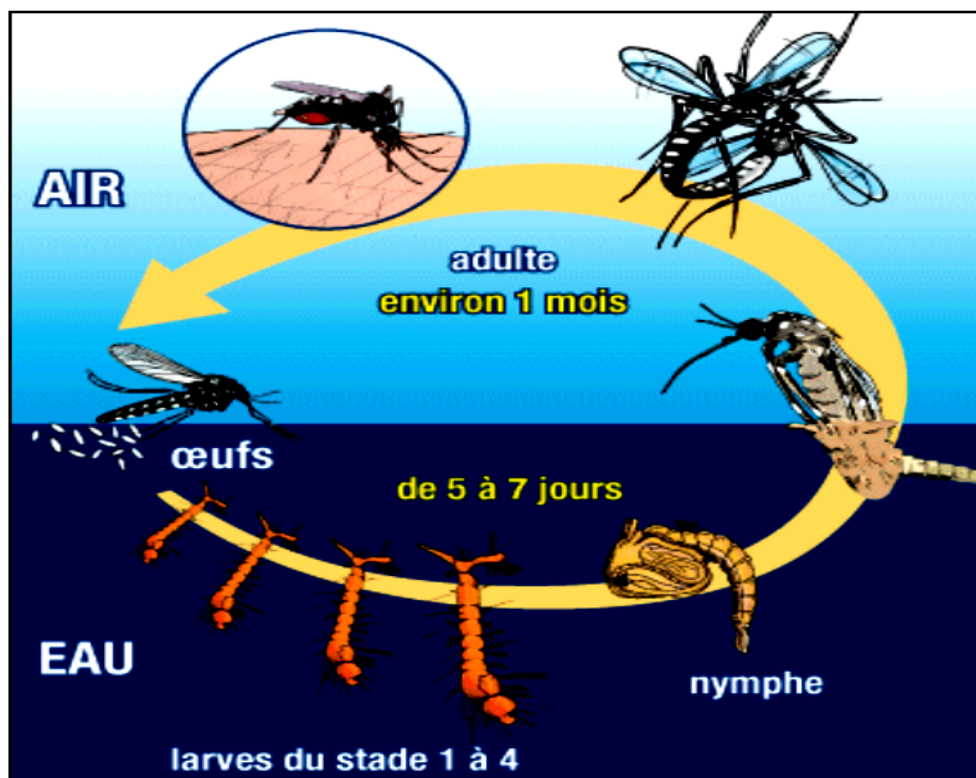


Figure 4. Cycle de développement des moustiques (Source : IRD)

1- Les œufs

Les œufs sont très différents suivant les genres et même les espèces. Ils mesurent environ 1 mm de long. Blanchâtre au moment de la ponte, ils s'assombrissent dans les heures qui suivent. Ils éclosent dès que l'embryon est complètement développé. Ils peuvent généralement éclore au bout de 2 à 5 jours selon les conditions climatiques et environnementales. Au moment de l'éclosion, le bouton d'éclosion, véritable ouvre-boîte situé sur la tête de l'embryon, découpe la coquille.

Chez les *Culex*, les œufs sont groupés en nacelles flottantes de 50 à 200 œufs. Les *Aedes* pondent leurs œufs isolément sur des supports à proximité immédiate de la surface de l'eau, ou à même le sol sec. Ces œufs sont très résistants à la dessiccation et pourront attendre la montée de l'eau (pluie importante par exemple) provoquant l'immersion de ceux-ci et l'éclosion de la larve. Ils peuvent rester viables pendant plusieurs mois, et même une année. Ils sont dits quiescents. Les œufs du genre *Mansonia* sont regroupés sous une feuille flottante.

2- Les larves

Les larves de moustiques sont blanchâtres et ressemblent à des petits vers. Elles sont dépourvues de pattes et d'ailes. Les larves ont une croissance discontinue et subissent quatre mues, lui permettant de passer d'environ 2 à 12 mm. De la dernière mue sort une nymphe. Les larves sont le plus souvent détritiphages mais certaines sont prédatrices ou même cannibales. Elles se déplacent par saccades et se nourrissent généralement par filtration, soit à la surface, soit au fond du gîte larvaire. Le mode de respiration des larves sont différentes selon les genres : les larves d'*Anophèles* respirent directement l'air extérieur par des stigmates dorsaux, ce qui leur impose une position de repos parallèle à la surface de l'eau. Par contre, les larves d'*Aedes* et de *Culex* respirent par un siphon situé à l'extrémité de l'abdomen et sont donc obliques par rapport à la surface de l'eau. Ces caractères sont très importants pour déterminer les différentes larves à première vue sur terrain. La durée du stade larvaire est de 4 à 7 jours.

3- Les nymphes

Les nymphes ont la forme d'une virgule. Elles restent généralement à la surface de l'eau mais plongent lorsqu'elles sont dérangées, en déployant et repliant l'abdomen terminé par deux palettes natatoires. Elles ne peuvent pas se nourrir et elles respirent à l'aide de deux trompettes situées sur le céphalothorax et non au bout de l'abdomen comme chez la larve. Les transformations

qui permettent au moustique de passer du milieu aquatique au milieu terrestre débutent à la fin du développement larvaire par la lyse des muscles et se poursuivent chez la nymphe par l'élaboration d'un système totalement nouveau. Ce stade est de courte durée : 24 à 48 heures. Au moment de l'émergence de l'adulte, la cuticule se fend longitudinalement. L'adulte se gonfle d'air et s'extrait de l'exuvie à la surface de l'eau.

4- Les adultes

Au stade adulte, les moustiques demeurent à la surface de l'eau jusqu'à ce qu'ils soient assez forts pour voler et chercher leur nourriture. Pendant les premiers jours de leur existence, les adultes mâles et femelles sont au repos dans des lieux abrités. Leur premier repas, pris le plus souvent au crépuscule, est composé de nectar. Les mâles se nourrissent essentiellement et uniquement de nectar durant toute sa vie. Seule la femelle est hématophage. Lors de l'accouplement, le moustique mâle est attiré par les vibrations des ailes de la femelle en vol. L'accouplement peut avoir lieu entièrement en vol ou se terminer sur un support. Les femelles ne s'accouplent généralement qu'une fois et peu après leur émergence. La fécondation des œufs a lieu au moment de la ponte; les spermatozoïdes sont stockés dans une spermathèque, d'où ils sont relâchés pour féconder les œufs au moment des pontes successives. Pour permettre la maturation des ovaires, la femelle doit prendre un repas sanguin, riche en protéines. Certaines espèces, comme le moustique urbain *Culex pipiens*, peuvent produire une première ponte sans prendre de repas de sang ; elles sont dites autogènes et utilisent les réserves énergétiques accumulées par la larve. Mais un repas sanguin est obligatoire pour les pontes suivantes.

Selon leurs caractéristiques, qu'elles soient diurnes ou nocturnes, les moustiques femelles piquent préférentiellement à certaines heures. Pour les moustiques nocturnes, elles piquent le plus souvent à l'aube et au crépuscule. Pour *Aedes* (plus précisément, *Ae aegypti* et *Ae albopictus* qui sont diurnes), les femelles piquent souvent vers le début de la matinée et vers la fin de l'après midi. Certaines espèces, plus rares, sont agressives pendant tout le nyctémère (durée de 24 heures) comme *Erethmapodites*.

Après un repas sanguin, la femelle se réfugie dans un endroit calme et abrité qui sera favorable au bon déroulement de son cycle gonotrophique, c'est-à-dire au développement des embryons à l'intérieur des œufs. Lorsque les œufs arrivent à maturité, la femelle pond dans un milieu le plus favorable pour sa progéniture. Le nombre d'œufs produits varie en fonction des

espèces et de la quantité de sang absorbée ; les pontes autogènes sont toujours composées d'un moins grand nombre d'œufs. Une quantité faible de repas sanguin suffit pour produire une ponte. Si la quantité de sang est suffisante, la femelle ne piquera à nouveau qu'après avoir pondu. Elle prend un nouveau repas de sang et le cycle recommence. La durée de ce cycle gonotrophique est variable suivant les espèces et les climats: elle peut aller jusqu'à cinq à sept jours chez *Aedes africanus*, vecteur de la fièvre jaune. Chez certaines espèces, la maturation des œufs laisse des traces dans les ovaires, ce qui permet de déterminer l'âge physiologique des femelles, notion particulièrement importante dans le cas de transmission de maladies.

CHAPITRE 2.

LES COMMUNAUTÉS MICROBIENNES DES MOUSTIQUES

A- Contexte général

L'absence de vaccin contre la plupart des arbovirus rend indispensable la lutte antivectorielle qui est principalement basée sur l'utilisation d'insecticides chimiques. Cependant, on sait que la plupart des vecteurs développent des résistances vis-à-vis des produits utilisés (Raymond et al., 1991). De plus, la production de nouveaux composés chimiques est freinée d'une part, par le coût financier en recherche et en développement, d'autre part par le risque de plus en plus élevé de toxicité des nouveaux dérivés pour la population humaine, animale et pour l'environnement. L'exploitation de nouveaux moyens, telle l'utilisation des communautés microbiennes comme biopesticide pour la lutte antivectorielle, en complément des agents chimiques et génétiques, est donc une stratégie encouragée au niveau mondiale (OMS, 1975).

En plus des agents infectieux qu'ils transmettent, les insectes vecteurs hébergent des microorganismes endosymbiotiques (Ishikawa, 2003). Ces microorganismes peuvent manipuler la dynamique de population des insectes (Buchner, 1965) en affectant des fonctions importantes comme le développement, la nutrition (Baumann, 1995 ; Zientz et al., 2004), la reproduction (Werren, 2008), la spéciation (Hurst et Werren, 2001), et même la dynamique vectorielle (Baldrige, et al., 2004 ; Weiss et Aksoy, 2011). Les relations en termes de fonctions et de taxons sont nombreuses et diversifiées entre les bactéries et les insectes. La Figure 5 et le tableau 2 résument les différents degrés de relations existantes observées dans la nature.

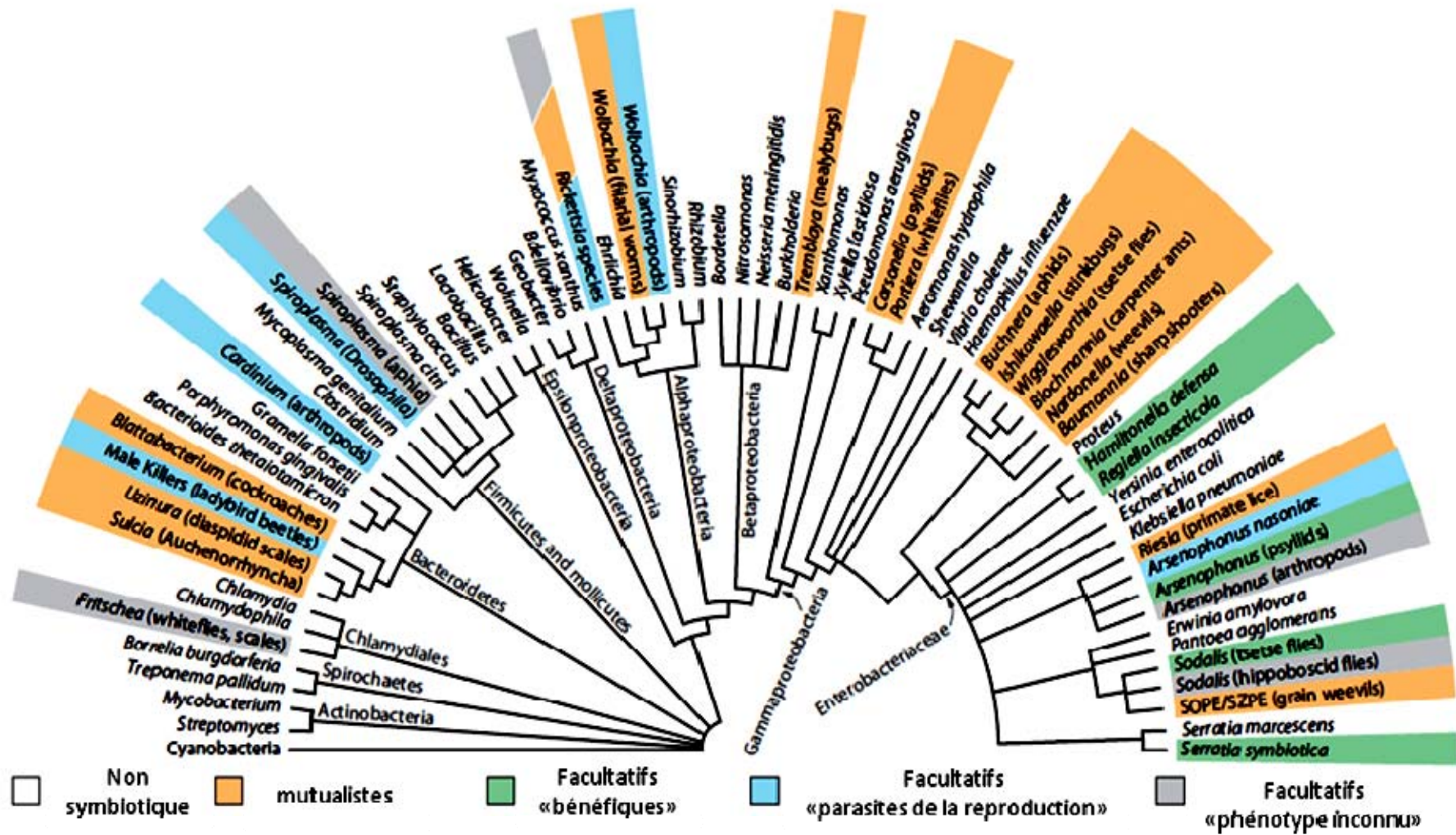


Figure 5. Relation phylogénétique de quelques endosymbiotes chez les insectes. Les différentes couleurs représentent les différents phénotypes induits. (Moran et al., 2008)

Tableau 2. Distribution et différentes fonctions des symbiotes à l'intérieur des variétés de classe d'insectes (Aksoy and Rio, 2005)

| Insect order | Bacterial partner | Distribution/putative function |
|---------------------|---|---|
| Blattaria | | |
| Cockroach | Blattobacterium (Flavobacteria) | Fat body ^B /urate recycling |
| Isoptera | | |
| Termite | Blattobacterium (Flavobacteria) Anaerobes, methanogens | Fat body ^B /nitrogen fixation Gut/urate recycling |
| Phthiraptera | | |
| Sucking lice | Many bacterial types | Body ^B /nutrition |
| Hemiptera | | |
| Bedbug | γ-Proteobacteria | Abdomen ^B /nutritional |
| Triatomine bug | Actinomycetes, Corynebacterium <i>Arsenophonus triatominarum</i> | Extracellular (gut lumen)/vitamins Intracellular (broad)? |
| Homoptera | | |
| Aphid | <i>Brevinema aphidicola</i> (γ-Proteobacteria) | Body ^B / amino acids |
| P | PASS, PAUS, PABS (γ-Proteobacteria) | Broad/defense, temperature Tolerance |
| S | PAR (α-Proteobacteria) | Hemolymph/? |
| Whitefly | | |
| P | γ-Proteobacteria | Body ^B /nutritional |
| S | γ-Proteobacteria | Body ^B /nutritional |
| Mealybug | | |
| P | <i>Tremblaya pruliceps</i> (β-Proteobacteria) | Body ^B /nutritional |
| S | γ-Proteobacteria | Within P ^B /slowing P degradation |
| Sharpshooter | <i>Burkholderia coccinellivora</i> | Anterior abdomen ^B /nutritional |
| Psyllid | | |
| P | <i>Carsosella ruddii</i> (γ-Proteobacteria) | Body ^B /nutritional |
| S | γ-Proteobacteria | Synctial region ^B |
| Diptera | | |
| Tsetse fly | | |
| P | <i>Wigglesworthia glossinidia</i> (γ-Proteobacteria) | Anterior midgut ^B /vitamins |
| S | <i>Sodalis glossinivorus</i> (γ-Proteobacteria) | Extra- and intracellular/? |
| Hymenoptera | | |
| Carpenter ant | <i>Blattmannia camponoti</i> (γ-Proteobacteria) | Midgut ^B /colony founding, growth |
| Coleoptera | | |
| Cereal weevils | SOPE, SZPE (γ-Proteobacteria) | Intestine ^B /nutritional |

^B = Bacteriocyte. P = primary symbiont; S = secondary symbiont.

PASS = pea aphid secondary symbiont, also described as R-type; PAUS = pea aphid U-type symbiont, also described as U-type.

PABS = pea aphid *Brevinema*-type symbiont, also described as T-type; PAR = pea aphid *Rickettsia*.

SOPE = *Sitophilus oryzae* primary endosymbiont; SZPE = *Sitophilus zeamais* primary endosymbiont.

Plusieurs types de symbioses sont observés dans les relations microorganismes-insectes.

- Il y a les symbioses «primaires» ou mutualistes. Ce type d'association est obligatoire pour l'hôte et son symbiote. L'élimination de ce dernier aura une conséquence néfaste pour la survie de l'hôte, qui a développé une dépendance à la présence de l'endocytobioite qui lui apporte un complément nutritionnel, comme des acides aminés essentiels, des vitamines ou encore des composés azotés (Zientz *et al.*, 2004 ; Dale et Moran, 2006 ; Moran *et al.*, 2008). Cette association suggère une co-évolution durable qui s'accompagne de la mise en place d'une interdépendance et d'une complémentarité sur le plan génomique et métabolique (Baumann *et al.*, 1995 ; Zientz *et al.*, 2004 ; Moran *et al.*, 2008). L'exemple le plus étudié est

l'association entre la bactérie du genre *Buchnera* et les aphides (pucerons). Les pucerons se nourrissent de sève phloémienne riche en sucre et acides aminés non essentiels mais pauvre en vitamines et acides aminés essentiels qui sont apportées par le symbiote primaire *Buchnera*. En retour, les pucerons fournissent à la bactérie des substrats carbonés indispensables à sa croissance et un habitat exempt de compétiteurs directs (Zientz *et al.*, 2004).

- Il y a les symbioses «secondaires» ou facultatives. Ce type d'association est très différent du premier. En effet, la survie de l'hôte n'est pas compromise en l'absence du symbiote. L'hôte peut acquérir le symbiote par différentes voies : soit verticalement, souvent via les ovocytes, soit par transfert horizontal, et ce par voie orale ou par l'environnement via la prédation (Heath *et al.*, 1999 ; Fukatsu et Hosokawa, 2002 ; Kikuchi *et al.*, 2007). L'association générée par les symbiotes facultatifs peut être de plusieurs types. Il pourrait s'agir de protection contre des stress physiologiques, ou contre des pathogènes bactériens, fongiques, viraux et parasitaires ou encore des prédateurs (Tsuchida *et al.*, 2002 ; Oliver *et al.*, 2003 ; Scarborough *et al.*, 2005 ; Oliver *et al.*, 2005 ; Oliver *et al.*, 2006). L'association peut aussi avoir des effets sur la reproduction et le développement de l'hôte (Werren, 2008). L'exemple le plus étudié actuellement est celui des bactéries qui manipulent la reproduction des insectes pour favoriser leur propre dissémination dans les populations d'hôtes. Tels sont les cas des bactéries des genres *Wolbachia*, *Flavobacterium*, *Spiroplasma*, *Arsenophonus*, *Rickettsia* ou *Cardinium* qui sont transmises verticalement via les ovocytes de l'hôte (Dumler *et al.*, 2001).

B- Exemple de symbiose facultative entre les communautés microbiennes et les insectes: *Wolbachia pipientis*

1- Systématique

Les bactéries du genre *Wolbachia* ainsi que les genres *Anaplasma* et *Ehrlichia* sont des Alphaprotéobactéries à Gram négatif de la famille des *Anaplasmataceae* et de l'ordre des Rickettsiales (Dumler *et al.*, 2001) (Figure 6a). Ces bactéries sont de petite taille, de forme sphérique à allongée (Hertig, 1936). Ce sont des bactéries non cultivables localisées majoritairement dans le cytoplasme des cellules hôtes (Hertig et Wolbach, 1924 ; O'Neil *et al.*, 1997). Découverte par Wolbach et Hertig en 1924 dans les tissus reproducteurs du moustique *Culex pipiens*, l'espèce

Wolbachia pipientis a été détectée exclusivement chez des hôtes invertébrés, contrairement aux *Anaplasma*, *Ehrlichia* ou *Rickettsia* qui peuvent infecter à la fois un invertébré et vertébré. Cependant, les quatre genres ont comme point commun leur capacité à infecter un hôte eucaryote et à développer avec lui des interactions qui peuvent aller du parasitisme au mutualisme.

Wolbachia est principalement transmise verticalement des femelles aux descendants par voie des cytoplasmes des ovocytes, même si des transmissions horizontales de la bactérie existent (Heath et al., 1999 ; Vavre et al., 1999). Possédant un large spectre d'hôtes, allant des nématodes filaires (Bandi et al., 1998), des acariens (Breeuwer et Jacobs, 1996), aux araignées (Rowley et al., 2004). Les hôtes les plus infectés par *Wolbachia* sont les insectes qui présentent 20 à 65% d'infection par cette bactérie (Higenboelcker et al., 2008). *Wolbachia* a surtout un tropisme pour les cellules reproductrices de l'hôte, mais des colonisations des tissus somatiques par la bactérie (muscle, cerveau, glandes salivaires) ont été aussi déjà montrées chez *Drosophila simulans*, *Aedes albopictus* et *Culex pipiens* (Dobson et al., 1999 ; Zouache et al., 2009).

L'espèce *Wolbachia pipientis* regroupe toutes les souches de *Wolbachia* qui forme un groupe monophylétique (Lo et al., 2007). Cependant, les analyses phylogénétiques récemment développées, notamment la MLST (MultiLocus Sequence Typing) qui permet de discriminer les différentes souches de *Wolbachia* en ciblant différents gènes de ménage (Casighari et al., 2005 ; Baldo et al., 2006 ; Paraskevopoulos et al., 2006 ; Baldo et Werren, 2007 ; Lo et al., 2007), ont permis de diviser *Wolbachia* spp en huit clades distincts (Lo et al., 2007) (Figure 6b). Les premiers décrits sont les clades A et B qui englobent la majorité des *Wolbachia* infectant les Arthropodes, dont la souche *wPip* infectant *Culex pipiens* (groupe B) (Werren et al., 1995). Les clades C et D regroupent les *Wolbachia* infectant les nématodes filaires (Bandi et al., 1998). Les clades E et H comportent des souches de *Wolbachia* infectant les collemboles et les termites (Bordenstein et Rosengaux, 2005). Le clade H est très diversifié puisqu'il concerne des souches de nématodes filaires et d'Arthropodes (termites, punaises, scarabées, criquets, mouches, fourmis et blattes) (Bordenstein et al., 2009 ; Ros et al., 2009). Le clade G regroupe les *Wolbachia* des araignées et des nématodes nonfilaires (Rowley et al., 2004 ; Tsai et al., 2007). Cependant les analyses phylogénétiques basées sur le gène *wsp*, codant une protéine transmembranaire, ont montré que ce clade G serait issu de recombinaison entre le clade A et B (Baldo et Werren, 2007 ; Ros et al., 2009 ; Zouache, 2009).

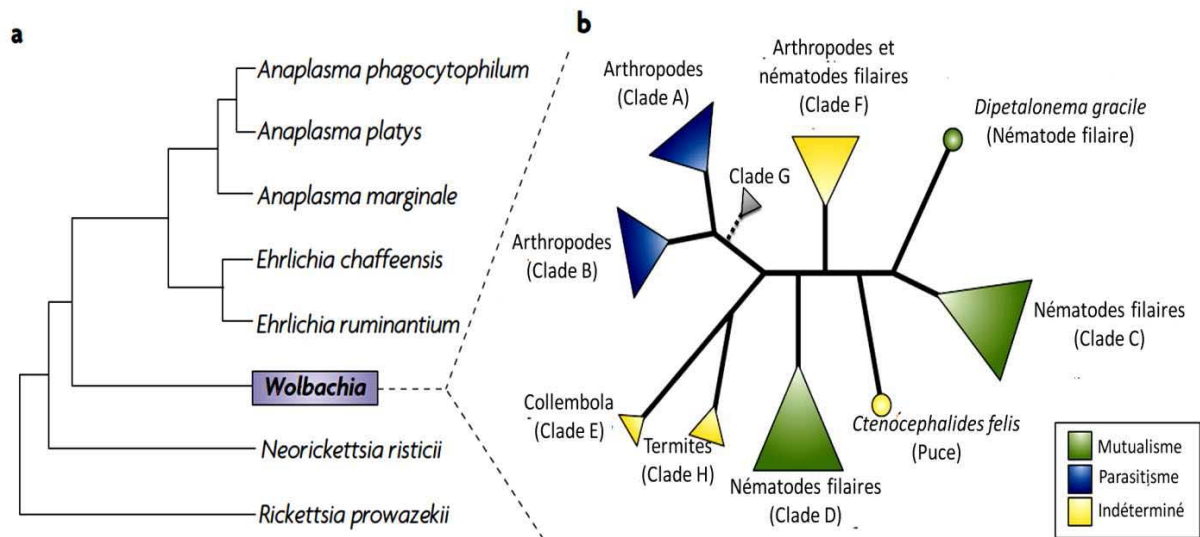


Figure 6. Phylogénie de *Wolbachia*. (a) : Position phylogénétique simplifiée de *Wolbachia* au sein des Rickettsiales. (b) : Arbre phylogénétique des principaux clades de *Wolbachia*. D'après Lo et coll. (2007) et Werren (2008), modifié par Zouache et coll. (2009).

2- Les manipulations génétiques induites par *Wolbachia* sur ses hôtes

Wolbachia induit des effets extrêmement variables sur la génétique de ces hôtes lors des associations qu'elle établit avec eux-ci. Ces associations vont du parasitisme au mutualisme, selon l'organisme infecté. Chez les Arthropodes, *Wolbachia* est considérée comme «un parasite de la reproduction» du fait de la manipulation de la reproduction de ses hôtes pour assurer sa diffusion au sein des populations (Werren, 1997b). Quatre principaux phénomènes de manipulation ont été documentés chez les Arthropodes (Figure 7) (Southamer *et al.*, 1999 ; Serbus *et al.*, 2008 ; Werren, 2008 ; Saridaki et Bourtzis, 2009).

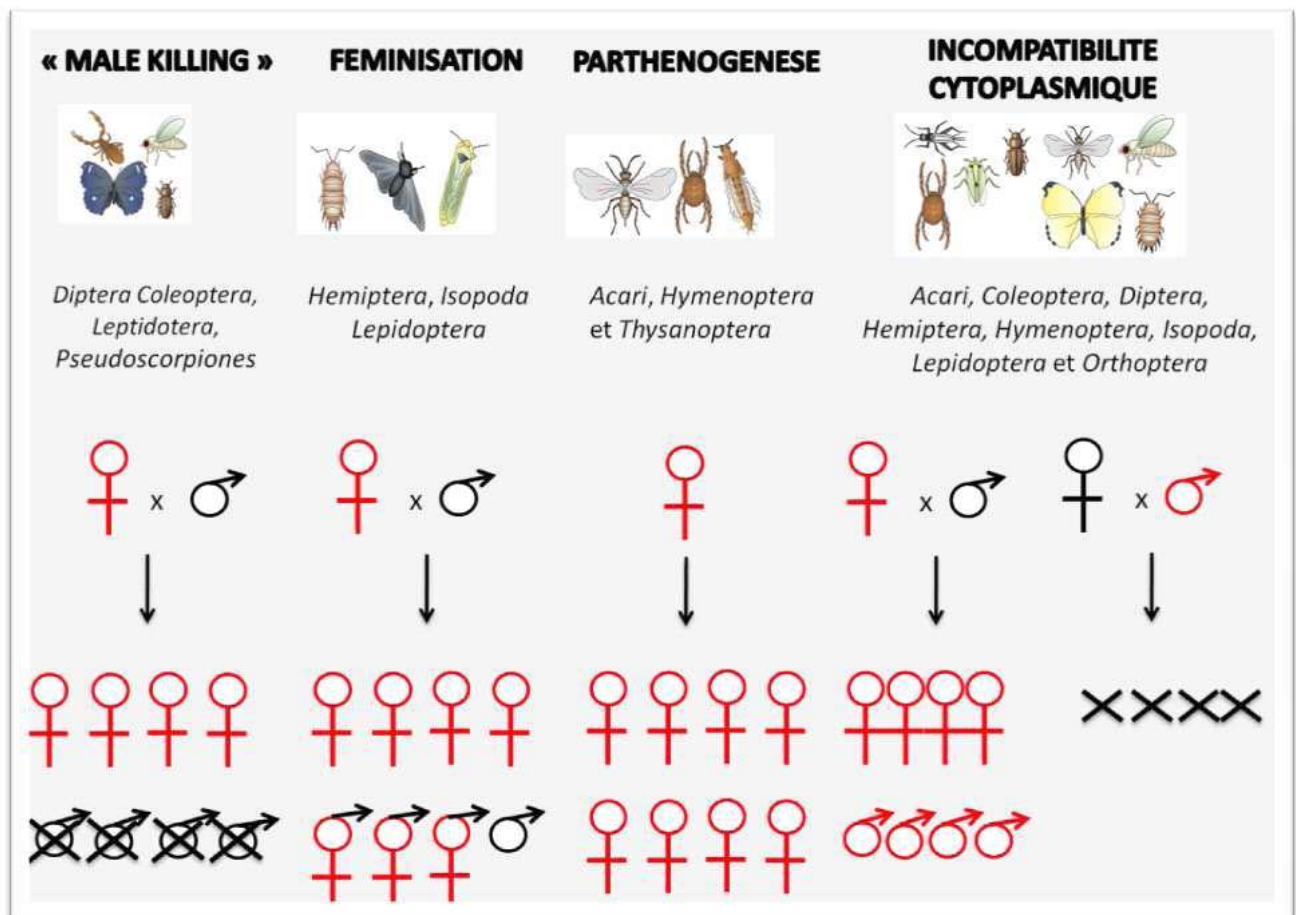


Figure 7 . Représentation des quatre phénomènes de manipulation des hôtes Arthropodes par *Wolbachia* (Werren, 2008).

- **Le male-killing** : consiste en la destruction des chromosomes paternels qui entraîne la mort précoce des embryons mâles (Hurst et al., 2001 ; Charlat et al., 2007).
- **La féminisation** consiste en la transformation génétique des mâles en néo-femelles fonctionnelles. Elle se produit généralement chez les crustacés isopodes (Bouchon et al., 1998)
- **La parthénogenèse** est liée à une perturbation du cycle cellulaire pendant les phases précoces de l'embryogénèse aboutissant au développement d'œufs diploïdes non fécondés (Stouthamer et al., 1999 ; Pannebeckker et al., 2004). Elle a été observée chez les thrips (thysanoptères dite «bêtes d'orages»), les hyménoptères haplo-diploïdes et les mites.
- **L'incompatibilité cytoplasmique (IC)** correspond à des croisements non féconds entre des mâles infectés et des femelles aposymbiotiques (cas de l'IC unidirectionnelle) ou entre des individus infectés par des souches de *Wolbachia* différentes (cas de IC bidirectionnelle)

(Stouthamer *et al.*, 1999 ; Werren, 2008). Décrit pour la première fois chez *Culex pipiens* en 1971 (Yen et Barr, 1971), l'IC est le phénomène le plus répandu.

3- Progression des recherches sur l'utilisation de *Wolbachia* comme complément de lutte antivectorielle

Depuis que les résistances des vecteurs vis-à-vis des produits chimiques ont été observées, et la grande avancée des connaissances sur les effets qu'exercent les communautés microbiennes, particulièrement *Wolbachia* chez les hôtes infectés, de nombreuses recherches ont été conduites pour mieux comprendre les relations endosymbionte-hôte. Mieux encore, l'exploitation de *Wolbachia* a été proposée comme une nouvelle stratégie pour modifier la dynamique des populations de moustiques vecteurs et réduire leur capacité à transmettre les agents pathogènes (Brownstein, 1998).

- a- L'exploitation de l'incompatibilité cytoplasmique (IC) induite par *Wolbachia* chez son hôte comme moyen de contrôle des populations vectorielles est actuellement explorée par différents groupes de recherche (Brownstein *et al.*, 2003 ; Bourtzis, 2008). Le principe est de disséminer dans la nature des mâles transfectés. Le croisement sera incompatible avec les femelles naturelles non infectées ou infectées par une souche de *Wolbachia* différente. L'expérience a été conduite par Brelsfoard et collaborateurs (2008) sur *Aedes polynesiensis*, vecteur de la filariose lymphatique et infecté naturellement par la souche de *Wolbachia* du clade A (Xi *et al.*, 2005 ; Brelsfoard *et al.*, 2008). Une souche appartenant au groupe B provenant d'*Aedes riversi* a été transfectée dans *Aedes polynesiensis* puis les individus mâles transfectés ont été disséminés dans la nature. En condition de laboratoire, il a été montré une IC bidirectionnelle proche de 100% lors des croisements entre les individus infectés par la souche A et ceux infectés par la souche B. Cependant, afin d'éviter le remplacement d'une population par une autre, l'introduction de mâles stériles en complément de l'IC a été suggérée (Brelsfoard *et al.*, 2009).
- b- L'utilisation de *Wolbachia* ou de toute autre bactérie endosymbiotique pour véhiculer un gène d'intérêt a été préconisé par certains auteurs (Sinkins et Godfray, 2004 ; Aksoy, 2008). En effet, comme *Wolbachia* envahit rapidement les populations, elle représente donc un candidat de choix pour la dissémination de transgènes dans les populations naturelles. Cependant, la difficulté majeure se trouve dans la propre transformation de *Wolbachia* car c'est une bactérie non cultivable en milieu synthétique, ce qui rend sa manipulation très difficile. Les bactéries

cultivables du genre *Asaia* serait de nouveaux candidats en cours d'investigation (Favia et al., 2008).

- c- La modification de la compétence vectorielle des moustiques peut se faire en utilisant soit des souches de *Wolbachia* virulente diminuant la durée de vie du moustique soit des souches de *Wolbachia* capables d'interagir avec le pathogène, diminuant sa dissémination et sa réplication *in insecta*. Tel est le cas des femelles d'*Aedes aegypti*, naturellement non infectées par la bactérie, qui ont été infectées artificiellement en laboratoire par la souche virulente *Wolbachia* wMelPop-CLA de *Drosophila melanogaster*. Une réduction très notable de leur durée de vie a été observée, ce qui par conséquent est préjudiciable pour le développement extrinsèque du virus à l'intérieur du moustique (McMeniman, 2009).
- d- Des récentes recherches ont démontré que la présence de *Wolbachia* infectant les moustiques vecteurs de la dengue, du chikungunya et de la filariose peut stimuler les fonctions immunitaires de l'hôte entraînant une inhibition virale (Moreira et al., 2009 ; Kambris et al., 2009 ; Bian et al., 2010 ; Kambris et al., 2010).

Ce sont là des exemples de recherche en cours au niveau mondial. Elles présentent toutes des limites d'application. En effet, il faut prendre en compte le fait que l'introduction des moustiques «génétiquement ou symbiotiquement» modifiés entraînera inévitablement des impacts sur les populations naturelles et sur les capacités adaptatives des populations introduites. De même, les conséquences à long terme de l'implantation de ces organismes modifiés sont difficilement prévisibles.

CHAPITRE 3.

LES ARBOVIRUS TRANSMIS PAR LES MOUSTIQUES

A- Définitions

1- Arbovirus.

Le mot « arbovirus », d'origine anglosaxonne, est le diminutif de « **Arthropodes Borne Virus** ». Il désigne les virus transmis habituellement et biologiquement par un vecteur arthropode hématophage. Le terme est utilisé exclusivement aux virus pathogènes des vertébrés. L'arbovirose, affection virale de l'homme ou des animaux qui découle de l'arbovirus, entraîne des manifestations pathologiques qui sont en recrudescence ces dernières décennies.

2- Vecteurs.

Dans le jargon médical, les vecteurs se définissent comme des arthropodes hématophages (insectes ou arachnides) qui transmettent biologiquement un agent infectieux (parasites, bactéries, ou virus) provenant d'un vertébré infecté à un autre vertébré réceptif par l'intermédiaire d'une piqûre, d'une déjection, ou par l'exudation de l'hémolymphe.

3- Compétence et capacité vectorielles.

Les notions de «compétence vectorielle» et «capacité vectorielle» définissent l'efficacité de la transmission d'un pathogène par un vecteur potentiel. Cette efficacité dépendra de plusieurs facteurs. (i) Les facteurs intrinsèques au vecteur (sa durée de survie, son taux de reproduction, ses préférences trophiques, la distribution et la densité des populations, sa probabilité de rencontre avec un hôte vertébré infecté). (ii) Les facteurs environnementaux (variation de la température et de l'humidité, des vents, durée du jour et de la nuit...). (iii) La capacité du vecteur à transmettre la maladie à un hôte. Elle représente une mesure de coadaptation entre un pathogène et un vecteur invertébré (Failloux et al., 1999 ; 2002; Hardy *et al.*, 1983). En effet, un vecteur assure une transmission biologique. C'est-à-dire que son organisme doit permettre le développement du parasite, qui suppose aussi en retour que le cycle de ce parasite ne peut se dérouler que chez cet hôte qui sert de vecteur et parfois même de réservoir naturel. Or, l'aptitude d'un arthropode à assurer la transmission d'un agent infectieux ne suit pas une loi de tout ou rien. Le degré d'aptitude de transmettre un même parasite au sein d'une population d'une même espèce est différent selon

sa compétence vectorielle. Celle-ci sera d'autant plus faible que les «barrières» (intrinsèque et extrinsèque) seront plus efficaces. La compétence vectorielle (illustrée en figure 8) exprime le degré de coadaptation entre le parasite et le vecteur. Elle demeure stable. La capacité vectorielle, par contre, exprime le niveau de fonctionnement du système vectoriel dans un environnement donné, à un moment précis. Ainsi, un vecteur à compétence faible pour un parasite donné, pourra toujours, s'il est très abondant et si sa longévité est grande, jouer un rôle épidémiologique déterminant dans la transmission car il présente une capacité vectorielle élevée qui peut varier aussi selon la saison, par exemple (Rhodain, 1989). Il a été notamment montré que la température modifie la compétence vectorielle d'*Aedes aegypti* vis-à-vis des alphavirus chikungunya (Mourya *et al.*, 2004 ; Ockelbo ; Turell, 1990).

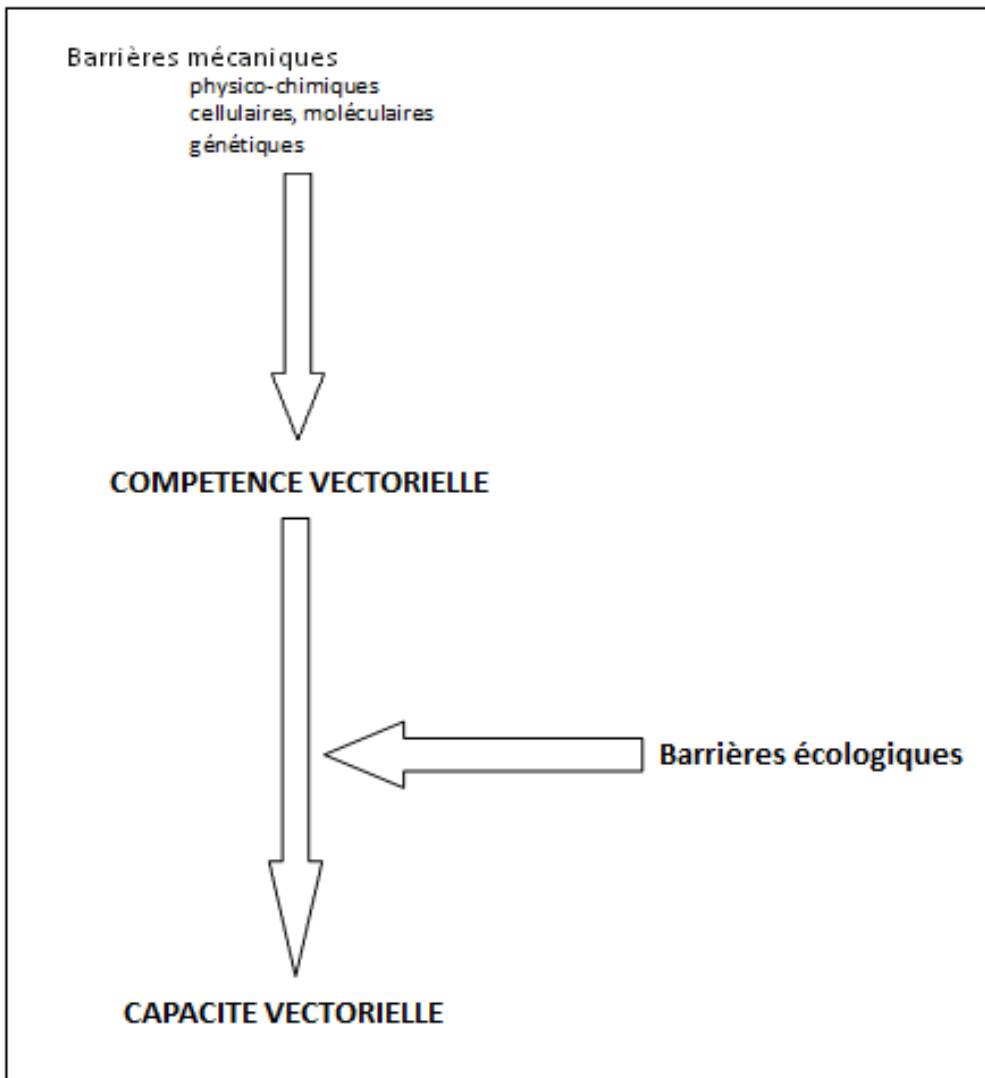


Figure 8. Interdépendance entre la compétence et la capacité vectorielles (Rhodain, 1989).

B- Transmission des arbovirus

La transmission des arbovirus est à l'origine inter-animale mais peut devenir de l'animal à l'homme ou encore interhumaine. La Figure 9 ci-après présente, de façon schématique, le cycle biologique des arbovirus où l'homme occupe une place d'hôte accidentel.

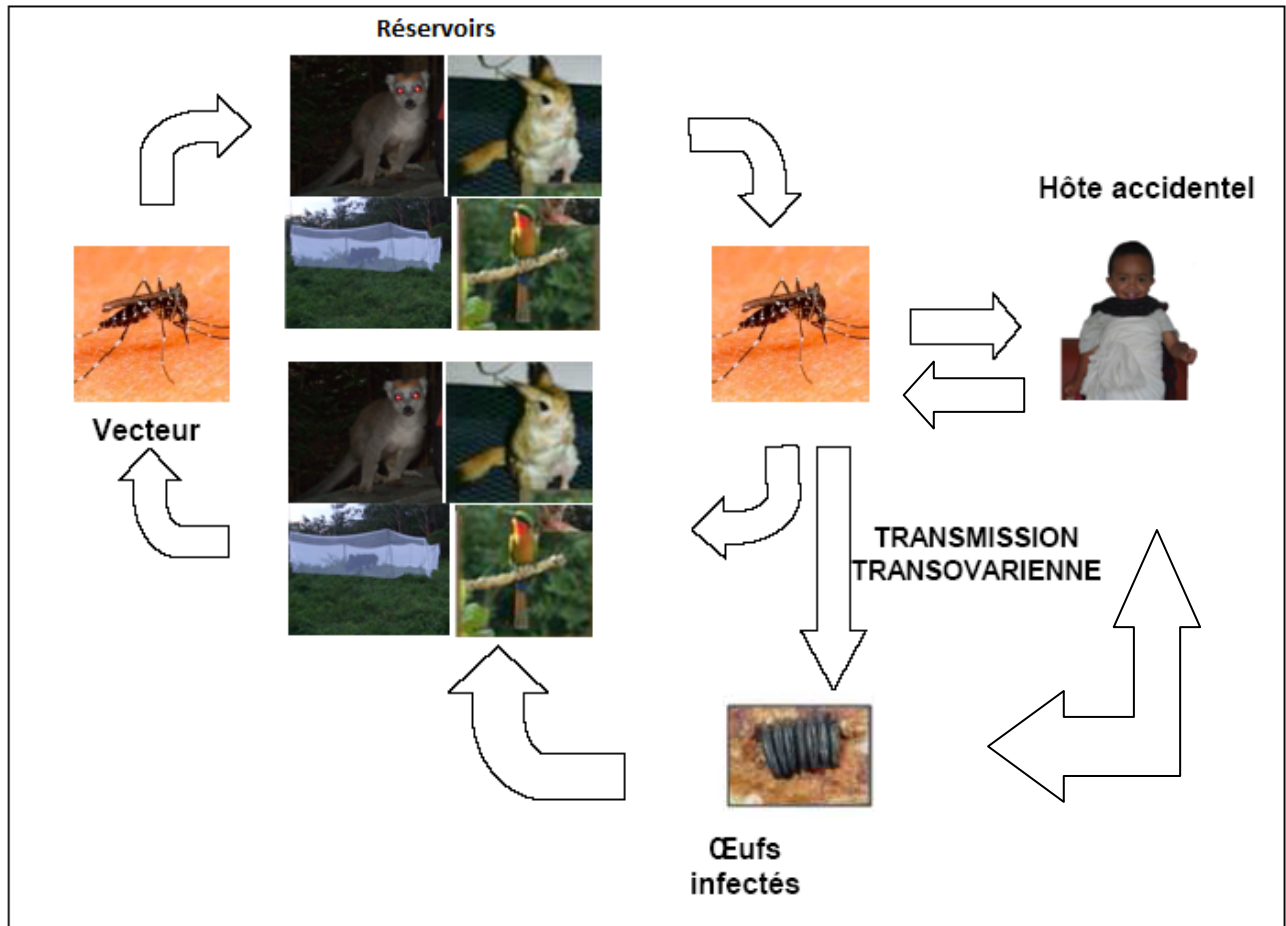


Figure 9 . Représentation schématique du cycle de transmission des arbovirus

Les agents infectieux responsables des maladies transmissibles se trouvent confrontés à plusieurs problèmes pour assurer leur persistance et leur dissémination. Les solutions qu'ils ont développées, par adaptation progressive, sont variées, ingénieuses, plus ou moins complexes selon la nature du pathosystème. Parmi ces solutions, la plus élaborée est sans doute le passage par un arthropode hématophage qui sert alors de vecteur (Rhodain, 1989 ; 1991). La réussite d'une transmission vectorielle nécessite trois étapes successives : l'infection du vecteur, le développement de l'agent pathogène chez le vecteur et enfin la transmission de l'agent pathogène vers un hôte.

1. L'infection du vecteur

Elle a lieu lors d'un repas de sang pendant lequel se réalise le contact entre un arthropode vecteur potentiel et un vertébré infectant. Pour favoriser sa transmission, le parasite se trouve alors en un site propice à son prélèvement par l'hématophage :

- dans le sang périphérique ou dans le tégument.
- sous une forme infectante pour le vecteur.
- au moment propice correspondant au pic d'agressivité du vecteur.
- en quantité suffisante : notion de seuil de densité.

2. Le développement de l'agent pathogène chez l'arthropode vecteur

Le type de développement sera différent suivant la nature de l'agent pathogène. Pour les virus, une réplication, extrêmement intense, se déroule dans un site donné dans l'organisme de l'arthropode et dans des conditions physico-chimiques favorables. Cette phase est dite «incubation intrinsèque» et correspond à la période entre le repas de sang infectieux et le moment où le vecteur devient infectant. A cette étape vont intervenir le rôle de la membrane péritrophique, celui des éventuels récepteurs spécifiques au niveau de certaines cellules, ainsi que de nombreux facteurs externes, en particulier la température. L'action conjuguée de tous ces facteurs conditionnera la réalisation ou non du développement du virus et de la durée de ce développement. Une quantité minimale de particules virales, appelée dose infectante, est nécessaire pour que le moustique s'infecte de façon durable. Une fois infecté, le moustique le demeure toute sa vie.

Après ingestion du sang infectant, le virus effectuera d'abord sa réplication dans les cellules épithéliales du tube digestif, première barrière à l'infection. Le virus va interagir avec les récepteurs spécifiques des cellules épithéliales permissives à ce niveau. Après multiplication, il franchira alors la lame basale, deuxième barrière, pour atteindre l'hémolymphe, voie lui permettant de se disséminer dans les différents organes, dont les glandes salivaires où il se répliquera de nouveau pour atteindre un titre maximal (Hardy *et al.*, 1983; Mellor, 2000). Les passages obligatoires des deux principales barrières (intestins et les glandes salivaires) (Figure 10) augmente considérablement la difficulté de la réalisation de certains cycles de développement dans l'organisme de l'arthropode, ce qui a pour conséquence qu'un nombre plus ou moins grand de virus ne réussissent pas à parvenir jusqu'au stade infectant pour le vertébré.

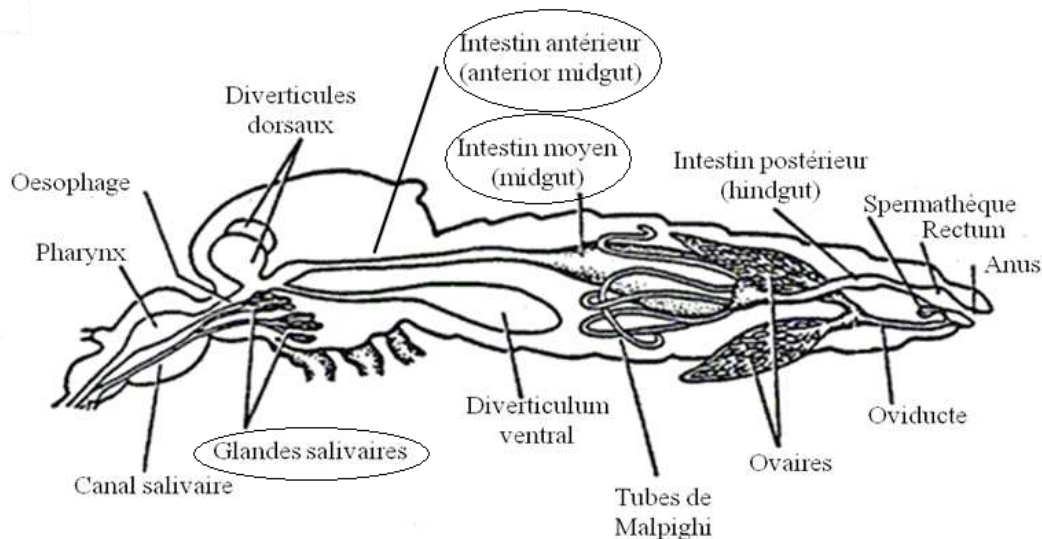


Figure 10 . Schéma représentatif de l'organisation générale d'un moustique. Les cercles représentent les principales barrières.

3. La transmission au vertébré et la virémie

Son mécanisme n'est pas univoque, le mode de transmission dépendra du système vectoriel considéré, la localisation du virus au moment des contacts avec le vertébré hôte. Soit dans la salive de l'arthropode, soit dans ses déjections ou même dans le liquide coxal, c'est-à-dire le liquide intermembranaire entre la coxa et le fémur qui facilite le mouvement de l'insecte. Quoi qu'il en soit, la transmission se réalise lors d'un contact entre un vertébré réceptif (qui soit non immun) et un arthropode vecteur infectant (Rhodain, 1989).

Un exemple concret de transmission se déroule comme suit : A la suite de l'injection de la salive lors de la piqûre d'un arthropode infestant, le vertébré réceptif va développer une infection arbovirale. Le virus va se répliquer à proximité du point d'inoculation, puis dans les ganglions lymphatiques correspondants (phase de virémie). Enfin, le virus se disséminera dans l'organisme jusqu'aux organes cibles entraînant une réponse immune tant humorale que cellulaire. Le tableau 3, non exhaustif, montre certains types d'arbovirus connus.

Tableau 3. Les arbovirus les plus importants provoquant des maladies à l'homme avec leurs répartitions dans le Monde (Gubler, 2002)

| Family/Virus | Vector | Vertebrate host | Ecology ^b | Disease in humans ^a | Geographic distribution | Epidemics |
|---|------------|---------------------------|----------------------|--------------------------------|--|-----------|
| Togaviridae | | | | | | |
| <i>Chikungunya</i> ^a | Mosquitoes | Humans, primates | <u>U</u> ,S,R | SFI | Africa, Asia | Yes |
| <i>Ross River</i> ^a | Mosquitoes | Humans, marsupials | <u>R</u> ,S,U | SFI | Australia, South Pacific | Yes |
| <i>Mayaro</i> ^a | Mosquitoes | Birds | <u>R</u> ,S,U | SFI | South America | Yes |
| <i>O'nyong-nyong</i> ^a | Mosquitoes | ? | R | SFI | Africa | Yes |
| <i>Sinbis</i> | Mosquitoes | Birds | R | SFI | Asia, Africa, Australia, Europe, Americas | Yes |
| <i>Barmah Forest</i> ^a | Mosquitoes | ? | R | SFI | Australia | Yes |
| <i>Eastern equine encephalitis</i> | Mosquitoes | Birds | R | SFI, ME | Americas | Yes |
| <i>Western equine encephalitis</i> | Mosquitoes | Birds, rabbits | R | SFI, ME | Americas | Yes |
| <i>Venezuelan equine encephalitis</i> ^a | Mosquitoes | Rodents | R | SFI, ME | Americas | Yes |
| Flaviviridae | | | | | | |
| <i>Dengue 1-4</i> ^a | Mosquitoes | Humans, primates | <u>U</u> ,S,R | SFI, HF | Worldwide in tropics | Yes |
| <i>Yellow fever</i> ^a | Mosquitoes | Humans, primates | <u>R</u> ,S,U | SFI, HF | Africa, South America | Yes |
| <i>Japanese encephalitis</i> ^a ? | Mosquitoes | Birds, pigs | <u>R</u> ,S,U | SFI, ME | Asia, Pacific | Yes |
| <i>Murray Valley encephalitis</i> | Mosquitoes | Birds | R | SFI, ME | Australia | Yes |
| <i>Rocio</i> | Mosquitoes | Birds | R | SFI, ME | South America | Yes |
| <i>St. Louis encephalitis</i> | Mosquitoes | Birds | <u>R</u> ,S,U | SFI, ME | Americas | Yes |
| <i>West Nile</i> ^a ? | Mosquitoes | Birds | <u>R</u> ,S,U | SFI, ME | Africa, Asia, Europe, U.S. | Yes |
| <i>Kyasanar Forest disease</i> ^a | Ticks | Primates, rodents, camels | R | SFI, HF, ME | India, Saudi Arabia | Yes |
| <i>Omsk hemorrhagic fever</i> | Ticks | Rodents | R | SFI, HF | Asia | No |
| <i>Tick-borne encephalitis</i> | Ticks | Birds, rodents | <u>R</u> ,S | SFI, ME | Europe, Asia, North America | No |
| Bunyaviridae | | | | | | |
| <i>Sandfly fever</i> ^a | Sandflies | ? | R | SFI | Europe, Africa, Asia | Yes |
| <i>Rift Valley fever</i> ^a | Mosquitoes | ? | R | SFI, HF, ME | Africa, Middle East | Yes |
| <i>La Crosse encephalitis</i> | Mosquitoes | Rodents | R,S | SFI, ME | North America | No |
| <i>California encephalitis</i> | Mosquitoes | Rodents | R | SFI, ME | North America, Europe, Asia | Yes |
| <i>Congo-Crimean hemorrhagic fever</i> ^a | Ticks | Rodents | R | SFI, HF | Europe, Asia, Africa | Yes |
| <i>Oropouche</i> ^a | Midges | ? | <u>R</u> ,S,U | SFI | Central and South America | Yes |

^aArboviruses that produce significant human viremia levels; ^bU = urban; S = suburban; R = rural; underline designates the most important ecology; ^cSFI = systemic febrile illness; ME = meningoencephalitis; HF = hemorrhagic fever.

4. Les organes ciblent des arbovirus chez l'hôte vertébré

L'infection par un arbovirus commence toujours par une porte d'entrée de l'organisme : c'est le site de multiplication primaire de l'arbovirus. Cette porte d'entrée varie selon le type de virus :

- Elle peut être les voies respiratoires ou le tube digestif. C'est le cas des arbovirus qui se disséminent par inhalation ou par contact avec les animaux malades, ou en ingérant une viande provenant d'un animal malade (ex : fièvre de la vallée du Rift, hantavirus). Les muqueuses respiratoires et digestives sont les sites de multiplication primaire de ces arbovirus.
- L'infection peut être le résultat d'une infraction cutanée due à une piqûre d'arthropodes (ex : moustiques). Dans ce cas, l'arbovirus peut envahir directement la circulation sanguine ou infecter les tissus profonds (la couche basale de l'épiderme, le derme, les muscles et les nerfs). Quand l'arbovirus atteint le système nerveux central, ce qui est rarement le cas, il se

multiplie dans les neurones moteurs périphériques. La Figure 11 montre les différentes cibles des arbovirus.

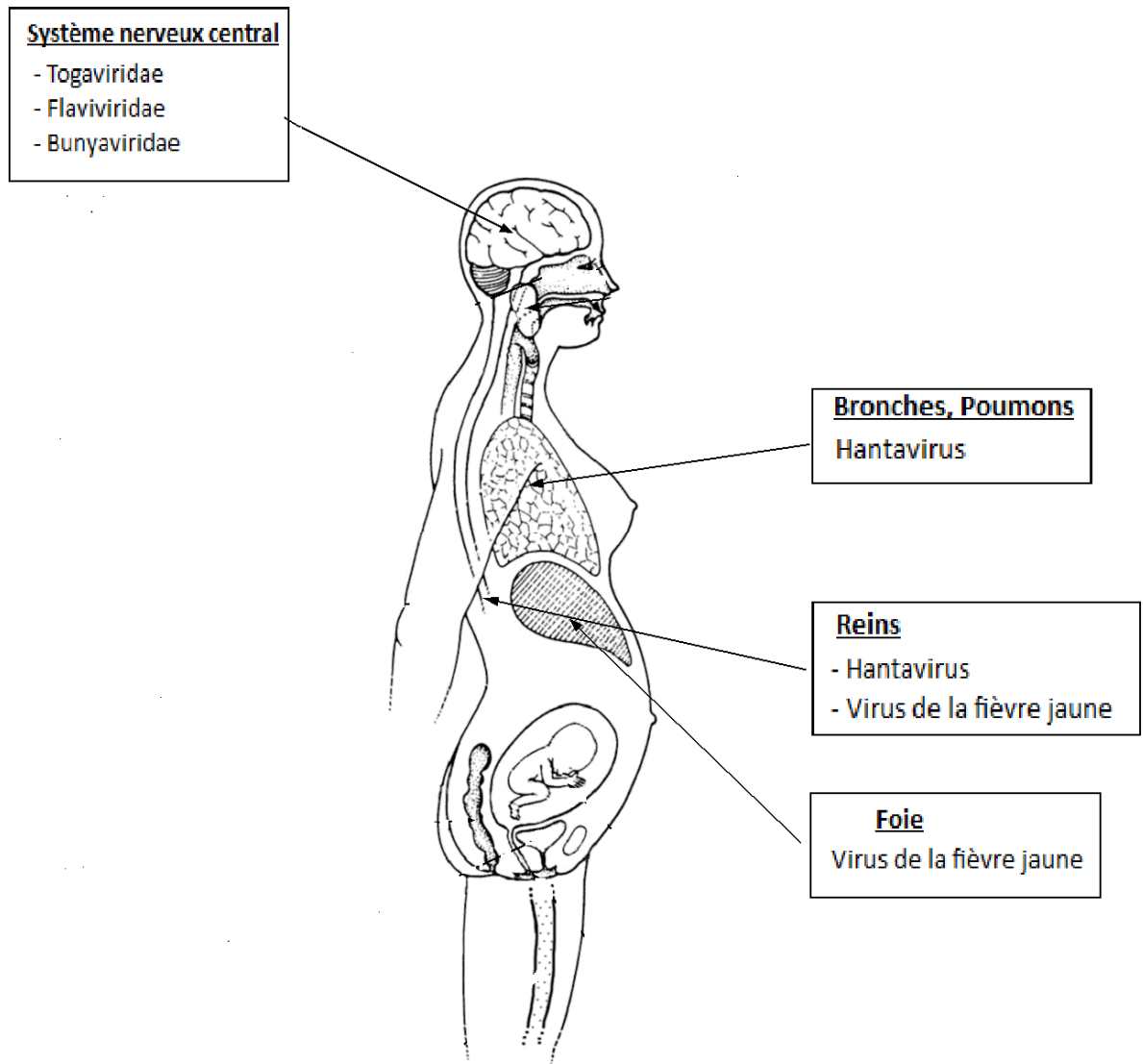


Figure 11. Les différents organismes cibles des arbovirus dans l'hôte humain.

5. Les différents types de transmission des arbovirus chez le moustique et chez l'hôte sensible

Dans la littérature, plusieurs types de transmission sont observables mais les deux énumérés ci-après sont les plus importants dans le maintien des épidémies dans la nature.

- **La transmission verticale ou transmission transovarienne:** c'est une transmission de l'agent pathogène de mère à descendants sans passer par un intermédiaire vertébré. La notion

désigne que les vecteurs jouent en même temps les rôles de transmetteurs et de réservoirs de l'arbovirus. L'endémie peut ainsi se maintenir, voire s'étendre, sans qu'il soit besoin de recourir au repas de sang sur les hôtes infectés (Coz et al., 1976 ; Rhodain, 1989 ; 1991 ; Bocquet et al., 1996). Tels sont les cas de la fièvre jaune (Aitken et al., 1979, 1988 ; Beaty et al., 1980 ; Dutary et al., 1981) ; et des flavivirus comme la dengue chez *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* (Rosen et al., 1983 ; Arunachalam et al., 2008) et le west-nile chez *Culex* (Miller et al., 2000). Souvent très difficile à détecter, le phénomène de transmission verticale reste rare, et ses conséquences sur les épidémies demeurent peu évaluées.

- **La transmission horizontale** : est la propagation d'un agent pathogène entre les individus après la naissance au sein d'un même troupeau. La transmission s'opérant par contact direct par l'intermédiaire d'un piqûre d'un vecteur (Hoch et al., 2005). La transmission horizontale d'un agent pathogène constitue un processus essentiel dans la propagation de cet agent dans un troupeau et joue un rôle important dans la dynamique des modèles épidémiologiques.

C- Prévalence des arbovirus émergents et ré-émergents majeurs

Durant les 20 dernières années, des émergences et résurgences d'épidémies d'arbovirus affectent les humains et les animaux domestiques. Actuellement, entre 500 et 600 arbovirus sont recensés et ce nombre ne cesse de croître. Plus d'une centaine de ces virus sont pathogènes pour l'homme et essentiellement détectés en milieu tropical dont une quarantaine à l'origine des maladies animales identifiées. La Figure 12 montre la distribution de certains arbovirus dans le monde. Les raisons des récentes réémergences ne sont pas connues mais semblent témoigner de modifications de comportements et de changements environnements très complexes. Et il est établi que des facteurs spécifiques environnementaux parmi lesquels des facteurs humains contribuent à l'accroissement des populations vectorielles, (Rhodain, 1989 ; 1991 ; Gubler, 2002).



Figure 12. Distribution des arbovirus dans le Monde de 1990-2000 (Gubler, 2002)

D'autres facteurs comme les changements climatiques peuvent aussi amplifier le phénomène en affectant l'extension des vecteurs et le mouvement des maladies tropicales (Gould and Higgs, 2009). Nous présentons quelques épidémies récentes majeures.

1. Le chikungunya

a- Historique

Appartenant au genre *Alphavirus*, de la famille des *Togaviridae*, le virus du chikungunya (CHIKV) est essentiellement transmis par les moustiques du genre *Aedes*. Le virus du chikungunya a été découvert pour la première fois en 1952-1953 (Lumsden, 1955 ; Ross, 1956) suite à une épidémie de fièvre sur le plateau de Makondé dans la province de Newala au Tanganyika, appelé Tanzanie actuellement. Responsable de la maladie appelée «chikungunya», il tire son nom d'un dialecte Makondé qui signifie «qui se courbe, qui se recroqueville», et se traduit en français comme

«maladie qui brise les os» ou «maladie de l'homme courbé». Appellation due aux formes manifestantes de la maladie qui provoque des arthralgies au niveau des articulations, occasionnant de très fortes douleurs articulaires associées à une raideur qui font que les malades marchent courbés lors de l'attaque. Des épidémies antérieures à 1952 ont pu être identifiées rétrospectivement à la lumière des connaissances actuelles de la maladie. Ainsi, certaines épidémies attribuées au virus de la dengue étaient en fait des épidémies de chikungunya : Le Caire et Batavia-Jakarta en 1779, Zanzibar en 1823 et 1870, l'Inde en 1823, 1824-1825 et 1871-1872, Hongkong, la Birmanie (actuel Myanmar) et Madras en 1901-1902. Cette réattribution repose sur deux faits : d'une part la coexistence des virus de la dengue et du chikungunya dans ces régions, et d'autre part les descriptions faisant état de douleurs articulaires et de complications de types arthrite plus compatibles avec une fièvre chikungunya qu'avec une dengue (Carey, 1971). Deux principaux foyers du chikungunya furent détectés :

- En Afrique, en 1958, lors d'une épidémie en Ouganda, le CHIKV fut isolé d'*Aedes africanus* et de *Mansonia* (McCrae et al., 1971), puis une épidémie sévit au Nigéria de 1964-1970 (Moore et al., 1975), en Afrique de l'Ouest avec notamment plusieurs épidémies recensées au Sénégal (Diallo et al., 1999), en Afrique de l'Est (Kenya, 2004) et en Afrique Centrale avec une épidémie d'envergure qui a touché 500 000 personnes en République Démocratique du Congo (1999 et 2000) (Pastorino et al., 2004 ; WHO, 2006).
- En Asie : Isolé pour la première fois en 1958 à Bangkok (Hammon et Sather, 1964), plusieurs épidémies de chikungunya touchèrent l'Inde en 1960 (Sarkar et al., 1965 ; Carey et al., 1969), la Birmanie (Thaung et al., 1975), le Cambodge (Chastel, 1964), l'Indonésie, les Maldives, la Thaïlande, le Vietnam et le Sri Lanka (WHO).

b- Le virus du chikungunya (CHIKV)

Les recherches récentes mentionnent que la souche virale responsable de l'épidémie de fin 2005 est une souche mutante appelée : CHIKV-06.21. Elle dérive de la souche africaine CHIKV ancestrale. Une substitution de l'alanine (A) par une valine (V) en position 226 de la glycoprotéine E1 a été constatée (Schuffenecker et al., 2006). Cette mutation aurait apporté un avantage sélectif à CHIKV-06.21 pour son hôte *Ae.albopictus*, conduisant à une meilleure réplication, dissémination et transmission du virus (Schuffenecker et al., 2006 ; Vazeille et al., 2007). En effet, le mécanisme d'entrée des virus dans les cellules est cholestérol-dépendant et des études ont montré, en modèle

cellulaire, que la souche CHIKV 06.21 portant la mutation A→V se réplique plus efficacement en absence de cholestérol en comparaison de la souche parentale non mutée (Tsetsarkin *et al.*, 2007). Cette même mutation a été détectée dans des souches virales responsables d'épidémies de chikungunya en Inde en 2007 (Santosh *et al.*, 2009) ; mais également dans d'autres épidémies en 2007 au Gabon (Pagès *et al.*, 2009) et en 2006 au Cameroun (De Lamballerie *et al.*, 2008).

c- Épidémiologie: Emergences et réémergences dans le Monde

En 2004, une réémergence du CHIKV en Afrique de l'Est au Kenya (Sergon *et al.*, 2008) fut suivie d'une épidémie explosive touchant les îles de l'Océan Indien entre 2005 et 2006, incluant les Comores, l'île Maurice, Mayotte, Madagascar, les Seychelles et l'île de La Réunion (Schuffnecker *et al.*, 2006 ; Ratsitorahina *et al.*, 2008, Sang *et al.*, 2008 ; Sissoko *et al.*, 2008). Des épidémies de chikungunya ont également été recensées en Inde avec plus d'un million de personnes atteintes en 2006 dans 16 états (Saxena *et al.*, 2006 ; WHO, 2007) (Figure 13).

Un fort taux de mortalité a été observé, bien qu'aucun décès n'ait directement été attribué au virus (Mavalankar *et al.*, 2008). Le Pakistan, le Sri Lanka, la Malaisie, les Maldives ont eux aussi été atteints. Le continent africain n'a pas été épargné puisqu'une épidémie a sévi au Cameroun (Peyreffite *et al.*, 2007) et que plus de 10 000 cas suspects ont été répertoriés au Gabon (Pagès *et al.*, 2009). Depuis le début 2008, une recrudescence de cas de CHIKV est décrite dans un certain nombre de pays d'Asie du Sud-Est, notamment en Indonésie, en Malaisie, en Inde, au Sri Lanka et à Singapour (WHO, 2010). Les épidémies de chikungunya sont également associées à l'importation de cas dans différentes régions du monde : en Belgique (Bottieau *et al.*, 2009), dans les Caraïbes, aux Etats- Unis, en Martinique et en Guadeloupe (Cordel *et al.*, 2006 ; Hochedez *et al.*, 2007, WHO, 2007). Le retour de voyageurs infectés a déclenché pour la première fois en Europe une émergence micro-épidémique de CHIKV en 2007 (217 cas confirmés) qui a touché la province de Ravenne, dans la région Emilie Romagne en Italie (Angelini *et al.*, 2007, 2008). Le vecteur *Ae. albopictus*, présent en Europe, fut identifié comme vecteur responsable de cette épidémie (Bonilauri *et al.*, 2008), indiquant que l'Europe n'est pas à l'abri d'épidémie de CHIKV.

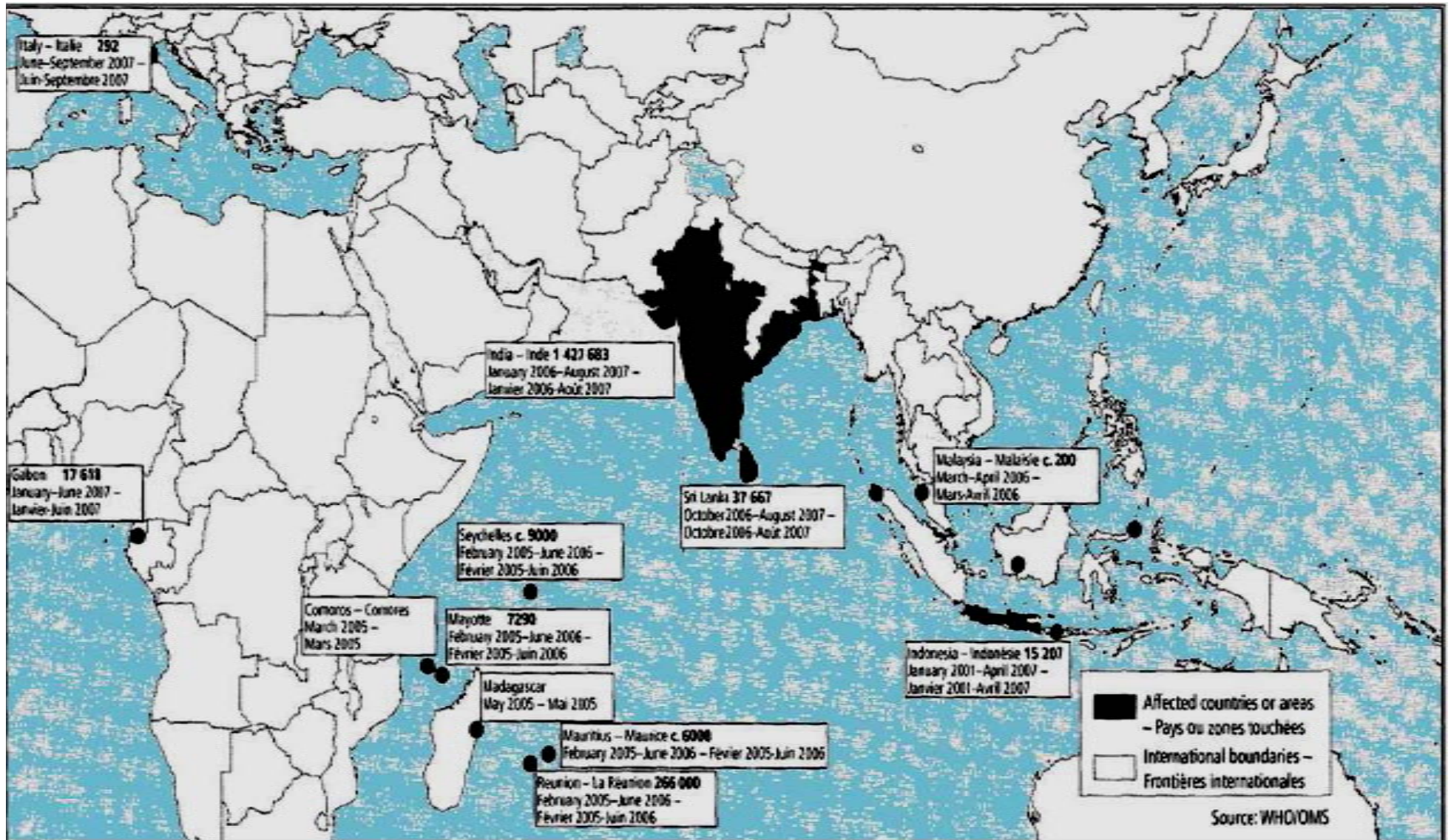


Figure 13. Les différents foyers de chikungunya recensés dans le Monde entre 2005-2006. Source WHO/OMS.

d- Pathogenèse

Un moustique infecté le reste toute sa vie. Or, comme la plupart des arbovirus, le CHIKV n'est pas pathogène pour le moustique vecteur. Cependant, cet attrait peut engendrer un coût physiologique. En effet, des recherches récentes ont montré qu'une diminution de la survie de la lignée des femelles d'*Ae.albopictus* de l'île de La Réunion est observable consécutive à l'infection par le CHIKV. De même, ces femelles infectées présentent une ponte précoce en comparaison des femelles non-infectées (Martin et al., 2010).

Chez l'homme, le virus est acquis après une injection de salive infectante d'un moustique vecteur, lors du repas sanguin de celui-ci. L'incubation de la maladie dure de quatre à sept jours en moyenne. La virémie, c'est-à-dire la période de présence du virus dans le sang, donc de transmission possible, s'étale pendant cette période. Cependant, l'infection par le CHIKV peut être asymptomatique. A l'île de La Réunion, il a pu être recensé 15% de porteurs sains (Brouard et al., 2008). Généralement, la maladie se déclare par une forte fièvre, parfois au-delà de 40°C, accompagnée de céphalées, durant environ trois jours. S'ensuit un érythème (éruption de boutons maculo-papuleuse et prurigineuse sur le thorax) dans environ 33-50% des cas (Pialoux et al., 2006) et de courbatures très douloureuses, ainsi que de vives douleurs des articulations, clouant le malade au lit. Les arthralgies peuvent persister plusieurs mois, voire des années, de 3 à 5 ans et dans de rares cas jusqu'à 15 ans après la maladie (Brighton, 1983, 1984 ; Carmona et al., 2008).

Deux faits nouveaux majeurs ont été observés durant ces dernières réémergences du chikungunya en 2005-2006. Alors qu'aucun décès n'avait été recensé auparavant, 203 décès ont été attribués au CHIKV (Renault *et al.*, 2007, 2008), avec une moyenne d'âge de 79 ans. Un autre fait nouveau est la transmission materno-foetale du virus chez 41 cas, avec une prévalence de 3 cas pour 1000 naissances (Gerardin *et al.*, 2008 ; Economopoulou *et al.*, 2009).

2. La Dengue

a- Historique

La bibliographie la plus ancienne qui fait référence à des symptômes d'une maladie qui rappellent ceux de la dengue est «*l'Encyclopédie Chinoise des Symptômes et des Remèdes*», dont la première version est datée de la Dynastie Chin, années 265 à 420 (Nobuchi, 1979 ; Cao Lormeau, 2006). Le livre décrit un mal causant rash cutané, fièvre, arthralgies, myalgies, douleurs oculaires et manifestations hémorragiques dont l'origine semble étroitement associée à la présence d'insectes

volants ainsi qu'à la proximité de points d'eau. L'épidémie de dengue de Philadelphie en 1780 est la première présentant un caractère d'authenticité suffisant (Rush, 1789 ; Hirsh, 1883). Les premiers documents qui décrivent clairement la maladie datent de la seconde moitié du XVIII^{ème} siècle sur les épidémies qui ont sévit en Asie (Indonésie, Inde) ; en Afrique (Egypte, Arabie, Perse) et en Amérique du Nord (Philadelphie, Pennsylvanie) (Pepper, 1941 ; Howe, 1977). D'origine africaine (swahili) le terme «dengue» fut mentionné à Zanzibar en 1823 pour décrire les crampes douloureuses caractérisant la maladie. Qualifié par les Américains de «breakbone fever» et de «dandy fever» par les Britanniques, le terme définitif de «dengue» fut inscrit à la nomenclature du «Royal College» des médecins de Londres en 1869. La dengue étant une maladie tropicale, la difficulté de porter un diagnostic clinique précis à l'occasion de ces cas de fièvres explique l'origine imprécise de la maladie. Plusieurs épidémies de dengue ont été décrites dans les îles de l'Océan Indien : en 1943 aux Comores (Mc Carthy & Brenth, 1943) ; en 1947 à Antsiranana, Madagascar (Cordellier, 1984). Puis, une épidémie due au virus DEN2 fut rapportée dans plusieurs pays : en 1976-1977 aux Seychelles (Metselaar et al., 1980) ; à La Réunion en 1978 (Coulanges et al., 1979) ; au Kenya en 1982 (Johnson et al., 1982) ; au Soudan en 1984 (Hyams et al., 1986) ; en Somalie en 1984 et 1993 (Salehah et al., 1985 ; Kanesa-Thasan et al., 1994) ; puis à Djibouti en 1992 (Rodier et al., 1996). Le virus DEN 1 fut signalé au Soudan en 1984 (Hyams et al., 1986) et le virus DEN3 fut identifié au Mozambique durant la même année (Gubler et al., 1986) ainsi qu'en Somalie en 1993 (Kanesa-Thasan et al., 1994).

b- Le virus de la Dengue (DENV)

Isolé, suite à l'inoculation à des souriceaux nouveau-nés d'un sérum de patients malades en phase aiguë, le virus fut identifié pour la première fois par Hotta et Kimura en 1943 (Hotta & Kimura, 1952). Sabin et son équipe furent à leur tour la découverte du virus en 1945 chez des soldats américains basés en Inde, en Nouvelle Guinée et à Hawaï (Sabin, 1952). Le virus isolé à Hawaii fut appelé dengue 1 (DENV1) et celui de Nouvelle Guinée, de sérotype différent, DENV2. Les deux autres sérotypes, DENV3 et DENV4, furent isolés plus tard, au cours de l'épidémie de dengue hémorragique qui sévit à Manille (Philippines) en 1956 (Hammon et al., 1960a).

La dengue est un arbovirus transmis par les arthropodes hématophages, plus précisément par les moustiques du genre *Aedes*. Le virus de la dengue appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus* lequel comprend également le virus de la fièvre jaune et le virus du Nil Occidental

(West Nile). Quatre sérotypes sérologiquement liés mais antigéniquement distincts existent (DENV1, DENV2, DENV3, DENV4). Chaque sérotype se distingue essentiellement par une variété de sous-types, classés par l'analyse phylogénétique de leur génome, d'une partie ou de la totalité de la séquence du gène d'enveloppe E (Trent et *al.*, 1990; Rico-Hesse, 1990; Deubel et *al.*, 1990; Chungue et *al.*, 1992; Chungue et *al.*, 1995). L'infection par l'un de ces quatre types viraux induit la production d'anticorps protecteurs, *a priori* à vie, contre le type infectant mais peu contre les trois autres. Des cas de multiinfections sont donc théoriquement possibles.

Le virus de la dengue est un virus enveloppé, comme tous les *Flaviviridae*. De structure icosaédrique, il a un diamètre d'environ 50 nanomètres. Son enveloppe est une bicouche lipidique dérivée de la cellule-hôte, dans laquelle sont ancrées deux glycoprotéines structurales virales, la protéine d'enveloppe (E) et la protéine de membrane (M) (Lindenbach & Rice, 2001). Le génome viral est contenu dans une nucléocapside de structure icosaédrique, composé d'une troisième protéine structurale, appelé protéine de capsid (C) (Figure 14).

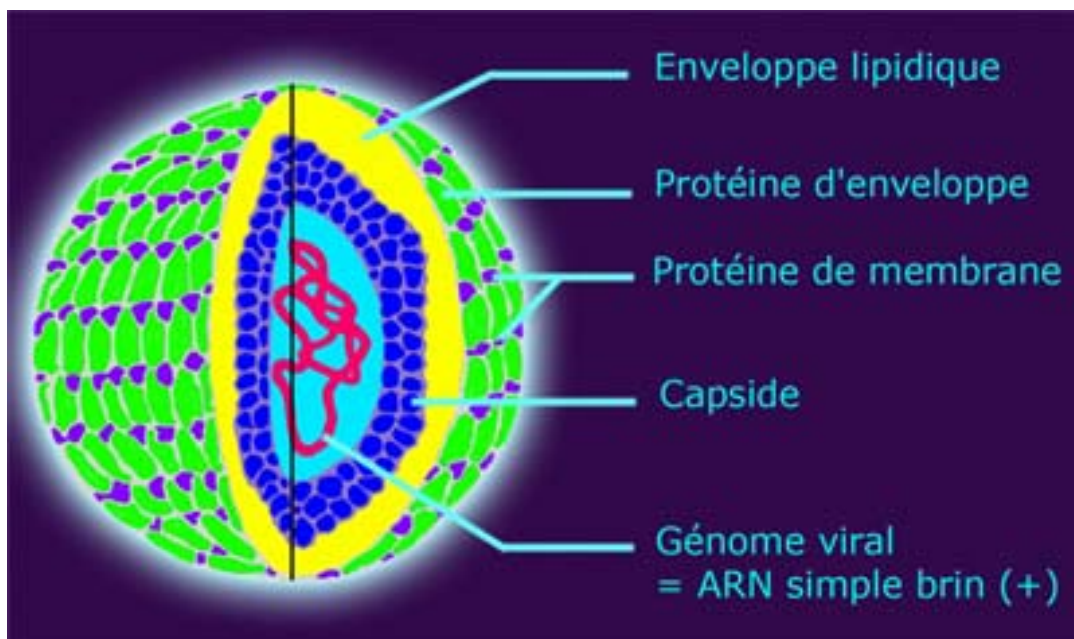


Figure 14. Représentation schématique de structure du virus de la dengue

C'est un virus à ARN monocaténaire, linéaire, non-segmenté, de polarité positive de taille d'environ 11 kilobases (kb). Cet ARN génomique possède une coiffe de type I (m7GpppA) à son extrémité 5' et n'a pas de queue poly (A) à son extrémité 3' (Brinton & Disposito, 1988). Il présente

une seule phase ouverte de lecture, laquelle code pour une polyprotéine unique (Deubel et *al.*, 1988). Le précurseur polyprotéique est clivé, co- et post-traductionnellement, par des protéases virales et cellulaires (Markoff, 1994; Nowak et *al.*, 1994; Cahour et *al.*, 1995). Ce clivage donne naissance à trois protéines structurales (C, prM, E) et sept protéines non-structurales (NS1, NS2a et b, NS3, NS4a et b, NS5) (Chambers et *al.*, 1990) (Figure 15).



Figure 15. Représentation schématique de l'organisation génomique du virus de la dengue

Comme la plupart des virus à ARN, le génome du virus de la dengue est en constante variation. Cette variation est due en grande partie à l'ARN polymérase qui ne possède pas de mécanisme de correction d'erreur durant la réplication de l'ARN. Les taux de mutation peuvent augmenter du fait des agents de recombinaisons génétiques et d'agents mutagènes exogènes.

c- Epidémiologie: Emergences et réémergences dans le Monde

Actuellement, la dengue est l'arbovirose la plus répandue et qui connaît l'extension la plus rapide dans le monde. L'OMS estime que chaque année, entre 50 et 100 millions de personnes sont infectées (WHO/<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>). De plus, près de 40% de la population mondiale, soit plus de 2,8 milliards de personnes sont désormais exposées au risque de contracter la maladie. Désormais, la dengue est endémique dans plus de cent pays d'Afrique, des Amériques (y compris la zone Caraïbe), de la Méditerranée orientale, de l'Asie du Sud-Est et du Pacifique occidental (WHO/<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>). En 2005, l'OMS a estimé environ 500 000 personnes hospitalisées du fait de la dengue sévère avec une large proportion d'enfants (OMS, 2005).

Plusieurs facteurs semblent être à l'origine de la résurgence de la dengue classique et de l'émergence de la dengue hémorragique, dans le monde (Gubler, 1997, 1998b).

- **Présence de différents génotypes de DENV.** Le génotype V, génotype américain, a été le premier sérotype du DENV2 identifié (Guzman et al., 1998 ; Halstead, 2006), il pourrait avoir été impliqué dans les épidémies qui ont sévi dans la région depuis le 19^{ème} siècle et aurait résisté aux efforts d'éradication entrepris dans les années 50 et basés sur une lutte antivectorielle intensive (Gubler, 1998 ; Troyo et al. 2006). En revanche, le virus DENV3, génotype V, identifié en 1963 à la Jamaïque ainsi que le virus DEN 1, génotype III, isolé en 1977 sont d'origine asiatique (Rico-Hesse, 1990 ; Halstead, 2006). En 1994, le génotype III du virus DENV3, originaire du sous-continent Indien, a été identifié pour la première fois en Amérique Centrale (Morrison AC et al., 1998). En 1981, deux nouveaux virus ont été connus: un virus DENV4 de génotype I et un virus DENV 2 de nouveau génotype, le génotype III, d'origine asiatique (Rico-Hesse, 1990 ; Halstead, 2006).

- **La pathogénicité de certaines souches de DENV.** Certains sérotypes de DENV montrent une pathogénicité plus élevée. En effet, le sérotype DENV2, génotype III souche d'origine asiatique, impliquée la première épidémie de dengue hémorragique dans la région de Cuba en 1981, serait liée à une augmentation de virulence de l'épidémie de 1988 (Kouri GP et al., 1989). Ce même sérotype DENV2, d'origine asiatique a été observé en circulation prédominante au Brésil, au cours des épidémies 1990-1991 et 1998, provoquant une augmentation significative des formes cliniques sévères (Nogueira et al., 2007). La pathogénicité particulière du sérotype DENV 3, originaire du sous-continent indien a également été notée au Brésil entre 2000 et 2003. Ce génotype serait capable de «déloger» les autres sérotypes lors de son introduction dans un nouveau territoire et montrerait une forte capacité d'infection à la fois chez l'homme et chez le vecteur (Nogueira et al., 2007). En revanche, le sérotype DENV4, détecté dans la zone Caraïbe en 1981 a été plutôt associé à des formes cliniques modérées (Guzman et al., 2003).

- **La co-circulation des sérotypes et la gravité de l'expression clinique.** La co-circulation des différents sérotypes de DENV, bien plus que la virulence potentielle des souches virales, est un facteur déterminant pour l'apparition des formes cliniques graves de la dengue (Kouri GP et al., 1989 ; Guzman et al., 1998, 2003 ; Hammond et al., 2005 ; Troyo et al. 2006 ; Nogueira et al., 2007). Ce phénomène pourrait se produire quelle que soit la durée séparant les contacts avec les deux sérotypes différents, comme l'a montré l'analyse des épidémies de dengue à Cuba (Guzman et al., 1998). En revanche le rôle possible de la séquence des

contacts (ordre de contact avec les différentes souches) reste encore mal élucidé (Morrison AC et al., 1998).

d- Pathogenèse

L'infection par le virus de la dengue présente plusieurs formes cliniques. Souvent bénigne, sa gravité varie selon les individus, allant des formes asymptomatiques (infection sans aucun symptôme) ou pauci-symptomatiques (formes atténuées, avec des symptômes très discrets : fièvre, maux de tête, nausées, vomissements, douleurs articulaires et musculaires, éruptions cutanées) aux formes sévères (formes hémorragiques ou avec syndrome de choc) pouvant aboutir à la mort (George, R. & Lam, S.K, 1997) (Figure 16).

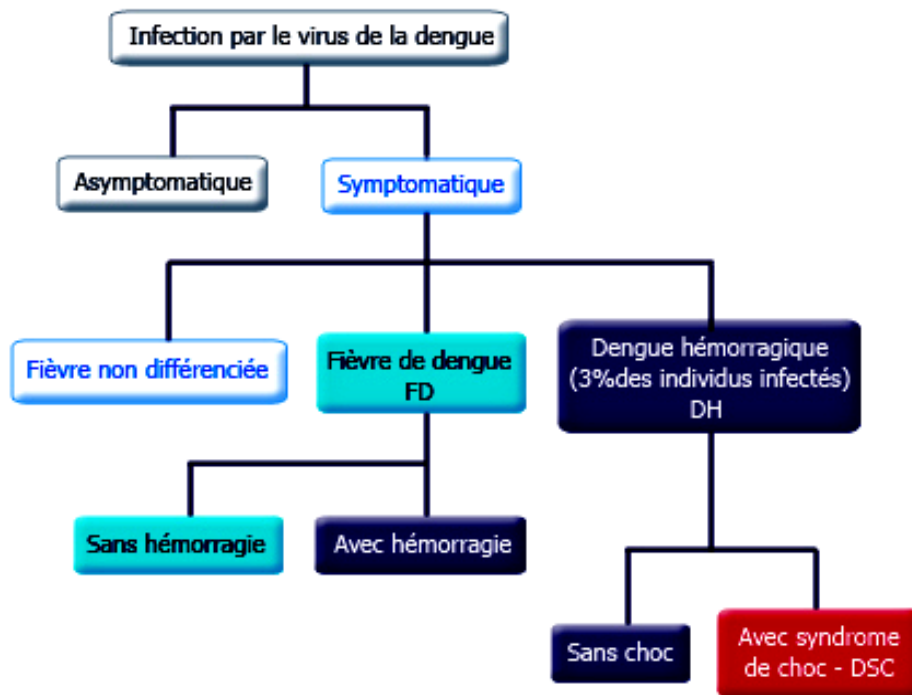


Figure 16. Manifestations cliniques de la dengue. Adapté de George, R. & Lam, S.K (1997)

L'OMS, en 1997, distingue dans sa classification de la dengue plusieurs aspects cliniques (WHO, 1997) : Les formes asymptomatiques et les formes symptomatiques ; cette dernière se subdivise encore en fièvre indifférenciée, en dengue classique (DF : «Dengue Fever») sans hémorragie ou avec hémorragie inhabituelle et en dengue hémorragique (DHF : «Dengue Haemorrhagic Fever») sans syndrome de choc ou avec syndrome de choc (DSS : «Dengue Shock Syndrome»). Mais cette

classification de l'OMS de 1997 se retrouve par la suite remise en cause au fur et à mesure que la connaissance de la maladie évolue (Bandyopadhyay et al., 2006). Ainsi en 2005, l'OMS écrit que dans le contexte de la prise en charge clinique en pédiatrie, la classification s'avère inappropriée pour les quatre raisons citées ci-après (*Dengue in the context of the IMCI*, OMS, 2005) :

- Il existe un chevauchement entre les formes «dengue classique» et «dengue hémorragique». Il n'y a aucune preuve que les formes DF et DH/DSS soient des entités cliniques réellement distinctes plutôt que des manifestations variées d'une même maladie. On retrouve notamment thrombocytopénie et hémorragie dans les formes «dengue classique» tout comme dans les formes «dengue hémorragique».
- Les quatre critères nécessaires à la définition de l'OMS d'un cas de dengue hémorragique (fièvre, thrombopénie, hémorragie et signes de fuite plasmatique) sont difficiles à renseigner. Ainsi la détection précoce d'une thrombopénie et d'une fuite plasmatique nécessite des examens biologiques souvent non disponibles dans les centres de soins primaires des pays pauvres où la dengue est endémique. De plus les manifestations hémorragiques ne sont pas toujours présentes dans la dengue sévère, notamment lors de la phase précoce.
- Le terme «dengue hémorragique» met trop l'accent sur l'hémorragie alors que la grande différence entre une dengue sévère et une dengue classique n'est pas l'hémorragie mais l'augmentation de la perméabilité vasculaire entraînant une fuite de plasma. Ainsi la présence d'hémorragie se voit indifféremment dans les cas de dengue simple ou sévère. Et lorsque l'hémorragie elle-même met en jeu le pronostic vital, c'est presque toujours tardivement et de façon associée à un syndrome de choc dû à la fuite plasmatique.
- La classification est trop complexe pour une utilisation pratique, notamment chez les enfants.

Ainsi, l'OMS propose alors une nouvelle classification, simplifiée et ne mettant plus l'accent sur la présence d'hémorragie ou le décompte des plaquettes (*Dengue in the context of the IMCI*, OMS, 2005). Dans cette classification, c'est la perméabilité vasculaire, responsable d'une fuite plasmatique, qui devient le critère principal d'une dengue sévère. Les signes précoces de fuite de plasma sont l'hémoconcentration, les épanchements pleuraux et les ascites. Les signes de gravité d'une dengue sévère sont les signes de chocs circulatoires (froideur des extrémités, pouls radial faible, lenteur à la revascularisation capillaire), une altération de l'état de conscience, des

hémorragies des muqueuses (hématémèse, méléna, saignements du nez ou des gencives) et des manifestations inhabituelles telles que les lésions hépatiques importantes, la cardiomyopathie, l'encéphalopathie et l'encéphalite (*Dengue in the context of the IMCI*, OMS, 2005).

- **Forme de manifestation de la dengue classique.** La dengue classique se manifeste brutalement en général après 5 à 7 jours d'incubation. Une forte fièvre accompagnée de maux de tête, de douleurs rétro-orbitales, de nausées, de vomissements, d'arthralgies, de myalgies et d'un rash cutané en sont les signes cliniques. Souffrant souvent d'anorexie et d'un léger mal de gorge, la température du malade peut atteindre 40°C et la fièvre dure 2 à 7 jours. Une brève rémission peut être observée au bout de 3 jours, puis les symptômes s'intensifient (des hémorragies conjonctivales, des épistaxies ou des ecchymoses pouvant survenir) avant de régresser rapidement. A la fin de la phase fébrile, des pétéchies peuvent apparaître. Les données de laboratoires associées à la dengue classique sont une neutropénie, suivie d'une lymphopénie souvent marquée par la présence de lymphocytes atypiques. Le taux plasmatique de certaines enzymes hépatiques (alanine et aspartate aminotransférases) est élevé. Une thrombopénie est fréquente avec un taux de plaquettes inférieur à 100 000/mm³.

- **Forme de manifestation de la dengue hémorragique et la dengue avec syndrome de choc.** Apparue à Manille (Philippines) en 1954 et 1956 pour la première fois (Hammon et *al.*, 1960b), puis à Bangkok (Thaïlande), en 1958, la dengue hémorragique devenait l'une des premières causes d'hospitalisation et de décès chez les enfants d'Asie du Sud-Est (OMS, 1986). Plus fréquemment observée chez les enfants de moins de 15 ans, bien qu'elle puisse également concerner les adultes, la dengue hémorragique se différencie peu de la dengue classique lors de la phase aiguë de la maladie. Par contre, des manifestations cliniques caractéristiques de la fuite plasmatique apparaissent au moment de la défervescence de la fièvre. Des hémorragies cutanées sont les manifestations les plus courantes de la DH (pétéchies, purpura, ecchymoses). Les pétéchies sont largement distribuées, elles apparaissent surtout sur les extrémités, mais également sur le tronc, et sur le visage des patients en état de choc (DSC). Des hémorragies gastro-intestinales peuvent survenir dans les cas de DH sévère et précèdent très souvent l'apparition du syndrome de choc.

La survenue d'une DH sévère ou du choc hypovolémique se caractérise par une détérioration brutale de l'état général du patient, légèrement avant ou peu après la défervescence de la fièvre. Des douleurs abdominales aiguës surviennent fréquemment juste avant le choc. Le patient souffre d'hypothermie, la peau devient moite, le pouls est rapide et presque imperceptible, traduisant une

défaillance circulatoire. Le patient en état de choc est souvent somnolent puis agité, présente des pétéchies sur le visage, ainsi qu'une cyanose péri-orale. En l'absence de prise en charge médicale adaptée (perfusion de solution saline ou de plasma), le patient peut décéder dans les 8 à 24 heures après l'entrée en état de choc. Comme pour la dengue classique, une leucopénie est souvent observée. La thrombopénie est systématique, avec un taux de plaquettes inférieur à 100 000/mm³ entre 3 à 8 jours de maladie. L'hémoconcentration, traduisant une fuite plasmatique, est observée chez les cas de DH et est encore plus marquée chez les cas de DSC.

3. Le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (VFVR)

a- Historique

Décrit pour la première fois en 1913, puis caractérisé et identifié en 1931 suite à une épizootie ovine qui a eu lieu au Nord du lac Naivasha dans la partie kenyane de la vallée du Rift, le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (VFVR) provoqua la mort de 3500 agneaux et 1200 brebis (Daubney et al., 1931). Décrit comme un agent abortif, responsable d'hépatite chez les ovins bovins et caprins en premier temps, le VFVR s'est révélé capable d'infecter, en plus des animaux domestiques, une grande variété d'espèces sauvages tels les rongeurs, les mangoustes, les singes... (Erasmus et al., 1981). Les recherches effectuées, durant cette épidémie, ont permis de déterminer que les animaux laissés à l'extérieur pendant la nuit étaient affectés par la maladie contrairement à ceux protégés par une moustiquaire. De plus, la contamination pouvait se faire par contact avec du sang, du plasma ou des organes, dont le foie, provenant d'animaux infecté. Le virus fut classé parmi les infections virales transmises par un arthropode, ou arbovirus, en 1948 après la démonstration par Smithburn qu'il a été transmis par piqûre de moustiques (Smithburn, 1948). Responsable de nombreuses épizooties limitées aux bétails, la maladie était considérée comme peu dangereuse pour l'homme. Cependant, le VFVR fut ensuite isolé pour la première fois dans le sang de cinq personnes ayant assisté à l'autopsie d'un animal malade, lors d'une épizootie en Afrique du Sud en 1951. On observa également les premières complications cliniques, oculaires et neurologiques. Des enquêtes séro-épidémiologiques rétrospectives furent entreprises par suite à cette découverte. Le résultat montrait la présence d'anticorps chez de nombreux habitants où sévissaient les épizooties (Laughlin *et al.*, 1979). Cependant, les premiers décès furent observés seulement en 1975 en Afrique du Sud où quatre patients succombèrent à une encéphalite associée à une fièvre hémorragique aigüe au cours de la plus importante épidémie que connut le pays (Van Velden *et al.*,

1977 ; Swanepoel *et al.*, 1979). En 1977, l’Egypte fut le premier pays à être atteint par la FVR en dehors des régions sub-sahariennes. Cette épidémie toucha, selon les estimations, entre 20 000 et 100 000 personnes dont 18 000 cas cliniques (Walsh, 1988) et fit plus de 600 morts (Meegan *et al.*, 1979). Elle engendra également une très forte mortalité et des avortements dans les troupeaux de bovins et de caprins.

Depuis 1977, les épidémies se sont succédées dans toute l’Afrique : (1) en Egypte, en 1993, avec 41 cas de lésions rétinienne et un mort (Arthur *et al.*, 1993) ; (2) à Madagascar en 1979, 1990 et 1991, les épidémies n’entraînèrent que des avortements dans les cheptels sans atteindre l’homme (Morvan *et al.*, 1992 ; Morrill *et al.*, 1996) ; (3) en 1997, au Nord-Est du Kenya, une épidémie causa 89 000 cas humains avec 400 décès et se propagea jusqu’à la Somalie et la Tanzanie (Anonymous, 1998) ; (4) en 1987, une épidémie toucha, pour la première fois, la Mauritanie provoquant 1264 cas dont 224 mortels (Digoutte *et al.*, 1989). Il est intéressant de noter que depuis 1974, la circulation du VFVR avait été démontrée au sud du Sénégal par l’isolement du virus d’un pool de moustiques *Aedes dalzieli* (Meegan *et al.*, 1983), et en Mauritanie par des études sérologiques (Saluzzo *et al.*, 1987 ; thèse de Moutailler, 2007).

b- Le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (VFVR)

Le VFVR est un virus appartenant à la famille des *Bunyaviridae*, au genre *Phlebovirus*. Comme tous les virus de la famille des *Bunyaviridae*, le VFVR est un virus monocaténaire à ARN tri-segmenté, composé de trois ARN simple brin de polarité négatif ou ambisense L (Large), M (Medium) et S (Small). Les segments L et M sont de polarités négatives. L code pour l’ARN polymérase ARN dépendante (Protéine L) et M pour le précurseur des glycoprotéines d’enveloppe (GN et GC). Le clivage post-traductionnel du précurseur génère également une protéine non structurale (NSm) qui n’est pas essentielle pour le déroulement du cycle viral (Won *et al.*, 2006 ; Gerrard *et al.*, 2007). Le segment S utilise la stratégie de codage ambisense (en partie négative et en partie positive). Il code aussi pour la nucléoprotéine N en polarité anti-sens et pour la protéine non-structurale NSs (responsable de facteur de virulence du VFVR), en polarité sens (Giorgi *et al.*, 1991). L’ensemble du cycle se déroule dans le cytoplasme, caractéristique de tous les virus de la famille des *Bunyaviridae*, même si la protéine NSs forme des filaments dans le noyau des cellules infectées par le VFVR (Swanepoel *et al.*, 1979). Le virus fait preuve d’une grande variabilité aussi bien dans son mode de transmission que dans ses choix de vecteurs, mais aussi dans la gravité de ses symptômes. Il semble

donc qu'il ne soit pas encore bien adapté à son environnement, ni à ses hôtes vertébrés et invertébrés.

c- Épidémiologie: Emergences et réémergences dans le Monde

Désormais, la FVR est pratiquement présente sur l'ensemble du continent Africain, à l'exception des pays du Magreb (Maroc, Algérie, Tunisie et Lybie) (Pepin, 2011 in press). Sa présence dans tous les autres pays se retrouve soit lors d'enquêtes sérologiques, soit lors d'importantes épizooties/épidémies. Quittant la première fois le continent Africain pour provoquer une importante épizootie/épidémie en Arabie Saoudite et Yémen dans la péninsule arabique, la FVR engendrait respectivement 884 et 1087 cas humains dont 124 et 121 mortels (Balkhy et al., 2003). De Décembre 2006 à Mai 2007, une épidémie de FVR a touché l'Afrique de l'Est, se propageant du Kenya à la Tanzanie. On y a dénombré, respectivement, 684 et 264 cas dont 155 et 109 mortels (Bulletin PROMED, OMS, juin 2007). Enfin, dernièrement, Madagascar a eu sa part d'épidémie en 2008-2009 (OMS, 2008 ; Andriamandimby et al., 2010 ; Rakotoarivelo et al., 2011) avec 700 cas suspects humains dont 26 mortels (Andriamandimby et al., 2010 ; Carroll et al., 2011 in press) et très récemment l'archipel des Comores et l'île française de Mayotte ont également connu des épisodes de circulation virale (Sissoko et al., 2009 a, b). La figure 17 permet de voir l'aire de répartition de la FVR dans le monde.

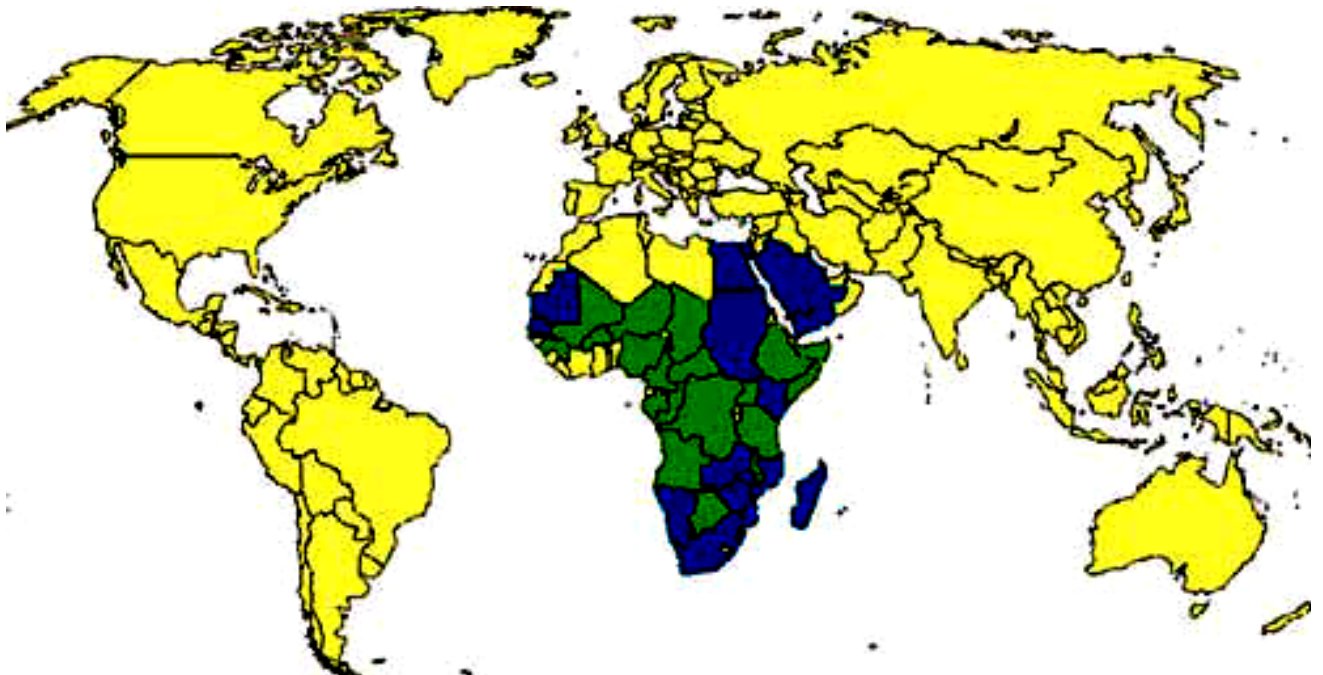


Figure 17. Répartition de la FVR : en bleu, les pays ayant eu des épisodes épidémiques ou ayant une circulation endémique du virus ; en vert, les pays où le virus a été isolé sans épidémie (2007).

(CDC : <http://www.cdc.gov/ncidod/dvrd/spb/mnpages/dispages/rvfmap.htm>)

d- Pathogenèse

Chez l'homme, l'incubation de la fièvre de la vallée du Rift varie de 2 à 6 jours. Elle est ensuite suivie d'un syndrome «dengue-like», caractérisé par une fièvre brutale, de céphalées, de myalgies et de rachialgies. Une photophobie et une raideur dans la nuque font penser à une méningite. La maladie évolue en 4 à 7 jours vers une guérison sans séquelles, mais la convalescence peut durer 2 à 3 semaines. Cette forme dite bénigne représente plus de 95% des cas symptomatiques.

Deux formes de maladies peuvent être rencontrées. Des formes asymptomatiques, assez fréquentes représentant un cas sur deux et des formes symptomatiques graves, qui représentent 3 à 4% des cas. Les formes graves se manifestent sous la forme d'un ou plusieurs syndromes : atteintes oculaires, méningo-encéphalite, fièvre hémorragique. L'atteinte oculaire apparaît en général entre une à trois semaines après les premiers signes cliniques. Les lésions siègent au niveau de la rétine et peuvent entraîner une baisse permanente de l'acuité visuelle, voire une cécité. La méningo-encéphalite apparaît une à trois semaines après les premiers symptômes. Des séquelles

sont possibles, notamment un type de paralysie et de détérioration mentale. La FVR peut être la cause d'une fièvre hémorragique. Deux à quatre jours après le début de la maladie, le patient présente une hépatite avec ictère et syndrome hémorragique: vomissements de sang, méléna, purpura, gingivorragies. Elle peut être précoce dès le 2^{ème} jour. Elle ne s'observe que dans 1% des cas. La mortalité des formes hémorragiques serait d'environ 5% (Morrill & McClain, 1996 ; Al-Hazmi *et al.*, 2003 ; Borio *et al.*, 2002 ; Madaniet *al.*, 2003). L'infection du VFVR atteint principalement le foie, provoquant des nécroses et une destruction des hépatocytes. Il peut également provoquer une leucopénie accompagnée d'une augmentation des enzymes sériques, de lésions sévères du foie et d'une thrombocytopénie. Le syndrome hémorragique se caractérise par des lésions vasculaires et des nécroses hépatiques (Geisbert & Jahrling, 2004). Les lésions sévères du foie réduisent la production de protéines de coagulation et affectent le flux sanguin. Dans les cas sévères, on note un défaut de coagulation intra-vasculaire avec un allongement du temps de saignement, du temps d'activation de la prothrombine et de la thromboplastine, une accumulation des produits de dégradation de la fibrine, et une chute de fibrinogène (Lacy & Smego, 1996).

Chez les animaux, souvent décrite comme une hépatite épizootique avec nécrose massive, la maladie présente une grande diversité de symptômes. Elle touche principalement les ovins et les caprins. Le VFVR est transporté du site d'inoculation aux ganglions lymphatiques *via* le système lymphatique (Swanepoel & Coetzer, 1994 ; Gerdes, 2004). Les ganglions lymphatiques sont les sites de réplication du virus, puis la dissémination se fait *via* la circulation sanguine, produisant une virémie primaire et l'infection des organes cibles. Comme chez l'homme, les sites majeurs de réplication virale sont le foie, la rate et le cerveau.

Le virus peut être isolé de prélèvement d'organes viscéraux, du cerveau et souvent du placenta d'un fœtus avorté. Le fluide sanguin trouvé dans la cavité thoracique des avortons, spécialement dans le cas des avortements tardifs, contient du virus à un titre de $10^{10,1}$ MIPLD₅₀ (mouse intraperitoneal 50% lethal dose)/ml (Easterday *et al.*, 1962).

4. Les vecteurs des trois arbovirus étudiés

Il est très important de différencier un vecteur naturel d'un vecteur expérimental. Un vecteur expérimental ayant démontré une compétence vectorielle en laboratoire, ne signifie pas que sa capacité vectorielle en milieu naturel soit forcément effective. Un vecteur naturel, par contre, est le vecteur responsable de la transmission de l'agent pathogène dans les conditions naturelles du

terrain. Tous les arthropodes trouvés naturellement infectés dans la nature ne sont pas forcément des vecteurs compétents.

a- Les vecteurs majeurs de la dengue et du chikungunya

Les virus du chikungunya (CHIKV) et de la dengue (DENV) sont des arbovirus dont la transmission est assurée par les moustiques du genre *Aedes*, principalement *Aedes aegypti* (Graham, 1903; Bancroft, 1906; Cleland, 1918). Cependant *Aedes albopictus*, peut s'avérer un redoutable vecteur (Reiteret *al.*, 2006). Créé par Meigen en 1818, le genre *Aedes* renferme environ 800 espèces répertoriées, avec plus de 750 espèces et sous-espèces réparties en 43 sous-genres (Mosquitoes classification 2010, www.mosquitocatalog.org). *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*, deux espèces appartenant au sous-genre *Stegomyia*, sont parmi les espèces anthropophiles, vectrices d'arboviroses et d'autres maladies humaines. Ce sont des moustiques de couleurs sombres, avec des marques blanches notamment visibles sur leurs pattes qui leur ont valu le nom de «moustique tigré».

Aedes aegypti, d'origine africaine, aurait été introduite dans le Nouveau Monde, dès le début du XVII^{ème} siècle, avec la traite des esclaves. Deux formes ont été recensées en Afrique, *Aedes aegypti formosus* et *Aedes aegypti aegypti*. *Aedes aegypti formosus*, de forme «noire» ancestrale semble restreinte aux zones forestières (Vazeille *et al.*, 2001 ; Failloux *et al.*, 2002 ; Mousson *et al.*, 2005). Il a été suggéré qu'en migrant du centre vers les régions du Nord de l'Afrique, la forme *Ae. aegypti formosus* aurait évolué puis se serait «différenciée» en *Aedes aegypti aegypti* au contact de l'homme (Failloux *et al.*, 2002). *Aedes aegypti aegypti*, dite espèce domestique, de forme «colorée» s'est alors adaptée aux environnements urbanisés. Elle se serait ainsi, peu à peu, installée dans la plupart des grandes villes tropicales d'Afrique et d'Amérique, jusqu'à la fin du XVII^{ème} siècle. En Asie et dans la zone Pacifique, *Aedes aegypti* ne s'est établie de façon prononcée qu'à partir du milieu du XX^{ème} siècle, au cours et à l'issue de la seconde guerre mondiale. Les perturbations écologiques et les mouvements de populations humaines (civiles et militaires), liés à la guerre, ont généré des conditions particulièrement favorables à l'expansion géographique et l'accroissement des populations d'*Aedes aegypti* dans ces régions. Tous ces événements ont largement contribué à l'émergence d'une pandémie de dengue (Halstead, 1980, 1992; Gubler & Trent, 1994).

Aedes albopictus, originaire d'Asie du Sud-Est (Smith, 1956), possède une forte capacité d'adaptation à différents environnements (Hawley, 1988) et ne présente pas de spécialisation écologique. De ce fait, il est couramment présent dans les zones forestières, rurales et périurbaines. La femelle peut pondre dans des gîtes naturels comme les bambous, trous d'arbres, coquillages ou

noix de coco, ainsi que dans des gîtes anthropisés tels que les containers, pneus ou boîtes de conserve laissés à l'abandon (Delatte *et al.*, 2008 ; Bagny *et al.*, 2009a ; Paupy *et al.*, 2009 ; Raharimalala *et al.*, en cours). De plus, la résistance à la dessiccation des œufs d'*Aedes albopictus* a fortement contribué à l'invasion progressive et durable dans les continents de climat plus tempéré (Reiter et Sprenger 1987 ; Hawley *et al.*, 1987). Il a été détecté pour la première fois en Afrique (Nigeria) en 1991 (Savage *et al.*, 1992), en Amérique du Sud (Brésil) en 1986 (Forattini, 1986), aux Etats-Unis (Tennessee) en 1983 (Reiter et Darsie, 1984). Pour ce qui est de l'Europe, sa présence a été signalée de façon progressive dans différents pays, en Albanie en 1979 (Adhami et Reiter, 1998), en Italie en 1991 (Dalla Pozza et Marjori, 1992), en France en 1999 (Schaffner et Karch, 2000), en Belgique en 2000 (Schaffner *et al.*, 2004), en Suisse en 2003 (Wymann *et al.*, 2008), en Croatie en 2004 (Klobucaret *et al.*, 2006), en Espagne en 2004 (Aranda *et al.*, 2006), et aux Pays-Bas en 2005 (Scholte *et al.*, 2008 ; Takumi *et al.*, 2009).

Des expériences d'infection orale ont permis de démontrer qu'*Aedes albopictus* présente une plus faible réceptivité orale au virus de la dengue qu'*Aedes aegypti* (Ton Nu *et al.*, 2001; Vazeille-Falcoz *et al.*, 2003). Cependant, l'expérience faite a encore permis de démontrer que la transmission sexuelle et verticale du virus de la dengue est plus efficace chez *Aedes albopictus* que chez *Aedes aegypti* (Rosen *et al.*, 1983; Rosen, 1987; Shroyer, 1990), celui-ci assurerait le maintien du virus durant les périodes inter-épidémiques. *Aedes albopictus* a été aussi identifié comme vecteur principal des épidémies successives de CHIKV qui ont sévi dans les îles de l'Océan Indien.

Les deux espèces ont une large répartition mondiale. La figure 18 montre une carte représentant la présence des deux espèces dans le monde (Chevillon *et al.*, 2008).

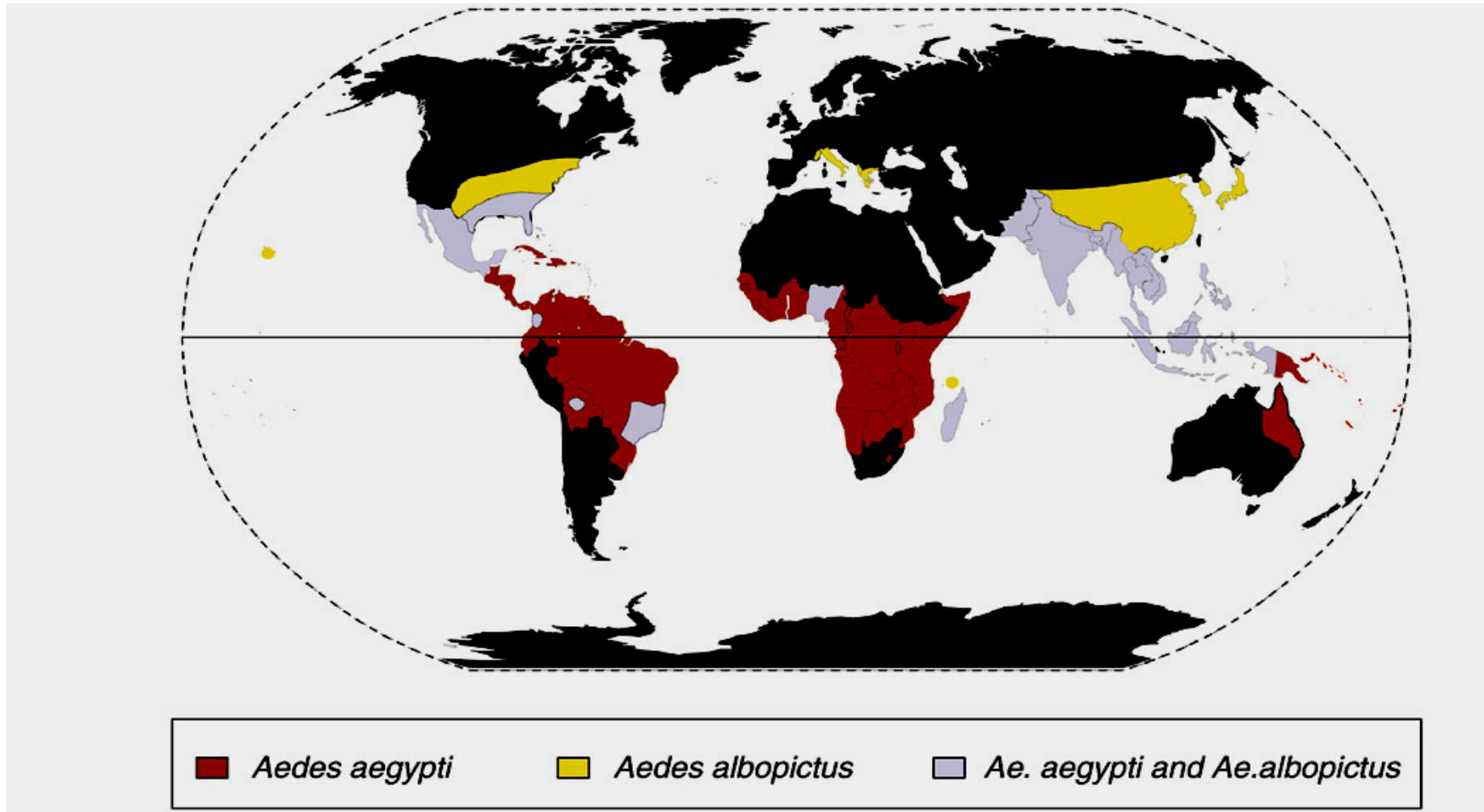


Figure 18. Distribution géographique d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* dans le monde (Chevillon *et al.*, 2008)

Dans la majorité des îles de l’Océan Indien, *Aedes albopictus* est considéré comme le vecteur principal de la dengue et du chikungunya. C’est l’espèce dominante à La Réunion (Delatte *et al.*, 2008 ; Bagnyet *al.*, 2009b) ; aux Seychelles, à l’île Maurice, à l’île Rodrigues et dans l’est de Madagascar (Figure 19).

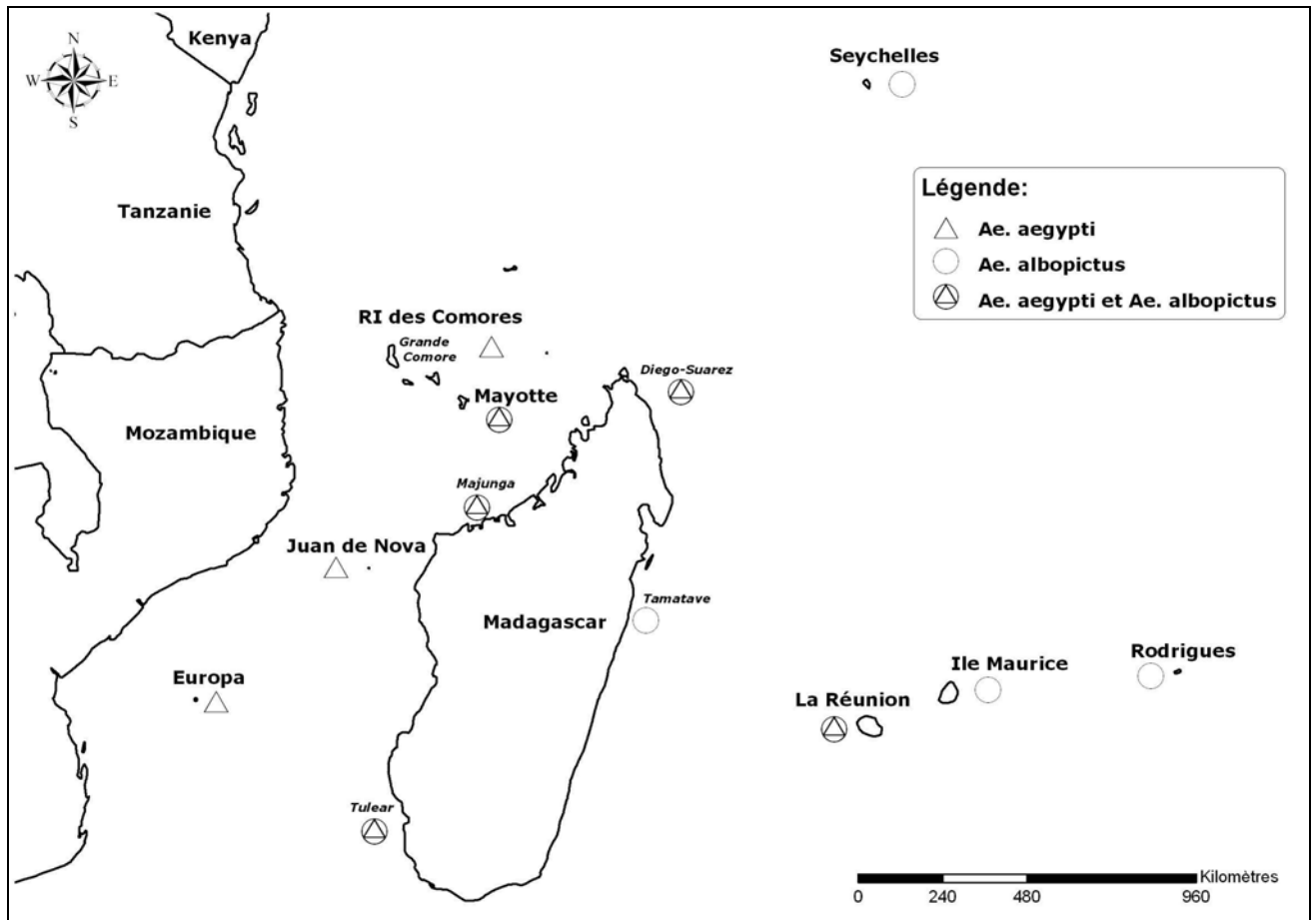


Figure 19. Répartition d’*Aedes albopictus* et d’*Aedes aegypti* dans la zone du sud-ouest de l’Océan Indien (Delatte *et al.*, 2008).

b- Les vecteurs du VFVR

De nombreuses espèces de moustiques sont des vecteurs efficaces de VFVR, notamment les espèces des genres *Culex*, *Aedes*, *Anopheles*, *Eretmapodites* et *Mansonia*. Il a été démontré que plus de 40 espèces de moustiques sont compétentes pour véhiculer le VFVR (Moutailler, 2008). D’autres insectes piqueurs peuvent transmettre le virus mécaniquement. Les moustiques s’infectent en prenant leur repas sanguin sur des hôtes virémiques. Les animaux sont contagieux pendant leur

période virémique, qui peut être brève (6 à 18 heures) ou persister jusqu'à six à huit jours. Il n'y a pas d'état de porteur chez les animaux. La transmission qui ne s'effectue pas par un vecteur n'est pas significative chez les animaux. Les humains peuvent être infectés par des piqûres de moustique mais on pense que la majorité des cas humains résultent de la manipulation de sang, de tissus, de sécrétions ou d'excrétions d'animaux infectés, notamment après un avortement. Cela peut se produire lors de la traite, de l'abattage, de la préparation pour la boucherie ou de l'autopsie de ces animaux.

Le genre *Aedes* est souvent considéré comme vecteurs enzootiques dans le cycle de transmission du VFVR. Leur capacité à transmettre le virus à leur descendant (transmission verticale) permet le maintien du virus dans la nature au cours des saisons sèches. Ces espèces enzootiques seraient à l'origine des épizooties alors que d'autres espèces, certainement du genre *Culex*, joueraient le rôle d'amplificateur de l'épizootie voire de l'épidémie (Figure 20) (Zeller, 1997).

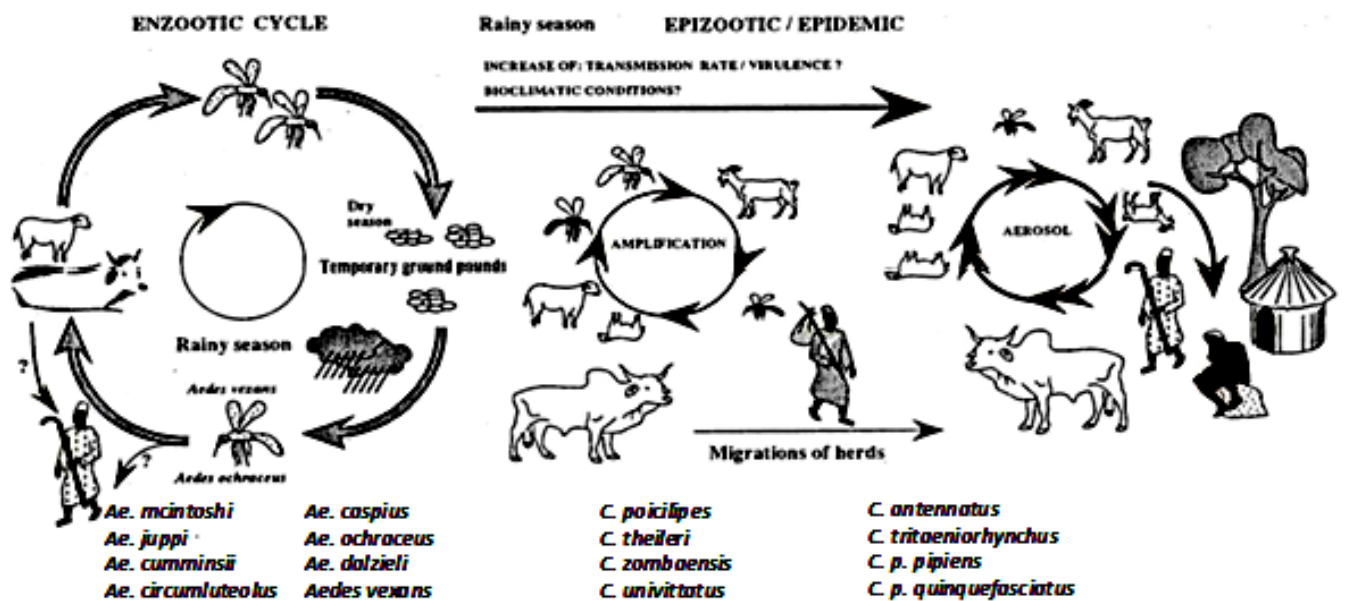


Figure 20. Cycle naturel du VFVR par Zeller (1997).

Le virus circule entre les hôtes vertébrés et les moustiques. Il ne requiert pas de cycles continus vecteur-hôte-vecteur pour se maintenir. Le maintien interépizootique existe par transmission verticale du virus par les œufs d'*Aedes* spp. du groupe *Neomelaniconium*. Ce sont des espèces de moustiques se reproduisant dans les zones inondées dont les œufs peuvent rester en dormance

dans les plaines d'inondation ou dans un habitat de prairie pendant de longues périodes. Les moustiques infectés peuvent être transportés sur de longues distances par des vents ou des courants d'air de basse altitude, ce qui peut conduire à une propagation rapide du virus de région à région ou même internationalement. Cela peut avoir été un facteur dans l'expansion vers l'Égypte en 1977 et 1993. Le tableau 4 représente les différents moustiques trouvés naturellement infectés par le VFRV.

Des infections en laboratoire se vérifient également. Il est désormais démontré que des moustiques présents, parfois parmi les populations de moustiques les plus nombreuses, dans des pays autour du bassin méditerranéen (Tunisie et France), sont pleinement compétents pour transmettre le virus de la FVR, même si leur niveau de compétence exprimé en pourcentage de femelles infectées reste plus faible que celui des mêmes espèces du continent africain. C'est le cas de moustiques du genre *Culex* (*C. pipiens*) ou du genre *Aedes* (*Ae. caspius*, *Ae. detritus*, *A. albopictus*) (Moutailler, 2008 ; Pepin, 2011). De même que si l'on trouve des moustiques naturellement infectés, ils ne participent pas forcément dans le cycle de transmission du virus.

Tableau 4. Différentes espèces d'arthropodes trouvées naturellement infectées par le VFVR (Moutailler, 2007).

| Espèces | Lieu, date | Référence |
|--------------------------------------|-----------------------|---|
| Genre Aedes | | |
| <i>Aedes africanus</i> | Ouganda, 1956 | (Weinbren <i>et al.</i> , 1957) |
| <i>Aedes caballus</i> | Afrique du Sud, 1953 | (Gear <i>et al.</i> , 1955) |
| <i>Aedes circumluteolus</i> | Ouganda, 1955 | (Weinbren <i>et al.</i> , 1957) |
| | Afrique du Sud, 1955 | (McIntosh, 1972) |
| <i>Aedes cumminsii</i> | Sénégal, 1983 | (Saluzzo <i>et al.</i> , 1984) |
| <i>Aedes dalzieli</i> | Sénégal, 1983 | (Meegan <i>et al.</i> , 1983) |
| <i>Aedes dendrophilus</i> | Ouganda, 1948 | (Smithburn <i>et al.</i> , 1948) |
| <i>Aedes dentatus</i> | Zimbabwe, 1969 | (McIntosh, 1972) |
| <i>Aedes juppi</i> | Afrique du Sud, 1974 | (McIntosh <i>et al.</i> , 1978) |
| <i>Aedes lineatopennis</i> | Zimbabwe, 1969 | (McIntosh, 1972) |
| | Afrique du Sud, 1974 | (McIntosh <i>et al.</i> , 1978) |
| <i>Aedes mcitoshi</i> | Afrique du Sud, 1978 | (McIntosh <i>et al.</i> , 1978) |
| <i>Aedes ochraceus</i> | Sénégal, 1993 | (Fontenille <i>et al.</i> , 1998; Fontenille <i>et al.</i> , 1995) |
| | | (Zeller <i>et al.</i> , 1997) |
| <i>Aedes palpalis</i> | RCA, 1969 | (Digoutte <i>et al.</i> , 1974) |
| <i>Aedes tarsalis</i> | Ouganda, 1948 | (Smithburn <i>et al.</i> , 1948) |
| <i>Aedes vexans arabiensis</i> | Sénégal, 1993 | (Fontenille <i>et al.</i> , 1998; Fontenille <i>et al.</i> , 1995)(Zeller <i>et al.</i> , 1997) |
| | Arabie Saoudite, 2000 | (Jupp <i>et al.</i> , 2002) |
| Genre Anopheles | | |
| <i>Anopheles cinereus</i> | Afrique du Sud, 1974 | (McIntosh <i>et al.</i> , 1978) |
| <i>Anopheles coustani</i> | Zimbabwe, 1969 | (McIntosh, 1972) |
| <i>Anopheles sp.</i> | Madagascar, 1979 | (Clerc <i>et al.</i> , 1983) |
| Genre Culex | | |
| <i>Culex neavei</i> | Afrique du Sud, 1981 | (McIntosh <i>et al.</i> , 1983) |
| <i>Culex poicilipes</i> | Mauritanie, 1998-99 | (Diallo <i>et al.</i> , 2005) |
| | Sénégal, 1998 | (Diallo <i>et al.</i> , 2000) |
| <i>Culex pipiens</i> | Egypte, 1977 | (Hoogstraal <i>et al.</i> , 1979) |
| | Mauritanie, 1987 | (Linthicum <i>et al.</i> , 1990) |
| | Kenya, 1991 | (Logan <i>et al.</i> , 1991) |
| <i>Culex theileri</i> | Afrique du Sud, 1953 | (Gear <i>et al.</i> , 1955) |
| | Afrique du Sud, 1970 | (McIntosh, 1972) |
| | Afrique du Sud, 1975 | (McIntosh <i>et al.</i> , 1978) |
| | Zimbabwe, 1969 | (McIntosh, 1972) |
| <i>Culex sp.</i> | Madagascar, 1979 | (Clerc <i>et al.</i> , 1983) |
| <i>Culex zombaensis</i> | Afrique du Sud, 1981 | (McIntosh <i>et al.</i> , 1983) |
| | Kenya, 1989 | (Logan <i>et al.</i> , 1991) |
| Autres | | |
| <i>Coquillettidia fuscopennata</i> | Ouganda, 1960 | (Williams <i>et al.</i> , 1960) |
| <i>Culicoides spp.</i> | Nigeria, 1975 | (Fagbami <i>et al.</i> , 1975) |
| | | (Lee, 1979) |
| | Kenya, X | (Davies & Highton, 1980) |
| <i>Eretmapodites spp</i> | Ouganda, 1948 | (Smithburn <i>et al.</i> , 1948) |
| <i>Eretmapodites quinquevittatus</i> | Afrique du Sud, 1971 | (McIntosh, 1972) |
| <i>Mansonia africana</i> | Ouganda, 1959 | (Williams <i>et al.</i> , 1960) |
| | Ouganda, 1968 | (Henderson <i>et al.</i> , 1972) |
| | Kenya, 1989 | (Logan <i>et al.</i> , 1991) |
| <i>Mansonia uniformis</i> | Ouganda, 1960 | (Woodall, 1964) |
| | Madagascar, 1979 | (Clerc <i>et al.</i> , 1983) |
| <i>Simulium spp</i> | Afrique du Sud, 1953 | (Van Velden <i>et al.</i> , 1977) |

D- Les réservoirs des arbovirus

Les réservoirs d'arbovirus sont les organismes chez lesquels les virus circulent à bas bruits, sans causer des dommages significatifs. Ils servent de maintien de l'agent infectieux, lors des périodes inter-épidémiques et d'amplificateur pendant les périodes d'épidémies. Les réservoirs primaires des arbovirus sont sans aucun doute les moustiques vecteurs. Les recherches des réservoirs secondaires hors épidémie sont sujettes à controverse. Par exemple, différents travaux font état de séropositivité vis à vis de CHIKV, DENV et VFVR (Sidenko et al., 1974 ; Kaschula et al., 1978 ; Wolfe et al., 1998 ; Inoue et al., 2003) chez divers vertébrés comme les singes verts (*Cercopithecus aethiops*), le babouin (*Papio papio*), un primate du Sénégal (*Galago senegalensis*), le moineau doré (*Auripasser luteus*), la chauve souris (*Scotophilus sp*). Par contre, aucun de ces travaux n'apporte des données sur la répllication et la persistance du virus chez ces hôtes, en dehors des épisodes épidémiques. Cependant, il a été établi une périodicité d'épidémie du CHIKV en forêt en liaison avec le renouvellement des populations de singes (au sol et en canopée).

Du fait de la résurgence des arboviroses (CHIK, dengue et FVR en particulier), des recherches sur l'identification de réservoirs potentiels (actifs ou passifs) des arboviroses sont en augmentation dans les régions épidémiques et endémiques. Malgré l'accumulation de nombreuses données au fil des années concernant le maintien et la transmission des arbovirus, des questions demeurent posées. En effet, l'existence d'un cycle enzootique des virus emmène à s'interroger sur le mécanisme de leur diffusion et de leur maintien annuel ou sur plusieurs années. Plusieurs hypothèses sont émises pour expliquer l'existence des réservoirs. (i) Le virus se maintient dans les œufs de moustiques en période défavorable via la transmission verticale de femelle infectée à sa descendance. (ii) Le virus se maintient via des cycles secondaires de transmission à bas bruit impliquant des vertébrés sauvages. Il est généralement admis que les primates et les oiseaux représentent des réservoirs potentiels impliqués dans le cycle de transmission dans les zones selvatiques. Cependant, la transmission verticale, bien que démontrée expérimentalement (Turell et al., 1990) et mise en évidence dans la nature (Linthicum et al., 1985 ; Miller et al., 2000) se produit à des taux habituellement si faibles qu'il paraît difficile de la considérer comme l'unique mécanisme de maintien du virus dans le cycle enzootique. C'est pourquoi d'autres mécanismes de maintien du virus impliquant des hôtes vertébrés sauvages non encore identifiés pouvant jouer le rôle de réservoirs sont soupçonnés (Ba et al., 2006). Une telle hypothèse est étayée par les

infections notées pendant des manifestations de la maladie chez un certain nombre d'animaux domestiques comme les ânes, les chevaux, les chiens, les rongeurs et les chauves-souris et de certains vertébrés sauvages (Gora, Thiongane et al., 2000). Mais la brève durée de la virémie chez les animaux, leur immunité acquise suite à leur première infection et la difficulté de recenser tous les vertébrés qui pourraient intervenir dans le cycle de transmission limite l'exploitation de ces hypothèses alternatives.

DEUXIEME PARTIE

MEMOIRE EXPERIMENTAL

CHAPITRE 1.

BIOGEOGRAPHIE DES MOUSTIQUES VECTEURS D'ARBOVIRUS A MADAGASCAR

Ce chapitre fait l'objet d'une publication soumise à la revue «Parasites and vectors» sous le numéro MS ID: 1615878295591134.

1- Contexte général et objectifs

Aedes albopictus et *Aedes aegypti* sont les moustiques vecteurs majeurs de la plupart des épidémies d'arboviroses tels le chikungunya, la dengue et la fièvre jaune (Reiter *et al.*, 2006 ; Delatte *et al.*, 2007 ; 2008). Leurs aires de distributions ont été étendues dans de nombreuses régions du monde depuis les années 70. Cette extension massive a été facilitée par les transports de conteneurs de marchandises, notamment des pneus (Tatem *et al.*, 2006). Ces dernières années, les îles de l'Océan Indien ont eu des sévères épidémies de chikungunya et de dengue. Ces épidémies ont coïncidé avec une augmentation de la population d'*Ae. albopictus* dans certaines de ces îles. Au début de ma thèse, les données entomologiques sur ces deux espèces à Madagascar étaient anciennes (Ravaonjanahary, 1975 ; Fontenille et Rhodain, 1989). Notre travail avait donc pour premier objectif d'apporter une actualisation des données dans plusieurs régions de Madagascar en réalisant des prospections de gîtes (adultes et larves) et des captures sur deux années. Notre deuxième objectif était de faire une étude phylogénique des espèces dans le but d'apporter la lumière sur l'origine des populations qui ont envahi Madagascar. Et finalement, notre troisième objectif était de caractériser expérimentalement si l'espèce trouvée prévalente peut-être un bon vecteur d'arbovirus.

Nos résultats ont montré que l'espèce *Aedes albopictus* prédomine nettement dans les huit régions étudiées. *Aedes aegypti* devient de plus en plus rare et se retrouve circonscrite dans les zones forestières et humides, ce qui est différent des anciennes données où les deux espèces étaient parfois sympatriques et à densité équivalente. Ce changement serait dû à l'activité humaine qui favoriserait l'établissement de l'espèce *Aedes albopictus* fortement anthropophile et ayant des capacités d'adaptation aux climats contrastés allant de sec au plus humide puis du froid au chaud. A

la lumière de cette étude, *Aedes albopictus* pourrait être le vecteur principal de la récente épidémie de chikungunya et de dengue à Madagascar. Par conséquent, il serait très important de surveiller de près et de pratiquer un contrôle régulier d'*Ae. albopictus*, espèce reconnue comme la plus invasive au monde actuellement.

2- Publication

Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar

Authors: Fara N. RAHARIMALALA^{1,2}, Lala H. RAVAOMANARIVO², Pierre RAVELONANDRO³, Lala S. RAFARASOA², Karima ZOUACHE^{1,4}, Van TRAN-VAN¹, Laurence MOUSSON⁴, Anna-Bella FAILLOUX⁴, Claire VALIENTE MORO¹, Bakoly O. RALISOA², Patrick MAVINGUI^{1*}

Running title: New distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Madagascar

* Corresponding author. Mailing address: UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

Phone: +33 4 72 43 11 43. Fax: +33 4 72 43 12 23.

E-mail: patrick.mavingui@univ-lyon1.fr

Abstract

Background: These last years, the Indian Ocean region has been the theatre of severe epidemics of chikungunya and dengue. These outbreaks coincided with a highly increase in *Aedes albopictus* populations that outcompete its sister taxon *Aedes aegypti* in most islands sampled. The objective of this work was to update the entomological survey of the two *Aedes* species in Madagascar which has to face these arboviroses as well.

Methods: Sampling of *Aedes* mosquitoes was conducted during two years, October 2007 to October 2009, in fifteen localities from eight regions of contrasted climates. Captured adults were identified immediately whereas immature stages were bred until adult stage for determination. Phylogenetic analysis was performed using two mtDNA genes, *COI* and *ND5* and trees were constructed by maximum likelihood (ML) method with the gene time reversible (GTR) model. Experimental infections with chikungunya virus strain 06.21 at a titer of $10^{7.5}$ pfu/mL were performed to evaluate the vector competence of field-collected mosquitoes. Disseminated infection rates were measured fourteen days after infection by immunofluorescence assay performed on head squashes.

Results: The species *Aedes albopictus* were found in 13 out of the 15 sites sampled. Breeding sites were mostly found in man-made environments such as discarded containers, used tires, abandoned buckets, coconuts, and bamboo cut trees. In contrast, the species *Aedes aegypti* was detected in only six sites in native forests and natural reserves. The phylogenetic analysis of the invasive *Ae. albopictus* distinguished haplotypes from South Asia and South America to that of Madagascar, but the markers used appeared not discriminant enough to discern Malagasy populations. Experimentally oral infections showed that six *Ae. albopictus* populations exhibited a high disseminated infection rates for chikungunya virus ranging from 98 to 100%.

Conclusion: In Madagascar, *Ae. albopictus* has extended its geographical distribution whereas *Ae. aegypti* has become rare, contrasting with what was previously observed. Changes are predominantly driven by human activities that provide suitable breeding sites for the highly anthropophilic mosquito *Ae. albopictus*. Moreover, these populations were found to be highly susceptible to chikungunya virus. In the light of this study, *Ae. albopictus* may have been involved in the recent outbreaks of chikungunya and dengue epidemics in Madagascar, and consequently, control measures should be promoted to limit its current expansion.

Background

Among the 29 mosquito species of the genus *Aedes* reported in Madagascar, thirteen are endemic [1]. Since the reports in the 80s [1, 2], no extensive survey has been conducted on the geographical distribution of the *Aedes* genus in Madagascar. As *Aedes* species are major vectors of arboviral diseases, control of these mosquitoes is needed to prevent or limit the epidemic risks. Recently, the species *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* have been involved in arbovirus outbreaks worldwide [3,4,5]. During the last ten years, the Indian Ocean islands have witnessed severe epidemics of arboviruses, notably chikungunya (CHIK) and dengue (DEN). By contrast to the 50s where *Ae. aegypti* was involved as the main vector, the species *Ae. albopictus* has been identified as the primary vector of most recent outbreaks in the Indian Ocean [6,7,8,9,10].

In Madagascar, an outbreak of DEN and CHIK fevers emerged in the east coast of Toamasina on January 2006 [9]. Since then, several cases of CHIK and DEN were reported in different regions of Madagascar, including Antalaha (coast north-east), Antsiranana (coast north), Mahajanga (coast north-west) and Toamasina (east coast) ([11], <http://www.invs.sante.fr>). During these epidemics, the species *Ae. albopictus* was identified as the main vector [5,9,12]. These data are in line with what is known on the current worldwide expansion of *Ae. albopictus*, which outcompetes positively with its sister taxon *Ae. aegypti* [13,14,15,16].

The goal of this study was to survey populations of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* of Madagascar and to explore whether their geographical distribution has evolved. Entomological investigations were conducted in eight regions where various sites were visited. The choice of the areas to sample was based on at least one of the following elements (i) existence of previous records of the genus *Aedes* spp, (ii) contrasted ecoclimatic characteristics, and (iii) suspected or confirmed human cases of CHIK and/or DEN during recent outbreaks in the region [9,11,17]. Collected adults and immature stages were genetically characterized by haplotyping and susceptibility to arboviruses was measured in a biosafety laboratory level 3.

Methods

Geographic location and characteristics of study areas

Ae. albopictus and *Ae. aegypti* were sampled in cities, villages, natural reserves and forests in eight regions of Madagascar (Figure 1). The characteristics of the sampled areas are summarized in Table 1 and Figure 2. The Analamanga region is located in the highlands of Madagascar at altitude of

1200-1433m, with a tropical climate. In this area, two seasons are observed: a hot (21°C in average) and rainy period (November to April with about 200 mm precipitation in a month), and a relatively dry cool season for the rest of the year (10°C in average and rainfall not exceeding 20 mm precipitation in a month). The Zoological and Botanic Parc of Tsimbazaza is located in the Center of Antananarivo at 1200 m altitude. As Analamanga region, Amoron'i Mania region (Ambositra) and Haute Matsiatra region (Fianarantsoa) are also in the highlands of Madagascar and have similar characteristics. Ranomafana forest is situated in a region between Amoron'i Mania and Vatovavy Fitovinany in the western side of Madagascar. The climate is tropical humid and rainy. The temperature varies from 14 to 20 °C. The annual rainfall reaches 2600 mm. The Atsinanana region (Toamasina, Foulpointe) is in the eastern plains of the island. The climate is hot and wet and rains occur all the year with the mean annual rainfall of about 3200 mm and relative humidity around 87%.

The Boeny region (Mahajanga) is located in the western plains. It has an equatorial climate with an arid and warm summer (mean temperature of 27°C) with moderate rainfall (mean precipitation is about 400 mm per year). The Menabe region (Morondava, Kirindy forest) is also situated in the western plains. It has a similar climate as the Boeny region. However, the temperature can reach more than 40°C during the raining season (late December and at the end of March). Rainfall is not constant during this period but spaced on dry period.

The Vatovavy-Fitovinany region (Mananjary) is in the southwest coast of Madagascar and has a tropical climate along coast, temperate in land and arid in south. The Diana region is located in north plains in the North-West of Madagascar, and it hosts Diego-Ambanja cities, as well as reserved forests of Ankarana and Montagne d'Ambre. The climate is equatorial dry and this area is situated between 4 m altitude (Ankarana) and 1400 m (Montagne d'Ambre). It is characterized by alternance of wet and dry season (May to November) and a hot and humid season (December to April). Temperature is situated at 27°C and rainfall varies from 985 to 2171 mm per year.

Collection and processing of mosquitoes

Adults and immature stages of mosquitoes were collected monthly from October 2007 to October 2009 in different sites (Figure 2). Two methods were used to catch adult mosquitoes: (i) the butterfly nets that allow to collect both females and males flying near the grass, and (ii) the use of oral aspirators to capture females landing on the legs of human volunteer-baits who gave their

agreement. To avoid biting, exposed legs of each volunteer were under monitoring of two non-exposed capturers who catch mosquitoes immediately after landing. Collected adult mosquitoes were stored in cups covered with veil. *Aedes* spp specimens were identified morphologically [1], then males and females were separately desiccated, in silicagel. In order to keep some individuals alive during transfer to the laboratory, impregnated cotton with 6% sucrose solution was placed at their disposal. Larvae and pupae were collected from breeding sites and brought back to laboratory, where they were reared until adult stage and then identified. For each species, the number of individuals, date of capture and location site were recorded.

Mosquito infection and virus dissemination rate measurement

Wild-caught females were blood-fed on chicken and let to lay eggs on absorbent paper in insectaries under standard conditions ($28^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, $80\% \pm 12\%$ humidity, photoperiod: 12h/ 12h). Batches of eggs were brought to biosafety insectaries, and after hatching, larvae were reared to adults in standard conditions as described [18].

To infect mosquitoes, the strain CHIKV (E1-226V), which has an A->V amino acid substitution at position 226 in the E1 glycoprotein, was used [6]. Virus stock and mosquito infection were performed as described [7, 18]. Briefly, 1 mL of viral suspension was added to 2 mL of washed rabbit erythrocytes supplemented with ATP (5×10^{-3} M) as a phagostimulant. The resulting infectious blood at titer of $10^{7.5}$ PFU/mL was transferred to a glass feeder at 37°C on top of the mesh covering a plastic box containing female mosquitoes that have been starved for 24h. After 15 min of oral feeding, mosquitoes were sorted on ice. Fully engorged females were transferred to cardboard containers then fed with 10% sucrose at 28°C for 14 days. After incubation period, disseminated infection rates of CHIKV were determined on alive mosquitoes by immunofluorescence assay (IFA) on head squashes as described [19]. In brief, mosquito heads were placed between two glass slides and squashed by hand pressure. Squashed tissues were fixed by immersing in acetone for 20 min at -20°C , then incubated with a first antibody anti-CHIKV diluted in PBS 1X (1:200); the antibody was obtained from a mouse ascite. After incubation 30 min at 37°C , slides were washed three times in PBS 1X and incubated with an anti-mouse conjugate diluted in PBS 1X, (1:80) and supplemented with Evan blue. Slides were observed under an epifluorescence microscope (Leitz, Larbolux K). In positive sample, the head tissue appeared in green whereas blue-colored tissue is negative.

Therefore, the disseminated infection rate corresponds to the ratio between positive heads to the total number of surviving individuals examined.

Nucleic acid extraction, PCR amplification and sequencing

To extract genomic DNA, five males and five females from each site were washed three times with sterilized water, then surface-disinfected with ethanol 70°C for 5 min. After five washes with sterilized water, each individual mosquito was homogenized and the genomic DNA extracted using the procedure previously described [20].

For PCR, amplification was performed using a T Gradient Thermocycler (Biometra, France) with the primers targeting two mtDNA gene fragments: a 597-bp fragment of *COI* (cytochrome-oxidase subunit 1) and a 450-bp fragment of *ND5* (NADH dehydrogenase subunit 5). The two sets of primers used were: for *COI*, CI-J-1632 (5'-TGATCAAATTTATAAT-3') and CI-N-2191 (5'-GGTAAAATTTAAAATATAAACTTC-3') [21]; and, for *ND5*, ND5FOR (5'-TCCTTAGAATAAAAATCCCGC-3') and ND5REV (5'-GTTTCTGCTTTAGTT-CATTCTTC-3') [22]. Reactions were made in 50 µl volume containing 90 ng of DNA template, 1X PCR buffer, 50 mM MgCl₂, 10 µM of each primer, 2 mM of dNTP mix (INVITROGEN, France), 0.4 U of *Taq* DNA polymerase (INVITROGEN, France). The temperature profile for *ND5* consisted of an initial denaturation at 98°C for 2 min, followed by 5 cycles of 95°C for 30s, 45°C for 30s, 72°C for 45s, then 25 cycles of 95°C for 30s, 46°C for 45s, 72°C for 45s, and a final extension at 72°C for 5 min. For *COI* the amplification program consisted of an initial denaturation at 95°C for 5 min, followed by 35 cycles of 97°C for 30s, 40°C for 45s, and 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min [23]. An aliquot of 10 µl of each PCR product was subjected to electrophoresis on a 1% agarose gel at 50 V for 30 min, then stained with ethidium bromide and photographed with Gel Doc 2000 system (BioRad, USA). When bands with expected size were visualized, the remaining PCR products (approximately 40 µl) were sent to sequencing at BIOFIDAL-DTAMB (SFR BioEnvironment and Health, Lyon, France).

Phylogenetic analysis

The *COI* and *ND5* gene fragments were sequenced in both strands and deposited in Genbank with accession numbers from JN406654 to JN406855. Sequences were then aligned with those of mosquitoes available in data bases by using BioEdit and Multialn softwares. The two gene sequences were concatenated to improve the reliability of the phylogenetic analysis. Phylogenetic

analysis was carried out by using the Seaview software (<http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html>) based on maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) and neighbor-joining (NJ) methods. Trees were then constructed with the general time reversible (GTR) model, and branch supports were estimated by bootstrapping with 1000 replicates.

Results

Distribution of *Aedes* in sampled regions of Madagascar

As most of the previous entomological studies have shown that *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* species were found exophilic (which do not enter inside habitations) in Madagascar, collections were conducted outdoors. Contrasted environments and nature of potential larval breeding sites were used as indicators for sampling (Table 1 and Figure 2). Immature stages and adults of *Ae. albopictus* predominated in most sampled sites (13 out of 15). During the 24 months of sampling, a total of 7,7481 adults (5033 females and 2748 males) and 7891 immature specimens of *Ae. albopictus* were captured in diverse ecological areas; from highland to the coast and under contrasted climates from arid to humid (Table 1). Breeding sites included natural and human-made environments. In contrary, the species *Ae. aegypti* was found in very limited numbers (269 females and 46 males adults) and was mostly confined to sylvatic zones (Ranomafana, Kirindy, Ankarana and Montagne d'Ambre forest), even if few specimens were also captured in Diego Suarez city. In some areas, the current distribution of the two species was significantly different from what was recorded in the 80s (Figure 1). For instance, in Ambanja town (Diana region), the two species were reported to be sympatric, but during our investigation, only *Ae. albopictus* was found. This coincided with the extension of urbanization zone and an increase of man-made breeding sites. Interestingly, a converse pattern was observed in the neighbourhood natural reserve of Ankarana where the sympatry was substituted by the allopatry of *Ae. aegypti*. In the same line, *Ae. aegypti* has recently colonized the natural reserve of Ranomafana, whereas *Ae. albopictus* has extensively invaded the cities of Mahajanga (Boeny region) and Morondava (Menabe region). As *Ae. albopictus* has expanded since 80's in Madagascar and predominated in most sampled sites, further analyses were focused on that species.

Phylogenetic analysis of *Aedes albopictus*

The sequences of two genes (449 bp for *ND5* and 597 bp for *COI*) were obtained from 86 *Ae. albopictus* (5 females and 5 males for each site) and were aligned with similar sequences retrieved from the Genbank database (Figure 3). The alignment revealed substitutions consisted of both transitions and transversions (not shown). The tree built from concatenated sequences (1046 bp) identified two well-defined groups (Figure 3), with a strong support bootstrap value (84%). One group consisted of specimens from South America (Brazil) and South-Asia (Cambodia, Thailand, Vietnam), and the other clustered all the sequences from Madagascar together with those of the Indian Ocean (La Reunion), North America (USA and Hawaiï) and Europe (France). In Madagascar, the data of *COI* and *ND5* separately (not shown) or concatenated (Figure 3) did not cluster *Ae. albopictus* according to neither geographical location nor urban, suburban and sylvatic habitats. For example, individuals from Montagne d'Ambre forest (North West) were not distinguishable from those collected in Toamasina city (Eastern plains) or Ankazobe village (Highlands). As females have dispersal behavior driven by the search for oviposition sites, which are in turn influenced by natural or domestic environments, phylogenetic analysis was performed according to sex. However, similar tree topologies were obtained (not shown). Sequences were intermixed between individuals sampled in contrasted ecological niches (bamboos, bushes, fruit trees, containers, tires etc.).

Vector competence

Among eggs of the 13 *Ae. albopictus* populations transported from Madagascar to France, only six successfully hatched and gave adults for vector competence testing. The susceptibility of each population (F2 or F3 generation) to infection was evaluated using artificial infectious CHIKV blood-meal. Globally, from a total of 503 females tested, 497 individuals (98.8%) were diagnosed positive as measured by IFA on head squashes (Table 2). No fluorescent signal was found in mosquitoes engorged with non-infectious blood-meal as expected. At population level, the disseminated infection rate ranged from 98 to 100 %. This higher infection rate has already been reported for this CHIKV strain 06.21 in several *Ae. albopictus* populations from Indian Ocean [7].

Discussion

The survey conducted throughout two years in 15 localities among eight regions of Madagascar revealed that the distribution of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* is changing considerably, in

comparison to previous recorded distribution. Initially, the two species have been reported to be mainly allopatric with contrasted distribution. Indeed, *Ae. aegypti* has been found to occupy mainly dry and semi-arid western and southern regions of Madagascar, whereas *Ae. albopictus* was dominant in eastern coast and highland areas [1,2]. Our data showed that *Ae. aegypti* has become scarce within their previously delineated areas, and presently their population density was low. In addition, it has been noticed that they were likely displaced to occupy sylvan areas: two in allopatry (Ankarana and Kirindy) and two in sympatry with *Ae. albopictus* (Montagne d'Ambre and Ranomafana). The wild behaviour of *Ae. aegypti* was already reported in both native forests and natural reserves in the Indian Ocean islands [2,12]. We also found two populations consisted of few adults under bushes and fruit trees in Mahajanga city (western coast) and Diego Suarez city (north coast); a sporadic introduction by human can be suggested since this species was reported previously near the Ivato airport and in the south [2]. In contrast to South-Asian pattern [24], the species *Ae. aegypti* is less anthropophilic in Madagascar; it is thus conceivable to hypothesize that the smaller size of such populations will preclude its extinction in domestic environments.

In contrast, the population density of *Ae. albopictus* was higher compared to that of *Ae. aegypti*, and also its distribution was wider covering the eight regions surveyed from west to east and in northern areas. This study confirms the extension of the distribution area of *Ae. albopictus* which was already reported [2,12]), albeit in lesser extent. More evidence here by was brought on the adaptation capabilities of *Ae. albopictus* to occupy various eco-climatic regions of Madagascar from the high altitude with temperate conditions prevalent in the highland region up to typical tropical conditions of the low altitude of the coastal regions. These data undoubtedly reinforce the fate of phenotypic plasticity displayed by *Ae. albopictus*. For instance, it was shown that *Ae. albopictus* has the ability to adapt to cold temperatures, and these adaptative capacities are likely due to its ability to synthesize a high amount of lipids and consequently to a larger production of egg-yolk lipids preparing eggs for diapause [25,26,27].

The species *Ae. albopictus* predominantly occupied artificial environments forming the main suitable breeding sites for their oviposition. Dumped containers, used and abandoned tires and buckets, coconuts and bamboo cut trees constituted such environments, providing ideal conditions that allow persistence of small numbers of mosquitoes or eggs. Populations significantly increase at the rainy season. Though *Ae. albopictus* is known to be highly anthropophilic explaining their prevalence associated with human activities, specimens were also found in sympatry with *Ae.*

aegypti in wild areas. Surprisingly, *Ae. albopictus* also predominated in such conditions as well, suggesting a better competitiveness [28,29]. Although *Ae. albopictus* females have feeding preferences towards mammals, recent investigations highlighted the opportunistic and broad spectrum trophic behaviours to cold and other warm-blood vertebrates such as birds and reptiles [30,31]. Overall, these features suggested that the wide distribution and invasiveness of *Ae. albopictus* in Madagascar rely on adaptive behaviour to both abiotic and biotic environmental factors.

To examine whether the environment inhabited by mosquitoes structured the populations, a phylogenetic analysis was performed using COI and ND5 mitochondrion markers [23]. The haplotype sequences of *Ae. albopictus* from Madagascar were clearly separated from those from South America (Brazil) and South Asia (Cambodia, Thailand, Vietnam). However, no significant differences were found between sylvan and domestic populations of Madagascar. Malagasy populations of *Ae. albopictus* were intermixed with individuals from the Indian Ocean (La Reunion Island), Europe (Normandie, France), and North America (Jacksonville, USA). These results may suggest a recent invasion process or a trade-off between these regions. Experimental infections of six Malagasy *Ae. albopictus* populations with CHIKV 06.21, a strain that circulated in Indian Ocean [6], demonstrated their high susceptibility to infection. These results are similar to what was observed in most *Ae. albopictus* populations from the Indian Ocean [7].

Conclusions

Based on the current data obtained and on previous investigations, populations of *Ae. albopictus* are spreading and increasing in density in Madagascar since its introduction from Southeast Asia. Besides, the species *Ae. aegypti* has become very scarce. Changes in this biogeography pattern are probably linked to intensive destruction of natural forests through accelerated urbanization and rapid anthropisation. The increasing density of *Ae. albopictus* throughout different areas of the country and its susceptibility towards both chikungunya and dengue (5), suggest strongly that this species was the main vector implicated in the recent outbreaks of these two arboviruses. Thus, reinforcing surveillance and implementing adapted control measures against this invading species are needed in Madagascar, and it is also of interest to monitor the biogeography of other mosquito species like *Culex*, *Mansonia*, *Erethmapodites* usually associated with man-made environments.

Competing interests. The authors declare that they have no competing interests

Author's contributions

FNR managed mosquito sampling with other malagasy members (LHR, PR, LSR). FNR, VTV, KZ, CVM, LM, ABF, PM designed and performed experiments. FNR, BOR, PM interpreted the results and wrote the manuscript in collaboration with other authors.

Author's informations

¹Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne; CNRS, VetAgro Sup, UMR5557, Ecologie Microbienne.

²Département d'Entomologie de la Faculté des Sciences d'Antananarivo, Madagascar.

³Centre National de Recherche sur l'Environnement, Madagascar.

⁴Institut Pasteur, Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Paris, France.

Acknowledgements and Funding

We are grateful to Madagascar National Parks (formerly ANGAP) for authorizing collection of wild mosquitoes. We also thank the National Reference Center of Arboviruses at the Institut Pasteur in Paris for providing the CHIKV 06.21 strain. FNR was supported by the Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB, formerly IFB). This work was funded by the grant FRB-CD-AOOI-07-012, and was carried out within the frameworks of GDRI "Biodiversité et Développement Durable à Madagascar" and COST action F0701 "Arthropod Symbioses: from fundamental to pest disease management".

References

- 1 Ravaonjanahary C : *Les Aedes de Madagascar*. Travaux et documents de l'ORSTOM, 1978, France.
- 2 Fontenille D, Rodhain F: Biology and distribution of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Madagascar. *J Am Mosq Control Assoc* 1989, **5**: 219-225.
- 3 Reiter P, Fontenille D, Paupy C: *Aedes albopictus* as an epidemic vector of Chikungunya virus: another emerging problem? *Lancet Infect Dis*, 2006, **6**:463-464.

- 4 Delatte H, Dehecq JS, Thiria J, Domerg C, Paupy C, Fontenille D: Geographic distribution and developmental sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) during a Chikungunya epidemic event. *Vector Borne and Zoonotic Dis* 2007, **7**:1-11.
- 5 Delatte H, Paupy C, Dehecq JS, Thiria J, Failloux A-B, Fontenille D : *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in La Réunion : biology and control. *Parasite* 2008, **15**:3-13.
- 6 Schuffenecker I, Itean I, Michault A, *et al*: Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* 2006,**3**: e263.
- 7 Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, *et al*:Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2007, **2**: e1168.
- 8 Renault P, Solet JL, Sissoko D, Balleydier E, Larrieu S, Filleul L, Lassalle C, Thiria J, Rachou E, de Valk H, Ilf D, Ledrans M, Quatresous I, Quenel P, Pierre V: A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg* 2007, **77**:727-73.
- 9 Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, *et al*.: Outbreak of dengue and Chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar. *Emerg Infect Dis* 2008, **14**: 1135-1137.
- 10 Sang RC, Ahmed O, Faye O, *et al*: Entomologic investigations of a chikungunya virus epidemic in the Union of the Comoros, 2005. *Am J Trop Med Hyg* 2008, **78**: 77-82.
- 11 Randrianasolo L, Raelina Y, Ratsitorahina M, Ravelomanana L, Andriamandimby S, Heraud JM, Rakotomanana F, Ramanjato R, Randrianarivo-Solofoniaina AE, Richard V: Sentinel surveillance system for early outbreak detection in Madagascar *BMC Public Health* 2010, **10**:31
- 12 Zouache K, Raharimalala FN, Raquin V, Tran-Van V, Raveloson Ravaomanarivo LH, Ravelonandro P, Mavingui P: Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different regions of Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol*, 2011, **75**:377-389.
- 13 Salvan M, Mouchet J : *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* at Ile de la Reunion. *Ann Soc Belg Med Trop* 1994, **74**: 323-326.
- 14 Bagny L, Delatte H, Quilici S, Fontenille D: Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. *J Med Entomol* 2009,**46**: 1541-1545.

- 15 O'Meara GF, Evans LF, Jr., Gettman AD & Cuda JP (1995) Spread of *Aedes albopictus* and decline of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Florida. *J Med Entomol* **32**: 554-562.
- 16 Kamgang B, Brengues C, Fontenille D, Njiokou F, Simard F, Paupy C: Genetic structure of the tiger mosquito, *Aedes albopictus*, in Cameroon (Central Africa). *PLoS One* 2011, **6**:e20257.
- 17 Higgs S: The 2005-2006 Chikungunya epidemic in the Indian Ocean. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2006, **6**:116-116.
- 18 Mousson L, Martin E, Zouache K, Madec Y, Mavingui P, Failloux A-B: *Wolbachia* modulates Chikungunya virus replication in *Aedes albopictus*. *Mol Ecol* 2010, **19**:1953-1964.
- 19 Kuberski TT, Rosen L: A simple technique for the detection of dengue antigen in mosquitoes by immunofluorescence. *Am J Trop Med Hyg* 1977, **26**:533-53.
- 20 Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mousson L, Failloux AB & Mavingui P: Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2009, **4**: e6388.
- 21 Kambhampati S, Smith PT: PCR primers for the amplification of four insect mitochondrial gene fragments. *Insect Mol Biol* 1995, **4**:233-236.
- 22 Birungi J, Munstermann LE: Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Cluicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: Evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Ann Entomol Soc Am* 2002, **95**: 125-132.
- 23 Mousson L, Dauga C, Garrigues T, Schaffner F, Vazeille M, Failloux A-B: Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera:Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet Res* 2005, **86**:1-11.
- 24 Urdaneta-Marquez L, Failloux A-B: Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infect Genet Evol* 2011, **11**:253-261.
- 25 Hawley WA: The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc Suppl* 1988, **1**:1-39.
- 26 Kobayashi M, Nihei N, Kurihara T: Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. *J Med Entomol* 2002, **39**:4-11.
- 27 Delatte H, Gimonneau G, Triboire A, Fontenille D. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *J Med Entomol* 2009, **46**:33-41.

- 28 Juliano SA, Lounibos LP, O'Meara GF: A field test for competitive effects of *Aedes albopictus* on *A. aegypti* in South Florida: differences between sites of coexistence and exclusion? *Oecologia* 2004, **139**: 583-593.
- 29 Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP. 2007. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7:76-85.
- 30 Richards SL, Ponnusamy L, Unnasch TR, Hassan HK, Apperson CS: Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. *J Med Entomol* 2006, **43**:543-551.
- 31 Delatte H, Desvars A, Bouétard A, Bord S, Gimonneau G, Vourc'h G, Fontenille D: Blood-feeding behaviour of *Aedes albopictus*, a vector of chikungunya on La Réunion. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2010, **10**:249-258.

Figure legends.



Figure 1. Distribution of *Aedes* mosquitoes in eight regions of Madagascar. \triangle *Aedes albopictus* and \circ *Aedes aegypti* in the 80s (Ravaonjanahary, 1978; Fontenille *et al.*, 1989). \blacktriangle *Aedes albopictus* and \bullet *Aedes aegypti* at the end of 2009 (this study). Encircled symbols highlighted changes in species distribution.  Forest areas  Town.

Figure 2. View of mosquito breeding sites. A: sites of immature stages; B: sites of adults

Figure 3. Phylogeny inference from concatenated *COI* and *ND5* genes of *Aedes albopictus* by maximum likelihood (ML) method based on the general time reversible (GTR) model. Percentage bootstrap supports (1000 replicates) superior to 50% are given at each node. Branch lengths represent estimated substitutions per site. Code sequence is as follows: An (Ankazobe), DG (Diego-Suarez), MAH (Mahajanga), Man (Mananjary), MDA (Montagne d'Ambre), MR (Morondava), RN (La Réunion), TO (Toamasina), TS (Tsimbazaza). Sequences retrieved from Genbank belonged to specimens from Brasil (AJ971003.1 and AJ971014.1), Vietnam (AJ971004.1 and AJ971010.1), Thailand (AJ971015.1), Cambodia (AJ971006.1), France (AJ971009.1 and AJ971008.1), Hawaii (AJ971011.1), USA (AJ971005.1), La Reunion (AJ971013.1 and AJ971012.1), and Madagascar (AJ971007.1).

Table 1. Ecological characteristics of sampling sites and numbers of mosquitoes captured

| Areas | Region | Site | Adult breeding sites | Larval breeding sites | <i>Ae. albopictus</i> * | | | | <i>Ae. aegypti</i> * | |
|---------------------------|---------------------|----------------------------|-----------------------------|--|-------------------------|---------|--------|---------|----------------------|--------|
| | | | | | F Wild | F LabEm | M Wild | M LabEm | F Wild | M Wild |
| Highlands | Analamanga | Antananarivo city | Bamboo | Bamboo hedge, discarded containers | 885 | 2053 | 508 | 1087 | 0 | 0 |
| | | Anjzorobe forest | Bamboo, bushes | Bamboo hedge | 580 | | 167 | | 0 | 0 |
| | | Ankazobe village | Bushes | Bamboo hedge, used tires | 523 | | 395 | | 0 | 0 |
| | Amaron'i Mania | Ambositra city | Fruit trees, bamboo, bushes | Bamboo hedge, used tires | 62 | 88 | 26 | 60 | 0 | 0 |
| | | Ranomafana village, forest | Bushes | Discarded containers , hollow roks | 250 | | 68 | | 24 | 20 |
| Eastern Plains | Haute Matsiatra | Fianarantsoa I-II city | Mango trees, bushes | Discarded containers , used tires | 95 | | 18 | | 0 | 0 |
| | Antsinanana | Toamasina city in coast | Bamboo hedge, bushes | Buckets abandoned, used tires, drum, coconut | 1217 | 740 | 375 | 394 | 0 | 0 |
| Western Plains | Boeny | Mahajanga city in coast | Mango trees, bushes | Discarded containers, used tires | 290 | | 20 | | 13 | 13 |
| | Menabe | Morondava city in coast | Mango trees, bushes | Buckets abandoned, used tires, drum, coconut | 130 | | 10 | | 0 | 0 |
| Southeast Coast | Vatovavy Fitovinany | Kirindy forest | Forest | Hollow rocks, tree holes | 0 | | 0 | | 45 | 13 |
| | | Mananjary city in coast | Fruit trees, bushes | Bamboo hedge, discarded containers, coconut | 810 | 2010 | 1102 | 760 | 0 | 0 |
| North Plains - North West | Diana | Ambanja city | Bushes | Buckets abandoned, used tires, drum, coconut | 0 | 450 | 0 | 249 | 0 | 0 |
| | | Ankarana forest | Forest | Hollow rocks, tree holes | 0 | | 0 | | 80 | 0 |
| | | Montagne d'Ambre forest | Forest | Hollow rocks, tree holes | 45 | | 13 | | 36 | 0 |
| | | Diego Suarez city in coast | Bushes, fruit trees | Buckets abandoned, used tires, drum, coconut | 146 | | 46 | | 71 | 0 |

*Number of individuals collected at each field site.

F, female. M, Male. Wild, adults collected from the field. LabEm, immature stages collected from the field and emerged in the laboratory.

Table 2. Disseminated infection rates of *Aedes albopictus* measured 14 days post-infection for CHIKV 06.21 strain

| Region | Locality | Breeding site (generation used) | Total engorgedmosquitoes | Total infected mosquitoes† (%) |
|------------|------------------|------------------------------------|-----------------------------|--------------------------------------|
| Diana | Montagne d'ambre | Forest, tree holes (F2) | 74 | 73 (98.6) |
| Atsinanana | Toamasina city | Old tires (F2) | 76 | 75 (98.7) |
| | | Coconut (F3) | 90 | 89 (98.9) |
| | | Buckets abandoned (F3) | 96 | 94 (97.9) |
| Analamanga | Ankazobe | Old tires (F2) | 84 | 83 (98.8) |
| | Tsimbazaza | Bamboo hedge (F2) | 83 | 83 (100) |

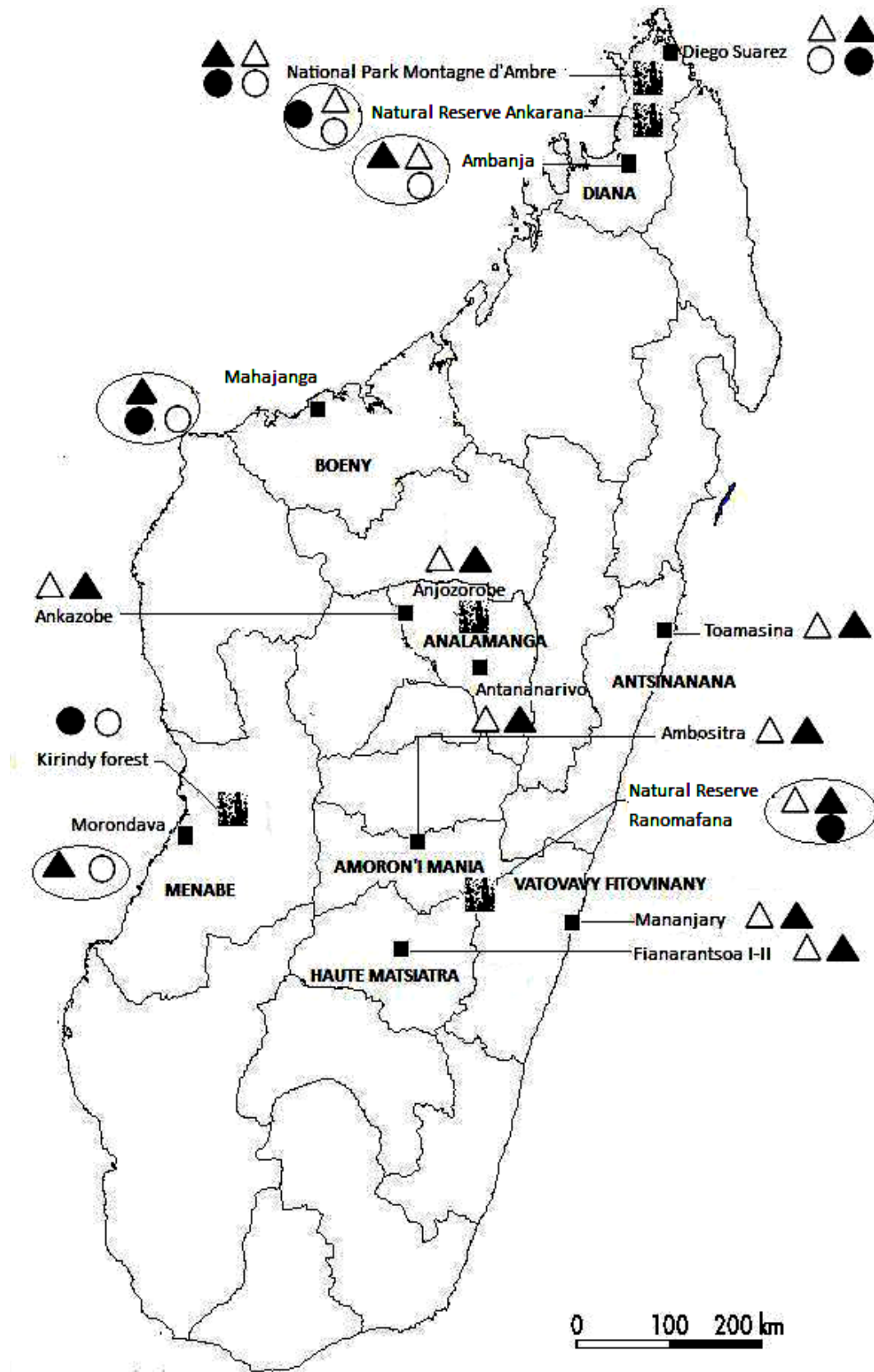


Figure 1.

A



hollow rocks



puisard



bucket abandonned



used tires

B



mango trees



bushes



fruits trees

Figure 2.

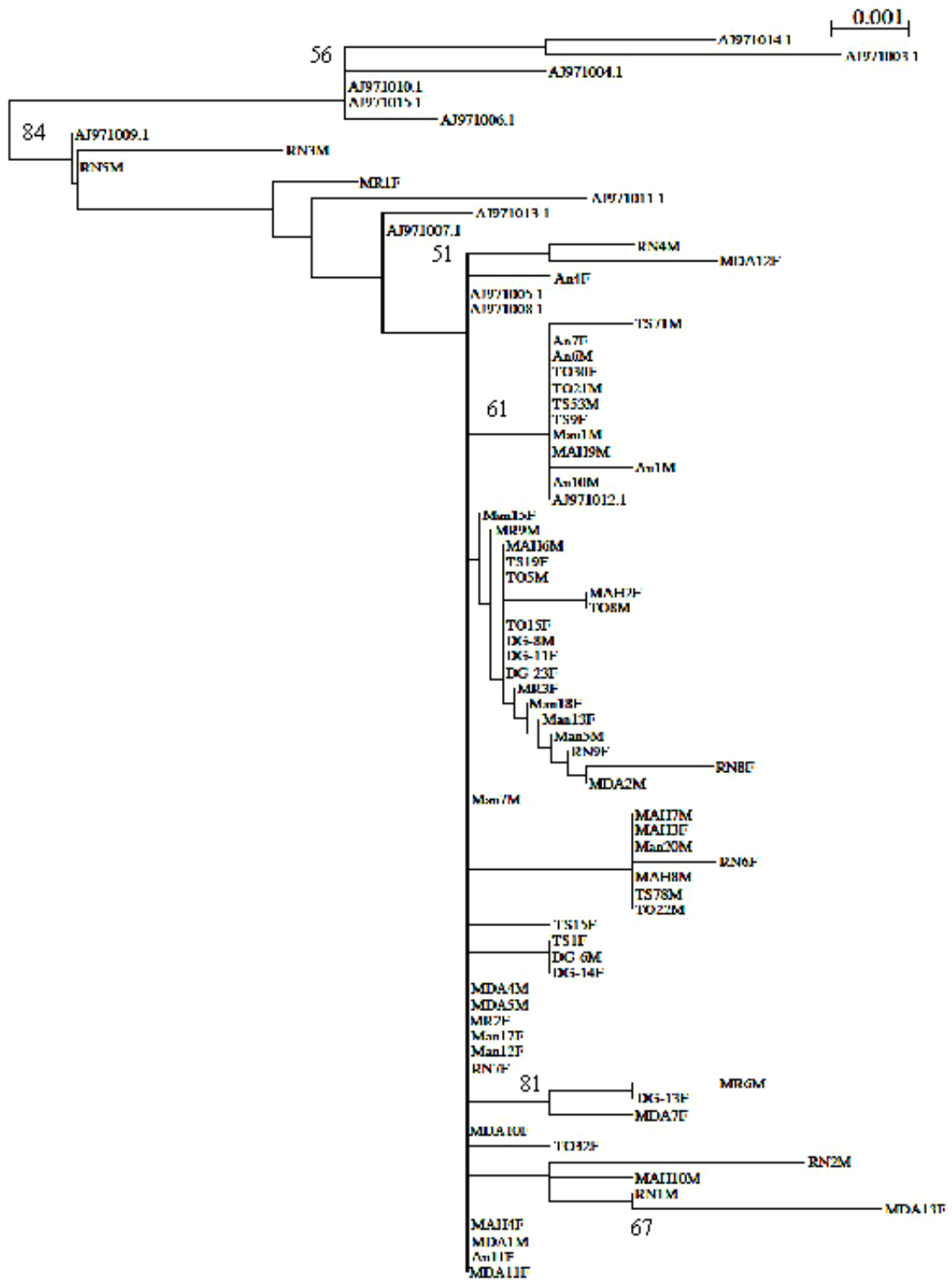


Figure 3.

CHAPITRE 2.

ETUDE DES COMMUNAUTES MICROBIENNES DES MOUSTIQUES VECTEURS

Ce deuxième chapitre est composé de deux publications. La première a été publiée dans FEMS Microbiology Ecology en 2011. La deuxième publication est rédigée en français et sera traduite en anglais avant sa soumission.

1- Contexte et objectifs

Les émergences et réémergences d'arboviroses ces dix dernières années ont été générées ou aggravées par l'augmentation des échanges interhumains qui ont été favorisés par les nouveaux moyens de transports et qui entraînent l'introduction des vecteurs dans des régions nouvelles. De plus, les changements globaux climatiques ont été aussi un des facteurs clé de ces émergences et réémergences (Gubler, 2002). En effet, tout contexte d'instabilité écologique, paysagère, environnementale ou sociale (guerre, déplacements de réfugiés, appauvrissement de populations, etc.) peut favoriser une maladie émergente ou sa diffusion. Or, jusqu'à maintenant, peu de vaccins efficaces existent pour lutter contre la plupart de ces arboviroses. Face à cette insuffisance de prophylaxie efficace, une importance particulière a été consacrée au rôle des vecteurs. La solution envisagée est d'apporter plus de moyens dans la lutte anti-vectorielle. Cependant, malgré les efforts entrepris, l'expansion géographique des moustiques vecteurs ne cesse de s'accroître et ces derniers envahissent même des territoires qui en étaient dépourvus (Hawley *et al.*, 1988 ; Gratz *et al.*, 2004 ; Tatem *et al.*, 2006). De plus, les insecticides utilisés pour éradiquer ces vecteurs engendrent des dégâts écologiques en tuant les espèces non cibles ainsi qu'en ayant de très longues rémanences qui ont pour effet une plus grande toxicité de l'environnement. Enfin, les moustiques développent de plus en plus de résistance vis-à-vis des produits utilisés (Hemingway *et al.*, 2004).

Dans ce contexte, d'autres moyens de lutte ont été développés telle l'utilisation de lutte biologique comme la bactérie *Bacillus thuringiensis* ssp. *israelensis* utilisée en larvicide (Aksoy, 2008). Ces dix dernières années, une, autre alternative émergente est l'utilisation des bactéries naturellement présentes ou introduites chez les moustiques vecteurs pour diminuer la

transmission. La bactérie endosymbiotique *Wolbachia* est la plus étudiée (Brownstein *et al.*, 2003 ; Rasgon *et al.*, 2007, 2008 ; Bourtzis *et al.*, 2008). Naturellement trouvée dans 20 à 66 % des populations naturelles d'insectes (Werren *et al.* 1995a ; Jeyaprakash & Hoy, 2000 ; Hilgenboecker *et al.*, 2008), cette bactérie a été trouvée pour la première fois dans le complexe *Culex pipiens* ainsi que dans d'autres genres de moustiques (Herting & Wolbach, 1924 ; Werren, 2008). Du fait du statut de bactérie non cultivable de *Wolbachia*, les recherches sur d'autres bactéries potentiellement utilisables sur certains arthropodes hématophages ont été entreprises. Cependant, peu d'études ont été consacrées aux moustiques, et les recherches sur les communautés bactériennes associées aux *Aedes* et *Culex* de Madagascar sont très parcellaires.

L'objectif de la première publication est d'apporter un éclairage sur les communautés bactériennes associées aux deux espèces *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* de Madagascar, vecteurs majeurs des arbovirus CHIKV et DENV. L'utilisation de différentes techniques moléculaires ont permis de mettre en évidence la présence des genres *Wolbachia*, *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rickettsia*, *Herbaspirillum*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Pseudomonas* et *Delftia*. De plus, ces travaux ont montré l'influence du sexe et des facteurs environnementaux sur la composition des communautés microbiennes des moustiques.

Etant donné l'effet de *Wolbachia* dans la biologie des insectes et son utilisation potentielle dans le biocontrôle des populations ou comme modulateur dans la transmission des arbovirus, la deuxième publication avait pour but d'explorer la présence et la prévalence de cette bactérie dans les espèces de moustiques capturées lors des enquêtes entomologiques dans différentes régions de Madagascar. Nous avons montré que *Culex antennatus* n'est pas infectée par *Wolbachia* alors que les espèces *Culex decens*, *Culex quinquefasciatus*, *Mansonia uniformis* le sont, avec des cas de mono- et bi-infections. Ces travaux sont aussi les premiers à détecter *Wolbachia* chez *Culex decens*.



RESEARCH ARTICLE

Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar

Karima Zouache^{1,2}, Fara Nantenaina Raharimalala^{1,2,3}, Vincent Raquin^{1,2}, Van Tran-Van^{1,2}, Lala Harivelo Ravaomanarivo Raveloson³, Pierre Ravelonandro⁴ & Patrick Mavingui^{1,2}

¹Université de Lyon, Lyon, France; ²UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, Villeurbanne, France; ³Département d'Entomologie de la Faculté des Sciences d'Antananarivo, Madagascar; and ⁴Centre National de Recherche sur l'Environnement, Madagascar

Correspondence: Patrick Mavingui, UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, 43 boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel.: +33 4 72 43 11 43; fax: +33 4 72 43 12 23; e-mail: patrick.mavingui@univ-lyon1.fr

Received 30 August 2010; revised 11 November 2010; accepted 11 November 2010.
Final version published online 22 December 2010.

DOI:10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x

Editor: Christoph Tebbe

Keywords

bacterial community; DGGE; quantitative PCR; *Wolbachia*.

Abstract

Symbiotic bacteria are known to play important roles in the biology of insects, but the current knowledge of bacterial communities associated with mosquitoes is very limited and consequently their contribution to host behaviors is mostly unknown. In this study, we explored the composition and diversity of mosquito-associated bacteria in relation with mosquitoes' habitats. Wild *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* were collected in three different geographic regions of Madagascar. Culturing methods and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and sequencing of the *rrs* amplicons revealed that *Proteobacteria* and *Firmicutes* were the major phyla. Isolated bacterial genera were dominated by *Bacillus*, followed by *Acinetobacter*, *Agrobacterium* and *Enterobacter*. Common DGGE bands belonged to *Acinetobacter*, *Asaia*, *Delftia*, *Pseudomonas*, *Enterobacteriaceae* and an uncultured *Gammaproteobacterium*. Double infection by maternally inherited *Wolbachia pipiensis* prevailed in 98% of males ($n = 272$) and 99% of females ($n = 413$); few individuals were found to be monoinfected with *Wolbachia wAlbB* strain. Bacterial diversity (Shannon–Weaver and Simpson indices) differed significantly per habitat whereas evenness (Pielou index) was similar. Overall, the bacterial composition and diversity were influenced both by the sex of individuals and by the environment inhabited by the mosquitoes; the latter might be related to both the vegetation and the animal host populations that *Aedes* used as food sources.

Introduction

All arthropod pests and vectors harbor a number of commensal and mutualistic microorganisms that have an impact on the ecology and behavior of their hosts (Buchner, 1965; Moran *et al.*, 2008; Moya *et al.*, 2008). Indeed, it is well-known that microbial communities associated with insects can contribute to host reproduction and survival, community interactions, protection against natural enemies and vectorial competence (Buchner, 1965; Moran *et al.*, 2008; Moya *et al.*, 2008; Gottlieb *et al.*, 2010; Oliver *et al.*, 2010). However, such extended phenotypes were mostly shown in phytophagous arthropods, whereas research on hematophagous insects has been limited. Historically, this unawareness was partly due to the lack of data on the composition of native bacterial communities associated with the later group of insects. A few studies have, however, reported a number

of bacterial species in some medically important hematophagous insects. A relevant example is the tsetse fly *Glossina*, which harbors the secondary symbiont *Sodalis glossinidius*, suspected to enhance vectorial competence (Cheng & Aksoy, 1999; Aksoy & Rio, 2005; Farikou *et al.*, 2010). More recently, bacteria belonging to genera *Enterobacter*, *Enterococcus* and *Acinetobacter* were isolated in *Glossina palpalis palpalis*, but their role in the tsetse fly biology remains to be determined (Geiger *et al.*, 2009).

Mosquitoes are vectors of a large number of animal and human pathogens, including parasites and viruses. During the last few years, Madagascar and other neighboring islands have experienced severe epidemics of arboviruses, notably chikungunya and dengue. The species *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* have expanded over the Indian Ocean Islands (Fontenille & Rodhain, 1989; Salvan & Mouchet, 1994; Delatte *et al.*, 2008; Sang *et al.*, 2008; Bagny *et al.*, 2009a, b)

and have been identified as the primary vectors responsible for these outbreaks (Schuffenecker *et al.*, 2006; Vazeille *et al.*, 2007; Delatte *et al.*, 2008; Ratsitorahina *et al.*, 2008; Sang *et al.*, 2008). As for all insects, the successful spreading of mosquitoes worldwide might be partly linked to their symbiosis with microorganisms, notably with bacteria. However, little is known about the current composition of mosquito-associated microbial communities, and consequently, their potential contribution to the host behaviors is mostly ignored. Investigations have been performed to screen bacterial communities in mosquitoes reared under laboratory conditions or collected in the fields, using culture and nonculture methods. These studies have focused mainly on the gut microbial communities of two mosquitoes, *Anopheles* and *Culex*, and these revealed the presence of diverse bacterial groups including known genera such as *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Asaia*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Flavobacterium*, *Lactococcus*, *Pantoea*, *Pseudomonas*, *Microbacterium*, *Staphylococcus* and *Stenotrophomas* (Pumpuni *et al.*, 1996; Straif *et al.*, 1998; Pidiyar *et al.*, 2004; Favia *et al.*, 2007; Terenius *et al.*, 2008; Rani *et al.*, 2009). These surveys highlighted that the relative abundance and the composition of mosquito-associated bacteria varied depending on the developmental stages and laboratory-reared or wild targeted populations. For *Aedes* mosquitoes, Demaio *et al.* (1996) reported the occurrence of cultivable bacteria belonging to *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Pseudomonas* and *Serratia* in the midgut of wild *Aedes triseriatus*. Most recently, this inventory was extended to *Acinetobacter*, *Asaia*, *Bacillus*, *Comamonas*, *Delftia*, *Pantoea* and *Wolbachia* detected in *A. aegypti* or *A. albopictus*, reared in insectaries (Gusmao *et al.*, 2007, 2010; Crotti *et al.*, 2009; Zouache *et al.*, 2009b).

The aim of this study was to survey the composition of bacterial communities associated with wild *Aedes* mosquitoes and to explore whether the bacterial diversity is related to host ecology. To that end, we used culture and nonculture methods to describe the bacterial composition and diversity of *A. albopictus* and *A. aegypti*, males and females, caught from ecologically contrasted regions of Madagascar.

Materials and methods

Location and characteristics of survey areas

The sampling regions were selected for their different ecoclimatic characteristics (Table 1) and because they were sites of chikungunya or/and dengue epidemics (Ratsitorahina *et al.*, 2008; Randrianasolo *et al.*, 2010), although no such virus infection was detected in the sampled population (data not shown). Vegetation and animals of the sampling sites are reported in Table 1.

The Analamanga region (Tsimbazaza Park, Ambohidratrimo and Ankazobe) is located in the centre of Madagascar at an altitude of 1200–1500 m. This region has a highland climate with two seasons: a hot and rainy period from October to March (21 °C average and about 200 mm of precipitation per month), followed by a cold and dry period (with temperatures down to 10 °C and rainfall not exceeding 20 mm month⁻¹). The mean relative humidity in this region is high (77.5% in 2008). The Zoological and Botanic Park of Tsimbazaza is located in the centre of Antananarivo town at 1250 m altitude. Ambohidratrimo Hill is located 25 km to the northwest of Antananarivo with an altitude of 1300 m. Ankazobe is 80 km from the northern limits of Antananarivo at 1500 m altitude. This site is transitional, connecting the central and the western regions. It is surrounded by the nature reserve of Ambohitantely. The climate is wetter and colder than the other towns in the centre.

The Atsinanana region (Toamasina) is on the east coast of Madagascar at sea level. The climate is particularly hot and humid: the mean annual rainfall is about 3200 mm with rain all year, the mean annual temperature is 25 °C with a minimum of 18 °C from June to August, and relative humidity is around 87% all year.

The Boeny region (Mahajanga, Andranofasika and Ankarafantsika natural reserve) has an arid tropical climate characterized by a warm summer (mean temperature of 27 °C) with moderate rainfall (mean precipitation is about 400 mm year⁻¹) and high relative humidity (81%) from November to March. Mahajanga is in the northwest of

Table 1. Ecological characteristics of mosquito *Aedes* sp. capture sites

| Region | Site | Zone | Potentially bitten hosts | Vegetation | <i>A. albopictus</i> * | | <i>A. aegypti</i> * | |
|------------|-----------------|-------------------|--------------------------------------|-----------------------------------|------------------------|------|---------------------|------|
| | | | | | Female | Male | Female | Male |
| Analamanga | Ambohidratrimo | Village outskirts | Humans, birds, reptiles | Bamboo hedge | 137 | 35 | 0 | 0 |
| | Tsimbazaza Park | City | Humans, lemurs, reptiles, birds | Bamboo, bushes | 823 | 62 | 0 | 0 |
| | Ankazobe | Village outskirts | Humans, chickens | Bamboo forest | 93 | 95 | 0 | 0 |
| Boeny | Mahajanga Town | City | Humans, ovine (sheep), bovine (zebu) | Fruit trees, bushes | 290 | 20 | 0 | 0 |
| | Andranofasika | Village | Humans, birds | Mango trees | 0 | 0 | 10 | 7 |
| | Ankarafantsika | Natural reserve | Humans, lemurs, birds, reptiles | Forest | 0 | 0 | 3 | 5 |
| Atsinanana | Toamasina Town | City | Humans, chickens, ducks | Fruit trees, bamboo hedge, bushes | 320 | 30 | 0 | 0 |

*Numbers of individuals collected at each site between February and May 2008.

Madagascar, 600 km from Antananarivo in Edge Sea at a 22 m altitude. There are mango trees, bushes and flowers near dwellings in the town. The Andranofasika village is about 110 km from Mahajanga town and 5 km from the National Park of Ankarafantsika.

Mosquito collection

Mosquitoes were collected between February and May 2008. Two methods were used to capture adult mosquitoes: during peaks of biting activity, a tube was used to capture insects landing on the human body or nets were used to capture insects near the grass. *Aedes* specimens, males and females, were identified using morphological characteristic keys (Ravaonjanahary, 1978). Captured adults were separated according to species and sex and stored in tubes containing silica gel. For each tube, the species, date, location, geographical position, and type of site was recorded. Only non-blooded mosquitoes were used for the analysis.

Bacterial isolation

Only live mosquito specimens from the field were used. Individuals were anaesthetized at 4 °C, rinsed three times in sterile water, surface disinfected in 70% ethanol for 10 min and rinsed five times in sterile water and once in sterile 0.8% NaCl. Two adult mosquitoes per sample were crushed in 150 µL sterile 0.8% NaCl. Homogenates (10 µL) were streaked on plates of modified Luria–Bertani and PYC agar media (Zouache *et al.*, 2009b). After incubation at 26 °C, single distinct colonies were reinoculated onto fresh agar plates of the corresponding medium. Colonies were streaked to check for purity and stored in 25% glycerol at – 80 °C until use.

Genomic and plasmid DNA extractions

Mosquitoes were surface disinfected as described above, and then individually crushed in 200 µL of extraction buffer (2% hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris pH 8, 0.2% 2-β-mercaptoethanol) heated to 60 °C. Homogenates were incubated for 15 min at 60 °C and proteins were extracted with chloroform:isoamyl alcohol (24:1, v/v). DNA was precipitated with isopropyl alcohol, pelleted by centrifugation for 15 min at 12 000 g, washed with 75% ethanol, dried and then dissolved in 30 µL of sterile water.

For bacterial isolates, genomic and plasmid DNA were extracted using the DNeasy Tissue Kit and QIAprep Spin Miniprep Kit, respectively (Qiagen, France).

Diagnostic PCR, amplified ribosomal DNA restriction analysis (ARDRA) and quantitative PCR amplification

Diagnostic PCR amplification was performed with primers listed in Table 2 using a T Gradient Thermocycler (Biome-

tra, France). Reactions (25 or 50 µL volumes) contained genomic DNA template (1 µL), 200 µM of each dNTP, 500 nM of each primer, 0.025 mg mL⁻¹ of T4 gene 32 protein (Roche, France) and 0.5 U of Expand polymerase in 1 × reaction buffer (Roche). PCR products were purified using QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). ARDRA was performed to screen the *rrs* genes of bacterial isolates in 20 µL reactions containing 200 ng of DNA, 1 × Buffer TangoTM and 10 U of each endonuclease RsaI and HhaI (Fermentas, France). DNA fragments were separated on 1% or 2% agarose gels stained with ethidium bromide.

Real-time quantitative PCR was performed using the LightCycler apparatus (Roche). The 20-µL reaction mixture contained 1 × LightCycler DNA Master SYBR Green I (Roche), primers at 300 nM (for *wsp*) or 200 nM (for *actin*) (see Table 2) and 10 ng of template DNA. The amplification program was 10 min at 95 °C followed by 40 cycles of 15 s at 95 °C, 1 min at 60 °C and 30 s at 72 °C. Standard curves were constructed using a dilution series (10¹–10⁸ molecules) of the pQuantAlb plasmid (Tortosa *et al.*, 2008) containing *wsp* and *actin* fragments.

Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE)

Ingeny PhorU (Apollo Instruments, Compiègne, France) systems were used for DGGE analysis of the V3 PCR products as published (Zouache *et al.*, 2009a). The 6% acrylamide gels contained a linear chemical gradient of urea and formamide from 35% to 65% urea and 40% deionized formamide (v/v). PCR products (2 µg) were run in 1 × TAE at 60 °C for 17 h at 100 V, and then gels were immersed in SYBR Green for 30 min, rinsed in distilled water and photographed under UV. Bands were excised, washed three times with sterilized water and then 30 µL of water was added to the tubes, which were heated to 60 °C for 30 min and kept overnight at 4 °C. The eluate (2 µL) was used for PCR amplification, and then amplicons were cloned and sequenced as described below.

Cloning and sequencing

PCR products were purified using the MinElute PCR Purification Kit (Qiagen), and cloned in the PCR[®]2.1-TOPO[®] vector according to the TOPO TA 2.1 Kit (Invitrogen, France). Clones containing DNA inserts were sequenced at Genoscreen (Lille, France). Sequences were analyzed with the BLASTN program at NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

DGGE fingerprints and statistical analyses

Each band was considered as an operational taxonomic unit (OTU). Images acquired with Fisher Bioblock Scientific System (Fisher, Ilkirch, France) were analyzed using GELCOMP II version 5.1 packages (Applied Maths, Kortrijk, Belgium). The software carries out a density profile analysis for

Table 2. Primers used in this study

| Samples | Gene | Primer name | Primer sequence (5'–3') | Amplicon size (bp)/ T_m (°C) | References |
|------------------|----------------------|---------------|--|--------------------------------|-----------------------|
| Organism | | | | | |
| Bacteria | <i>rrs</i> | pA | 5'AGAGTTTGATCCTGGCTCAG3' | About 1500/55 | Bruce et al. (1992) |
| | | pH | 5'AAGGAGGTGATCCAGCCGCA3' | | |
| | V3 region <i>rrs</i> | 16S (V3) 338F | 5'GCCGCCCGCCGCGCGGGC GGGCGGGGCGGGGGCACGGGG GGACTCTACGGGAGGCAGCAG3' | About 200/55 | Muyzer et al. (1993) |
| | | 16S (V3) 520R | 5'ATTACCGCGGCTGCTGG3' | | |
| <i>Wolbachia</i> | <i>rrs</i> | 99F | 5'TGTAGCCTGCTATGGTATAACT3' | 864/52 | O'Neill et al. (1992) |
| | | 994R | 5'GAATAGGTATGATTTTCATGT3' | | |
| | <i>wsp</i> | 81F | 5'TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC3' | 600/55 | Zhou et al. (1998) |
| | | 328F | 5'CCAGCAGATACTATTGCG3' | 379/52 | Zhou et al. (1998) |
| | | 183F | 5'AAGGAACCGAAGTTCATG3' | 501/52 | Zhou et al. (1998) |
| | | 691R | 5'AAAAATTAACGCTACTCCA3' | | |
| Plasmid | | | | | |
| TOPO 2.1 | | M13F | 5'GTAAAACGACGGCCAG3' | Variable/Variable | |
| | | M13R | 5'CAGGAAACAGCTATGAC3' | | |
| pQuantAlb | <i>wsp</i> A group | QAdir1 | 5'GGGTTGATGTTGAAGGAG3' | 264/60 | Tortosa et al. (2008) |
| | | QAreV2 | 5'CACCAGCTTTACTTTGACC3' | | |
| | <i>wsp</i> B group | 183F | 5'AAGGAACCGAAGTTCATG3' | 112/60 | Tortosa et al. (2008) |
| | | QBrev2 | 5'AGTTGTGAGTAAAGTCCC3' | | |
| | <i>actin</i> | ActAlb-dir | 5'GCAAACGTGGTATCCTGAC3' | 139/60 | Tortosa et al. (2008) |
| | | ActAlb-rev | 5'GTCAGGAGAAGCTGGGTGCT3' | | |

each lane and calculates the relative contribution of each band to the total band intensity in the lane, with a reference pattern included in all gels. Relative intensity in the profile of each band or OTU (P_i) was calculated by the relative area under the peak in the profile ($P_i = n_i/N$, where n_i is the area under the peak i , and N is the sum of the areas for all peaks within the profile). The relative intensity of each band was used to calculate (PRIMER v6 software) Shannon–Weaver ($H' = -\sum P_i \log P_i$ where $P_i = n_i/N$) and Simpson ($1 - \mathcal{N}' = 1 - \{\sum_i N_i(N_i - 1)\} / \{N(N - 1)\}$) diversity indices. We estimated the evenness of the numbers of bacterial species in each sample using Pielou's index ($J' = H' / \log S$, where $\log S = H'_{\max}$). Statistical analyses were performed using SPSS software and/or R packages.

Results

Collection of mosquitoes and bioecology

To collect *Aedes* adult mosquitoes, larval development sites were used as indicators (Table 1). Larvae refuges of *A. aegypti* consisted of natural sites (holes in trees or rocks, wet leaves of bamboo or palm trees and coconuts) outside cities and villages, whereas larvae refuges of *A. albopictus* were natural and artificial sites (containers or flowerpots) near habitations. Adults were collected around these larvae breeding sites.

Both species were found to be exophilic (which do not enter inside habitations). Except for natural reserves of the

Ankarafantsika and the Andranofasika villages, *A. albopictus* was predominant in all sites sampled (Table 1). Indeed, a total of 137 females and 35 males were caught in the neighborhood of the tourist attraction site of Ambohidratrimo, named 'Le Palais des Rois'. In Tsimbazaza Park, the presence of bamboo, bushes and many animals creates a favorable environment for *A. albopictus* development; a total of 823 females and 62 males were captured in this site. In contrast, only 93 females and 95 males were trapped in Ankazobe that has a colder climate (Table 1). The rainy and hot climate throughout the year in Toamasina allows uninterrupted development of *A. albopictus*, but it was difficult to capture adults during the active rainy season: 320 females and 30 males were trapped in the town itself. The two *Aedes* species were found in the Boeny region, but in different sites (Table 1). *Aedes albopictus* was predominant in urban areas, with 290 females and 20 males. *Aedes aegypti* was the major species found in village (Andranofasika) and forest zones (Ankarafantsika), although few individuals were caught: 13 females and 12 males.

Cultivable bacteria

To search for cultivable bacteria in mosquitoes, insects originating from the Boeny region were chosen as the two species under study were both present in the area: *A. albopictus* at the Mahajanga site and *A. aegypti* at the Ankarafantsika site. For the two media used, 22 colony types were obtained from males and 10 from females of

Table 3. Phylogenetic affiliation of isolates and sequences obtained from *Aedes* sp.

| Species (Sex) | Origin | Name of isolates | Size (bp) | Accession number | Phylogenetic affiliation | Most closely related organism | Accession number | Similarity (%) |
|----------------------------------|--------------------------------|------------------|-----------|------------------|----------------------------|---|------------------|-----------------|
| <i>Aedes albopictus</i> (Female) | Mahajanga (town) | KZ_Aal_F_Mm1 | 1477 | GU726172 | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Agrobacterium</i> sp. JS71 | AY174112.1 | 1476/1477 (99) |
| | | KZ_Aal_F_Mm2 | 1541 | GU726171 | <i>Firmicutes</i> | <i>Bacillus</i> sp. 41KB | FJ615523.1 | 1538/1541 (99) |
| | | KZ_Aal_F_Mm3 | 1544 | GU726173 | <i>Firmicutes</i> | <i>Bacillus cereus</i> strain: PDa-1 | AB247137.1 | 1541/1544 (99) |
| | | KZ_Aal_F_Mm4 | 1540 | GU726174 | <i>Firmicutes</i> | <i>Bacillus</i> sp. NN106 1 | AJ973278.1 | 1531/1540 (99) |
| <i>Aedes albopictus</i> (Male) | Mahajanga (town) | KZ_Aal_M_Mm1 | 1543 | GU726176 | <i>Firmicutes</i> | <i>Bacillus</i> sp. No.49 | AB066347.1 | 1543/1543 (100) |
| | | KZ_Aal_M_Mm2 | 1540 | GU726177 | <i>Firmicutes</i> | <i>Bacillus</i> sp. NN106 1 | AJ973278.1 | 1533/1540 (99) |
| | | KZ_Aal_M_Mm3 | 1541 | GU726185 | <i>Firmicutes</i> | <i>Bacillus</i> sp. 41KB | FJ615523.1 | 1540/1541 (99) |
| | | KZ_Aal_M_Mm4 | 1532 | GU726178 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Acinetobacter</i> sp. EH 28 | EU703817.1 | 1477/1483 (98) |
| | | KZ_Aal_M_Mm5 | 1530 | GU726180 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Acinetobacter</i> sp. SH-94B | FN377701.1 | 1505/1512(99) |
| | | KZ_Aal_M_Mm6 | 1530 | GU726181 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Acinetobacter johnsonii</i> strain S35 | AB099655.1 | 1505/1532 (98) |
| | | KZ_Aal_M_Mm7 | 1534 | GU726182 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Enterobacter</i> sp. NJ-1 | AM396909.1 | 1491/1505 (99) |
| | | KZ_Aal_M_Mm8 | 1534 | GU726183 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Enterobacter</i> sp. Px6-4 | EF175731.1 | 1499/1503 (99) |
| | | KZ_Aal_M_Mm9 | 1537 | GU726184 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Enterobacter cloacae</i> isolate 766 | AM778415.1 | 1515/1534 (98) |
| <i>Aedes aegypti</i> (Female) | Ankarafantsika Natural Reserve | KZ_Aae_F_Ma1 | 1544 | GU726175 | <i>Firmicutes</i> | <i>Bacillus</i> sp. G2DM-51 | DQ416786.1 | 1539/1544 (99) |
| | | KZ_Aae_F_Ma2 | 1544 | GU726179 | <i>Firmicutes</i> | <i>Bacillus megaterium</i> strain MPF-906 | DQ660362.1 | 1540/1544 (99) |

A. albopictus. Only four colony types were recovered from *A. aegypti* females. Two to four representatives of each colony type were used for genomic DNA extraction and PCR amplification of the *rrs* gene. ARDRA of entire *rrs* gene amplicons revealed a total of 13 distinct patterns (not shown). Sequencing of the *rrs* gene of each isolate and BLASTN analysis allowed identifying two phyla: *Proteobacteria* and *Firmicutes* (Table 3). Bacteria belonging to the genus *Bacillus* were present in all the specimens of both sexes and species. In addition, one isolate from an *A. albopictus* female was an *Agrobacterium* sp. whereas isolates of the genera *Acinetobacter* and *Enterobacter* were found in *A. albopictus* males. For all isolates, the sequence similarities were between 98% and 100% with respect to the *rrs* sequences of type strains reported in databases.

DGGE fingerprints and phylogenetic affiliation of bacterial sequences

To investigate the whole bacterial community of the two *Aedes* species, PCR-DGGE fingerprints of hypervariable V3 regions were produced. For each sampling site, females and five males (four males for *A. aegypti*) were analyzed individually. DGGE profiles varied between individuals of the same sex whether from the same site or not (Fig. 1). Banding patterns also differed between females and males of both *A. albopictus* and *A. aegypti*. To compare the DGGE profiles better, we analyzed them with GELCOMP software and then by principal component analysis (PCA) using R software. In terms of the bacterial communities they host, females and males of *A. albopictus* from all collection sites are distinct, the first two axes explaining > 43.8% of the total variability in PCA (Fig. 2).

To explore whether the mosquitoes' environment influences the bacteria they host, PCA was performed on the DGGE band profiles from males and females separately. For males (Fig. 3a and c), the type of vegetation (Table 1) may explain the differences because (1) individuals from urban areas (Mahajanga, Antananarivo and Toamasina) characterized by bushes and fruit trees are different from those from suburban areas (Ambohidratrimo and Ankazobe) surrounded by bamboo (PCA1, 17% of total variability); and (2) individuals from Ankazobe that is mainly a natural habitat are distinct from those from the touristic site of Ambohidratrimo (PCA3, 9.9% of variability). Although weaker (PCA3, 9.8% of total variability) for females, in addition to vegetation, differences between sites (Fig. 3b and c) can be linked to the hosts available to bite (Table 1). For instance, poultry were currently found in Toamasina and Ankazobe whereas Mahajanga is the only site where there is extensive ovine and bovine rearing. In contrast, Tzimbazaza Park is well-frequented by tourists and hosts a diverse range of vertebrates. In addition to humans, Ambohidratrimo may host natural fauna.

To identify the bacterial community in these mosquito samples, representative DGGE bands were excised from the gel, cloned and sequenced as numbered in Fig. 1. The V3 fragment size obtained varies from 165 to 196 bp, giving only an indication of bacterial phylogenetic affiliation. BLAST analyses indicated that sequences belonged to *Bacteroidetes* (2.6% of the sequenced bands), *Firmicutes* (10.5%) and *Proteobacteria* (86.9%). At the genus level, sequences were affiliated mostly with *Acinetobacter*, *Asaia*, *Pseudomonas* and an uncultured *Gammaproteobacterium* (Table 4). Some other bacteria detected included the genera *Bradyrhizobium* sp., *Delftia* sp., *Herbaspirillum* sp., *Rhizobium* sp. and

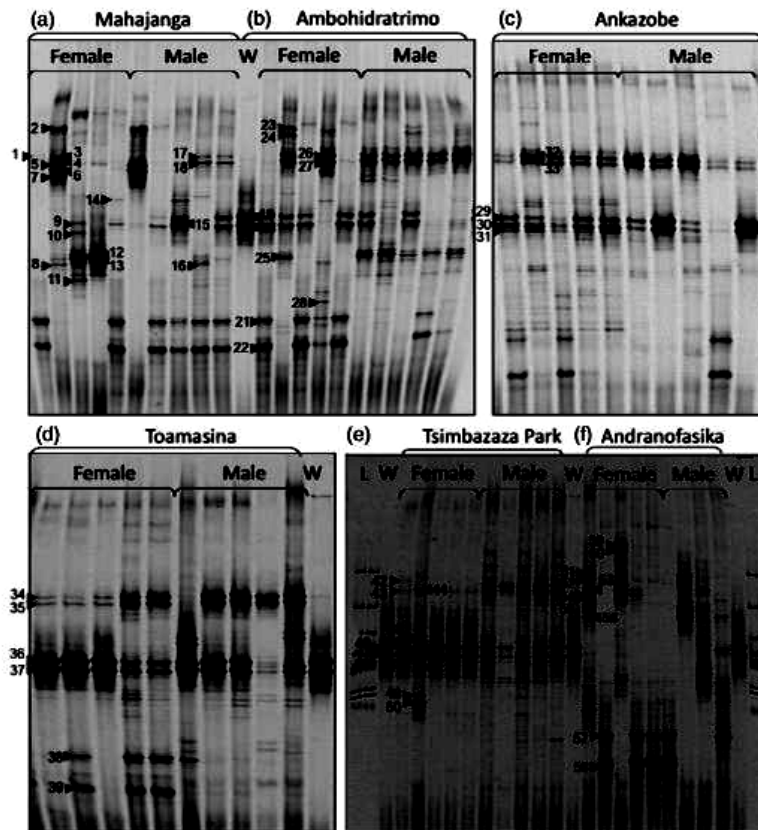


Fig. 1. DGGE profiles of bacterial communities of *Aedes albopictus* (a–e) and *Aedes aegypti* (f) from different regions of Madagascar. W, *Wolbachia* strain wAlbB from the Aa23 cell line used as an internal gel migration control. L, ladder used as an external gel migration control. Numbers correspond to cloned and sequenced bands (Table 4).

Stenotrophomonas sp. as well as members of the *Enterobacteriaceae* (uncultured *Citrobacter* sp., *Enterobacter* sp., *Pantoea* sp., *Shigella* sp. and *Yokenella* sp.). An uncultured *Streptococcaceae* bacterium and members of the genus *Staphylococcus* were also identified (Table 4). As expected, sequences of the control bands corresponding to *Wolbachia* V3 amplicons were seen exclusively in *A. albopictus* (Fig. 1a–f).

Bacterial diversity analysis

We evaluated the bacterial diversity and evenness in *A. Albopictus* from the different sampling sites. Considering all the sampling sites, the Shannon–Weaver (H') index varied from 1.16 to 2.45 and the Simpson diversity ($1/\lambda'$) index varied from 0.63 to 0.89. The Pielou's index (J') was between 0.80 and 0.86 (Table 5). Statistical analyses for all indices showed that there was a significant difference ($P < 0.01$, Tukey) linked to the sex for individuals from Tsimbazaza Park only. In addition, Shannon–Weaver and Simpson diversity indices varied between sampling sites. In particular, significant differences ($P < 0.01$, Tukey) were found between samples from Ankazobe, Mahajanga and Tsimbazaza Park. The regions

Ambohidratrimo and Toamasina had intermediary values (Table 5). No differences in evenness between sampling sites were observed with Pielou's index.

Wolbachia prevalence and density in *A. albopictus*

Usually, *A. albopictus* harbors two *Wolbachia* strains named wAlbA and wAlbB (Sinkins *et al.*, 1995). Diagnostic PCR using *wsp* primers against the subset (685 of a total of 1905) of wild *A. albopictus* revealed double infection in 99% females ($n = 413$) and 98% males ($n = 272$); four females and six males found were singly infected with wAlbB strain (not shown).

Wolbachia's density was estimated by quantitative PCR targeting the *wsp* gene with primers designed to be strain specific toward wAlbA and wAlbB strains and the host gene encoding the cytoskeleton protein actin (Table 2). The relative numbers of bacterial genes per host gene are given as the copy number ratio of *Wolbachia wsp* to host *actin*. Overall, the relative numbers of the wAlbA strain varied from 0 to 5.19 per female (Fig. 4) and from 0 to 1.67×10^{-2} per male (Supporting Information, Fig. S1). The wAlbB

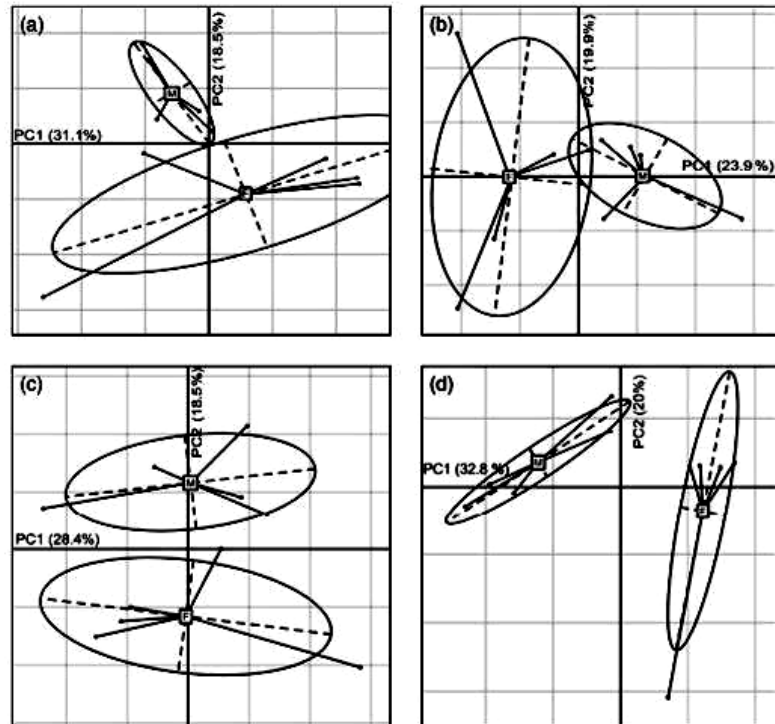


Fig. 2. Principal component analysis (PCA) of male and female *Aedes albopictus* from the same collection site (a–d). F, females; M, males. (a) PCA of individuals from Ambohidratrimo. (b) PCA of individuals from Ankazobe. (c) PCA of individuals from Toamasina. (d) PCA of individuals from Tsimbazaza Park. Individuals are represented by dots. Individuals of the same sex are encircled. The percentage indicated within parentheses corresponds to the variance explained by each principal component.

density was also extremely variable, between 4.56×10^{-4} and 5.16 per female (Fig. 4) and from 9.42×10^{-5} to 1.16 per male (Fig. S2). In general, *Wolbachia* strains *wAlbA* and *wAlbB* were significantly ($P < 0.05$, Tukey) more abundant in females than in males. Interestingly, *Wolbachia*'s density in females varied depending on either the bacterial strains present or the mosquitoes' geographical origin (Fig. 4). The relative density of strain *wAlbA* was significantly higher ($P < 0.05$, Tukey) than that of *wAlbB* in females from Tsimbazaza Park only. The densities of each *Wolbachia* strain in females were compared between sampling sites. Results indicated that *wAlbA* strain was more abundant ($P < 0.05$, Tukey) in Tsimbazaza Park than in Mahajanga, whereas *wAlbB* strain predominated ($P < 0.05$) in Ambohidratrimo compared with Mahajanga and Tsimbazaza Park. Differences in *Wolbachia* densities in males were not statistically significant between sites, probably due to a high interindividual variability.

Discussion

Our data illustrate the current distribution and preferential habitats of *A. albopictus* and *A. aegypti*, two major mosquito vectors of arbovirus, in seven localities of Madagascar (Table 1 and Fig. 3c). *Aedes albopictus* was found to be predominant in urban and suburban areas, whereas *A. aegypti*

specimens were exclusively recovered in sylvan habitats showing weakly anthropophilic behavior (Table 1). In contrast to previous reports showing a high prevalence of *A. aegypti* in Mahajanga (Ravaonjanahary, 1978; Fontenille & Rodhain, 1989), we noted the current dominance of *A. albopictus* in this region. These data are in line with what is known on the undercurrent expansion of *A. albopictus* in Indian Ocean Islands and worldwide, affecting the density of sister taxon *A. aegypti* concomitantly (Salvan & Mouchet, 1994; O'Meara *et al.*, 1995; Delatte *et al.*, 2008; Bagny *et al.*, 2009a, b, c; Paupy *et al.*, 2010).

To examine whether the environment inhabited by the mosquitoes influenced the diversity of bacterial communities associated with wild mosquitoes, DGGE analysis was performed. Profiles varied between individuals and capture sites. This variation could be linked to environmental features, suggesting that some bacterial species that colonize mosquitoes may originate from the environment. Thus, vegetation used as food sources or resting and potential hosts for biting appear to be factors influencing the bacterial community associated with *A. albopictus* and *A. aegypti*. Bacterial communities associated with mosquitoes were mainly studied from laboratory-reared populations, which may not reflect those of wild populations. Indeed, it was shown that field-caught *Anopheles* mosquitoes harbor a greater bacterial diversity than laboratory populations (Rani

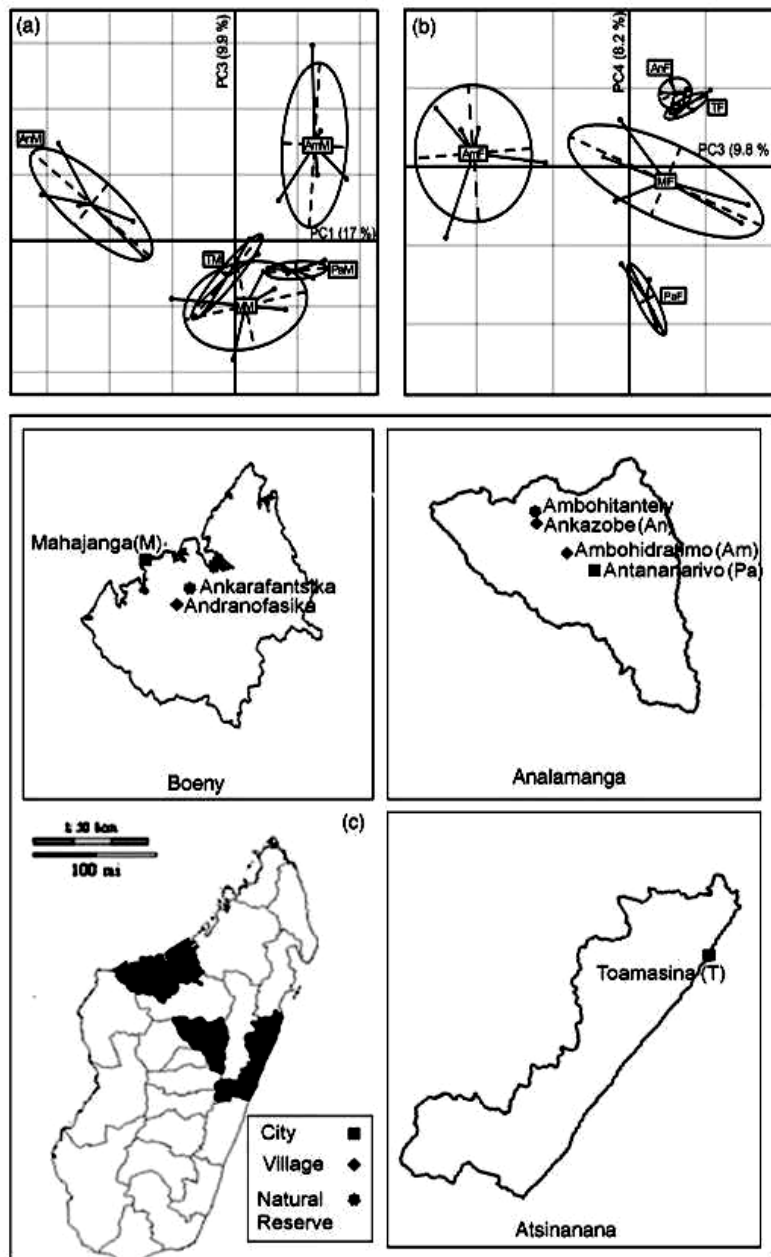


Fig. 3. Principal component analysis (PCA) of *Aedes albopictus* collected from different sites in Madagascar. Individuals are represented by dots. Individuals from the same collection site are encircled. Percentages correspond to the variance explained by each principal component (PC). (a) PCA of *A. albopictus* females. AmF, females from Ambohidratrimo (birds, reptiles); AnF, females from Ankazobe (poultry); MF, females from Mahajanga (ovine and bovine); PaF, females from Tsimbazaza Park (lemurs, birds and reptiles); TF, females from Toamasina (poultry). The two axes explain 17% (PC1) and 9.9% (PC3) of the total variability. (b) PCA of *A. albopictus* males. AmM, males from Ambohidratrimo (bamboo hedge); AnM, males from Ankazobe (bamboo forest); MM, males from Mahajanga; PaM, males from Tsimbazaza Park; TM, males from Toamasina (vegetation of the three cities corresponds to bushes and fruit trees). The two axes explained 9.8% (PC3) and 8.2% (PC4) of the total variability. (c) Map of Madagascar showing sites of *Aedes* collection. The abbreviations used in the map, after names of collection sites, correspond to those used in PCA panels.

et al., 2009). Studies on other insects such as the ground beetle *Poecilus chalcites* have also shown a higher bacterial diversity in wild populations in comparison with those from laboratories (Lehman *et al.*, 2009). In addition, it was demonstrated that either nutrition regime or breeding technique could affect the composition of insects' commensal microbial community (Rani *et al.*, 2009; Zouache *et al.*, 2009a). Conversely, the bacterial populations can influence the behavior and the biology of insect hosts as well (Tsuchi-

da *et al.*, 2004; Moran & Degnan, 2006). Generally, such extended phenotypes issuing from these reciprocal interactions are evidenced in symbioses between insects and their vertically transmitted endosymbiotic bacteria (Buchner, 1965; Moran *et al.*, 2008). Actually, only a few bacterial symbionts horizontally acquired from the environment have been shown to significantly impact the insects' fitness. This is the case of the heteropteran stinkbug *Riptortus clavatus* which acquires the beneficial gut bacterial symbiont

Table 4. Phylogenetic affiliation of sequences obtained from *Aedes* sp. in DGGE analysis

| Mosquito species | Bands | Size (bp) | Accession number | Phylogenetic affiliation | Most closely related organism | Accession number | Similarity (%) |
|-------------------------|--------------------------------|-----------|------------------|----------------------------|---|--|----------------|
| <i>Aedes albopictus</i> | 1; 3; 4; 8a; 42a; 43a | 195 | GU985109 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Acinetobacter genomosp.</i> 3 strain bpoe135 | FN563421.1 | 195/195 (100) |
| | 2; 7a | 194 | GU985110 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pseudomonas putida</i> strain S5 | AB512773.1 | 194/194 (100) |
| | 5; 6; 7b | 195 | GU985111 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. XL-NA | GU290043.1 | 195/195 (100) |
| | 8b | 194 | GU985112 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pantoea agglomerans</i> strain 14 | GQ494018.1 | 191/194 (98) |
| | 8c | 194 | GU985113 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> strain Y1 | GQ268318.1 | 194/194 (100) |
| | 9a; 44a | 194 | GU985114 | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured <i>Citrobacter</i> sp. clone GASP-WA1W3_F04 | AB485746.1 | 193/194 (99) |
| | 9b; 11a; 12; 13 | 194 | GU985115 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Yokenella regensburgei</i> | AB519797.1 | 194/194 (100) |
| | 10a | 194 | GU985116 | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured <i>Citrobacter</i> sp. clone GASP-WA1W3_F04 | AB485746.1 | 194/194 (100) |
| | 10b; 22; 25a; 38; 39 | 169 | GU985117 | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Asaia</i> sp. T-694 | AB485746.1 | 169/169 (100) |
| | 11b | 165 | GU985119 | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Asaia</i> sp. T-694 | AB485746.1 | 165/165 (100) |
| | 11c | 194 | GU985120 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. XL-NA | GU290043.1 | 191/194 (98) |
| | 14a; 15a; 45c; 47 | 194 | GU985121 | <i>Betaproteobacteria</i> | <i>Delftia</i> sp. LP2MM | GU272362.1 | 194/194 (100) |
| | 14b | 169 | GU985122 | <i>Alphaproteobacteria</i> | Uncultured <i>Bradyrhizobium</i> sp. clone PSB011.C21 G01 | GU300452.1 | 169/169 (100) |
| | 14c | 195 | GU985123 | <i>Firmicutes</i> | Uncultured <i>Streptococcaceae</i> bacterium clone Cat008D_G01A | EU5725351.1 | 195/195 (100) |
| | 15b | 194 | GU985124 | <i>Betaproteobacteria</i> | <i>Delftia</i> sp. LP2MM | GU272362.1 | 193/194 (99) |
| | 16a; 21 | 168 | GU985125 | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Asaia</i> sp. T-694 | AB485746.1 | 168/168 (100) |
| | 16b | 194 | GU985126 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Shigella flexneri</i> 2002017 | CP001383.1 | 194/194 (100) |
| | 17; 18; 24; 26; 27; 32-35 | 194 | GU985127 | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured bacterium clone 100p7 | FJ934840.1 | 194/194 (100) |
| | 19; 20; 29; 30; 36; 37; 40; 41 | 169 | GU985150 | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Wolbachia pipientis</i> (host <i>Aedes albopictus</i>) | X61767 | 169/169 (100) |
| | 23 | 194 | GU985129 | <i>Firmicutes</i> | Uncultured bacterium clone FFCH17137 | EU134660.1 | 182/196 (92) |
| | 25b | 171 | GU985131 | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Rickettsia</i> endosymbiont of <i>Hemiclepsis marginata</i> | FJ562342.1 | 171/171 (100) |
| | 28a | 169 | GU985132 | <i>Alphaproteobacteria</i> | Uncultured <i>Rhizobium</i> sp. clone PSB011.C21 | GU300273.1 | 169/169 (100) |
| | 28b | 189 | GU985133 | <i>Bacteroidetes</i> | Uncultured bacterium clone AFYEL_aaj68h06 | EU465158.1 | 182/190 (95) |
| | 31 | 194 | GU985134 | <i>Betaproteobacteria</i> | <i>Herbaspirillum</i> sp. AU13533 | EU549851.1 | 186/194 (95) |
| | 42c; 43c | 194 | GU985135 | <i>Firmicutes</i> | <i>Staphylococcus</i> sp. NT1513.2B | GQ365194.1 | 194/194 (100) |
| | 44b | 194 | GU985136 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Enterobacter</i> sp. GA47-2 | GQ114854.1 | 193/194 (99) |
| | 45a; 46; 49b | 194 | GU985137 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. XL-NA | GU290043.1 | 193/194 (99) |
| | 45b | 194 | GU985138 | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured <i>Citrobacter</i> sp. clone GASP-WA1W3_F04 | AB485746.1 | 191/194 (98) |
| | 48a | 194 | GU985139 | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured <i>Citrobacter</i> sp. clone GASP-WA1W3_F04 | AB485746.1 | 192/194 (98) |
| | 48b | 194 | GU985140 | <i>Betaproteobacteria</i> | <i>Delftia</i> sp. LP2MM | GU272362.1 | 192/194 (98) |
| | 49a | 194 | GU985141 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Enterobacter</i> sp. GA47-2 | GQ114854.1 | 194/194 (100) |
| | | 189 | GU985142 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Enterobacter</i> sp. GA47-2 | GQ114854.1 | 189/189 (100) |
| | <i>Aedes aegypti</i> | 50 | 195 | GU985143 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Acinetobacter genomosp.</i> 13TU strain BL.Ac12 | FJ860871.1 |
| 51 | | 194 | GU985144 | <i>Firmicutes</i> | <i>Staphylococcus saprophyticus</i> strain YSY1-8 | GU197539.1 | 194/195 (99) |
| 52; 54 | | 194 | GU985145 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. ND6 | AY589689.1 | 189/194 (97) |
| 53 | | 194 | GU985146 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Acinetobacter</i> sp. CCGE2017 | EU867306.1 | 193/196 (98) |
| 55a | | 194 | GU985147 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Enterobacter</i> sp. DgG7 | FJ599777.1 | 194/194 (100) |
| 55b | | 194 | GU985148 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. PRB5 | GU223119.1 | 194/194 (100) |
| 56a | | 194 | GU985149 | <i>Gammaproteobacteria</i> | <i>Pseudomonas</i> sp. YM-M-129 | GU220065.1 | 194/194 (100) |
| 57; 58 | | 169 | GU985118 | <i>Alphaproteobacteria</i> | <i>Asaia</i> sp. T-694 | AB485746.1 | 169/169 (100) |
| 59 | | 194 | GU985130 | <i>Firmicutes</i> | Uncultured bacterium clone FFCH17137 | EU134660.1 | 182/196 (92) |
| 60 | | 194 | GU985128 | <i>Gammaproteobacteria</i> | Uncultured bacterium clone 100p7 | FJ934840.1 | 194/194 (100) |

Burkholderia from the environment in each generation (Kikuchi *et al.*, 2007). Other examples consist of gut microbiota that may contribute to nutrition and detoxification of some insects such as termites and the beetle *Tenebrio molitor* (Genta *et al.*, 2006; Warnecke *et al.*, 2007), or provide protection against pathogens in *Lepidoptera* or desert locust (Dillon & Charnley, 2002; Raymond *et al.*, 2008, 2009), albeit the environmental origin of these microbiota was not clearly established. Altogether, these studies highlighted the importance of taking into account environmental factors such as ecological niches when analyzing symbiotic micro-

biota associated with wild animal populations. Whether the bacterial communities found here may contribute to adaptive behavior and successful invasion of *A. albopictus* is under investigation.

At the genus level, several bacteria detected in this study are commonly described in soil and some have been found in hematophagous species of *Culicidae*, including *A. triseriatus* (Demaio *et al.*, 1996), *Culicoides sonorensis* (Campbell *et al.*, 2004), *Culex quinquefasciatus* (Pidiyar *et al.*, 2004), *Anopheles darlingi* (Terenius *et al.*, 2008), *Anopheles gambiae* (Dong *et al.*, 2009), *A. albopictus* (Zouache *et al.*, 2009b) and *A. aegypti* (Gusmao *et al.*, 2007, 2010; Crotti *et al.*, 2009). Intriguingly, three genera, *Acinetobacter*, *Asaia* and *Pseudomonas*, that are known to contain cultivable species were constantly found in the two species studied here. This suggests either a continuous acquisition through the environment or a vertical inheritance through generations. Interestingly, the genus *Asaia* was previously found in laboratory-reared *Anopheles stephensi* and *A. aegypti*, as well as in wild *A. gambiae* where it was demonstrated to be transmitted vertically (Favia *et al.*, 2007; Crotti *et al.*, 2009; Damiani *et al.*, 2010). Our results are the first description of *Asaia* sp. in natural populations of both *A. albopictus* and *A. aegypti*. The ability of *Asaia* to be inherited both paternally and maternally is attracting attention as a potential candidate for blocking transmission of mosquito-borne pathogens through paratransgenesis (Favia *et al.*, 2008). Functions have been suggested for some of the other bacterial genera isolated here. The genus *Bacillus* may probably be involved in cellulose and hemicellulose degradation in termites (reviewed in König, 2006). Members of the *Enterobacteriaceae*

Table 5. Diversity indices and evenness values of *Aedes albopictus*

| Location | Sex | H' * | $1/\lambda'$ † | J' ‡ |
|-----------------|-----|-------------|----------------|-------------|
| Mahajanga | F | 1.82 ± 0.53 | 0.78 ± 0.13 | 0.81 ± 0.01 |
| | M | 1.54 ± 0.30 | 0.73 ± 0.10 | 0.81 ± 0.07 |
| Ambohidratrimo | F | 1.97 ± 0.24 | 0.83 ± 0.04 | 0.84 ± 0.02 |
| | M | 2.04 ± 0.08 | 0.85 ± 0.01 | 0.86 ± 0.04 |
| Ankazobe | F | 2.07 ± 0.12 | 0.84 ± 0.03 | 0.83 ± 0.04 |
| | M | 2.45 ± 0.24 | 0.89 ± 0.03 | 0.86 ± 0.02 |
| Toamasina | F | 1.89 ± 0.34 | 0.80 ± 0.07 | 0.80 ± 0.04 |
| | M | 1.97 ± 0.14 | 0.83 ± 0.03 | 0.86 ± 0.07 |
| Tsimbazaza Park | F | 1.16 ± 0.47 | 0.63 ± 0.01 | 0.76 ± 0.07 |
| | M | 1.95 ± 0.33 | 0.82 ± 0.07 | 0.83 ± 0.04 |

Values are mean values ± SEs.

*Shannon–Weaver diversity index ($H' = -\sum P_i \log P_i$).

†Simpson diversity index ($1/\lambda' = 1 / \sum \{N_i(N_i - 1)\} / \{N(N - 1)\}$).

‡Estimation of the evenness of the number of bacterial species in each sample.

Pielou's index ($J' = H'/\log S = H'/\log H'_{max}$).

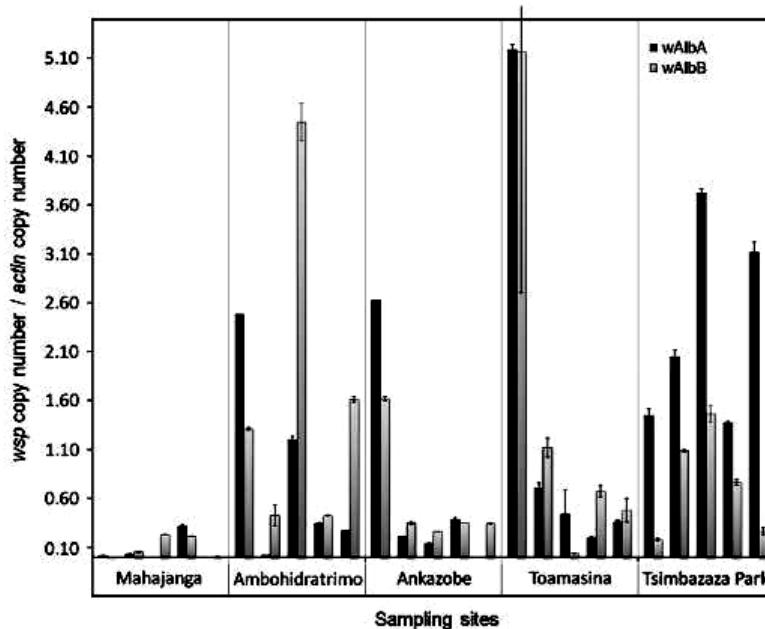


Fig. 4. Relative density of *Wolbachia* in *Aedes albopictus* females from different sites in Madagascar. The relative numbers of *Wolbachia* are given as the copy number ratio of *wsp* to host *actin*. *wAlbA* (black) and *wAlbB* (grey) strains were measured in five female individuals per sampling site. Bars indicate SEs.

family are thought to provide an additional nitrogen source to the fruit fly *Ceratitis capitata* (Behar *et al.*, 2005). A recent study has shown that an *Acinetobacter* sp. strain is able to inhibit a tobacco mosaic virus by producing an antiviral compound (Lee *et al.*, 2009). Many other groups of bacteria detected for the first time in mosquitoes perform unknown functions. A better knowledge of the mosquito-associated bacteria will allow investigating their role in the host biology.

Usually, natural populations of *A. albopictus* have been found singly or doubly infected with *Wolbachia* (Kittayapong *et al.*, 2000, 2002; Tortosa *et al.*, 2010). When associated with *A. albopictus*, *Wolbachia* manipulates the reproduction of its host, inducing a density-dependent cytoplasmic incompatibility phenomenon, which increases the proportion of infected individuals in the population (Sinkins *et al.*, 1995; Dobson *et al.*, 2001). Interestingly, *Wolbachia* was recently demonstrated to inhibit mosquito-borne pathogens in some circumstances (Moreira *et al.*, 2009; Bian *et al.*, 2010; Glaser & Meola, 2010). Here, the survey of *Wolbachia* in *A. albopictus* wild populations revealed a high rate of double infection by *Wolbachia* wAlbA and wAlbB strains in both sexes. The densities of the two *Wolbachia* strains varied depending on the sex and the sampling region. These results are in accordance with previous data on high variability in *Wolbachia* densities in field populations (Ahantari *et al.*, 2008; Unckless *et al.*, 2009). A few cases of single infection by wAlbB were also detected both in males and in females (Fig. 4). Loss of wAlbA strain in *A. albopictus* males' aging in the laboratory was recently reported in previously doubly infected populations from the Reunion island (Tortosa *et al.*, 2010). Surprisingly, a different pattern was found in field populations of *A. albopictus* from Thailand, where single infection consists of either *Wolbachia* wAlbA or wAlbB strains (Kittayapong *et al.*, 2000; Ahantari *et al.*, 2008), suggesting that different factors may account for the prevalence of *Wolbachia* in this mosquito species, which in turn could potentially interfere with the extended population phenotype.

In conclusion, the results presented here highlight the link between the habitats and the bacterial diversity of wild mosquitoes. As pathogens transmitted by mosquitoes coexist with associated bacteria that can affect insect population dynamics and vectorial competence, characterizing the bacterial composition and diversity of *A. albopictus* and *A. aegypti* in their environment is a step forward in understanding the ecology and the multipartite interactions occurring in these two major vectors of arbovirus.

Acknowledgements

This paper is dedicated to the memory of Dr Jesus Caballero-Mellado (Centro de Ciencia Genómica, Cuernavaca, Morelos, Mexico) who left us in October 2010. We are grateful to Madagascar National Parks (formerly ANGAP)

for authorizing collection of wild mosquitoes and to Biofidal-DTAMB Laboratory of IFR41 in University Lyon 1 for technical assistance. K.Z. was supported by PhD fellowships from the French Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et des Nouvelles Technologies. F.N.R. was supported by the Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB, formerly IFB). This work was funded by grants ANR-06-SEST07 and FRB-CD-AOOI-07-012, and was carried out within the frameworks of GDRI 'Biodiversité et Développement Durable à Madagascar' and COST action F0701 'Arthropod Symbioses: from fundamental to pest disease management'.

References

- Ahantari A, Trinachartvanit W & Kittayapong P (2008) Relative *Wolbachia* density of field-collected *Aedes albopictus* mosquitoes in Thailand. *J Vector Ecol* **33**: 173–177.
- Aksoy S & Rio RV (2005) Interactions among multiple genomes: tsetse, its symbionts and trypanosomes. *Insect Biochem Molec* **35**: 691–698.
- Bagny L, Delatte H, Elissa N, Quilici S & Fontenille D (2009a) *Aedes* (Diptera: Culicidae) vectors of arboviruses in Mayotte (Indian Ocean): distribution area and larval habitats. *J Med Entomol* **46**: 198–207.
- Bagny L, Delatte H, Quilici S & Fontenille D (2009b) Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. *J Med Entomol* **46**: 1541–1545.
- Bagny L, Freulon M & Delatte H (2009c) First record of *Aedes albopictus*, vector of arboviruses in the Eparsé Islands of the Mozambique Channel and updating of the inventory of *Culicidae*. *B Soc Pathol Exot* **102**: 193–198.
- Behar A, Yuval B & Jurkevitch E (2005) *Enterobacteria*-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Mol Ecol* **14**: 2637–2643.
- Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y & Xi Z (2010) The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog* **6**: e1000833.
- Bruce KD, Hiorns WD, Hobman JL, Osborn AM, Strike P & Ritchie DA (1992) Amplification of DNA from native populations of soil bacteria by using the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microb* **58**: 3413–3416.
- Buchner P (1965) *Endosymbiosis of Animals with Plant Microorganisms*. Interscience, New York.
- Campbell CL, Mummey DL, Schmidtman ET & Wilson WC (2004) Culture-independent analysis of midgut microbiota in the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae). *J Med Entomol* **41**: 340–348.
- Cheng Q & Aksoy S (1999) Tissue tropism, transmission and expression of foreign genes *in vivo* in midgut symbionts of tsetse flies. *Insect Mol Biol* **8**: 125–132.
- Crotti E, Damiani C, Pajoro M *et al.* (2009) *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environ Microbiol* **11**: 3252–3264.

- Damiani C, Ricci I, Crotti E et al. (2010) Mosquito–bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microb Ecol* 60: 1–11.
- Delatte H, Dehecq JS, Thiria J, Domerg C, Paupy C & Fontenille D (2008) Geographic distribution and developmental sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) during a Chikungunya epidemic event. *Vector Borne Zoonot* 8: 25–34.
- Demais J, Pumpuni CB, Kent M & Beier JC (1996) The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psorophora columbiae* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* 54: 219–223.
- Dillon R & Charnley K (2002) Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota. *Res Microbiol* 153: 503–509.
- Dobson SL, Marsland EJ & Rattanadechakul W (2001) *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in single- and superinfected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 38: 382–387.
- Dong Y, Manfredini P & Dimopoulos G (2009) Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog* 5: e1000423.
- Parikou O, Njikou F, Mbida Mbida JA et al. (2010) Tripartite interactions between tsetse flies, *Sodalis glossinidius* and trypanosomes – an epidemiological approach in two historical human African trypanosomiasis foci in Cameroon. *Infect Genet Evol* 10: 115–121.
- Favia G, Ricci I, Damiani C et al. (2007) Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *P Natl Acad Sci USA* 104: 9047–9051.
- Favia G, Ricci I, Marzorati M, Negri I, Alma A, Sacchi L, Bandi C & Daffonchio D (2008) Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. *Adv Exp Med Biol* 627: 49–59.
- Fontenille D & Rodhain F (1989) Biology and distribution of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Madagascar. *J Am Mosquito Contr* 5: 219–225.
- Geiger A, Fardeau ML, Grebaut P et al. (2009) First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infect Genet Evol* 9: 1364–1370.
- Genta FA, Dillon RJ, Terra WR & Ferreira C (2006) Potential role for gut microbiota in cell wall digestion and glucoside detoxification in *Tenebrio molitor* larvae. *J Insect Physiol* 52: 593–601.
- Glaser RL & Meola MA (2010) The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. *PLoS One* 5: e11977.
- Gottlieb Y, Zchori-Fein E, Mozes-Daube N et al. (2010) The transmission efficiency of Tomato yellow leaf curl virus by the whitefly *Bemisia tabaci* is correlated with the presence of a specific symbiotic bacterium species. *J Virol* 84: 9310–9317.
- Gusmao DS, Santos AV, Marini DC, Russo Ede S, Peixoto AM, Bacci Junior M, Berbert-Molina MA & Lemos FJ (2007) First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect–bacteria association. *Mem I Oswaldo Cruz* 102: 919–924.
- Gusmao DS, Santos AV, Marini DC, Bacci M Jr, Berbert-Molina MA & Lemos FJ (2010) Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop* 115: 275–281.
- Kikuchi Y, Hosokawa T & Fukatsu T (2007) Insect–microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl Environ Microb* 73: 4308–4316.
- Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V & O'Neill SL (2000) Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 37: 340–345.
- Kittayapong P, Baimai V & O'Neill SL (2002) Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg* 66: 108–111.
- Konig H (2006) *Bacillus* species in the intestine of termites and other soil invertebrates. *J Appl Microbiol* 101: 620–627.
- Lee JS, Lee KC, Kim KK, Hwang IC, Jang C, Kim NG, Yeo WH, Kim BS, Yu YM & Ahn JS (2009) *Acinetobacter antiviralis* sp. nov., from Tobacco plant roots. *J Microbiol Biotechnol* 19: 250–256.
- Lehman RM, Lundgren JG & Petzke LM (2009) Bacterial communities associated with the digestive tract of the predatory ground beetle, *Poecilus chalcites*, and their modification by laboratory rearing and antibiotic treatment. *Microb Ecol* 57: 349–358.
- Moran NA & Degnan PH (2006) Functional genomics of *Buchnera* and the ecology of aphid hosts. *Mol Ecol* 15: 1251–1261.
- Moran NA, McCutcheon JP & Nakabachi A (2008) Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet* 42: 165–190.
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA et al. (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139: 1268–1278.
- Moya A, Pereto J, Gil R & Latorre A (2008) Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nat Rev Genet* 9: 218–229.
- Muyzer G, de Waal EC & Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microb* 59: 695–700.
- Oliver KM, Degnan PH, Burke GR & Moran NA (2010) Facultative symbionts in aphids and the horizontal transfer of ecologically important traits. *Annu Rev Entomol* 55: 247–266.
- O'Meara GE, Evans LF Jr, Gettman AD & Cuda JP (1995) Spread of *Aedes albopictus* and decline of *Ae. aegypti* (Diptera: Culicidae) in Florida. *J Med Entomol* 32: 554–562.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AM, Karr TL & Robertson HM (1992) 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *P Natl Acad Sci USA* 89: 2699–2702.

- Paupy C, Ollomo B, Kamgang B *et al.* (2010) Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. *Vector Borne Zoonot* **10**: 259–266.
- Pidiyar VJ, Jangid K, Patole MS & Shouche YS (2004) Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis. *Am J Trop Med Hyg* **70**: 597–603.
- Pumpuni CB, Demajo J, Kent M, Davis JR & Beier JC (1996) Bacterial population dynamics in three anopheline species: the impact on Plasmodium sporogonic development. *Am J Trop Med Hyg* **54**: 214–218.
- Randrianasolo L, Raelina Y, Ratsitorahina M, Ravolomanana L, Andriamandimby S, Heraud JM, Rakotomanana F, Ramanjato R, Randrianarivo-Solofoniaina AE & Richard V (2010) Sentinel surveillance system for early outbreak detection in Madagascar. *BMC Public Health* **10**: 31.
- Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T & Bhatnagar RK (2009) Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi* – an Asian malarial vector. *BMC Microbiol* **9**: 96.
- Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J *et al.* (2008) Outbreak of dengue and Chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis* **14**: 1135–1137.
- Ravaonjanahary C (1978) *Les Aedes de Madagascar*. Travaux et documents de l'ORSTOM, France.
- Raymond B, Lijek RS, Griffiths RI & Bonsall MB (2008) Ecological consequences of ingestion of *Bacillus cereus* on *Bacillus thuringiensis* infections and on the gut flora of a lepidopteran host. *J Invertebr Pathol* **99**: 103–111.
- Raymond B, Johnston PR, Wright DJ, Ellis RJ, Crickmore N & Bonsall MB (2009) A mid-gut microbiota is not required for the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* to diamondback moth larvae. *Environ Microbiol* **11**: 2556–2563.
- Salvan M & Mouchet J (1994) *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* at Ile de la Reunion. *Ann Soc Belg Med Tr* **74**: 323–326.
- Sang RC, Ahmed O, Faye O *et al.* (2008) Entomologic investigations of a chikungunya virus epidemic in the Union of the Comoros, 2005. *Am J Trop Med Hyg* **78**: 77–82.
- Schuffenecker I, Iteman I, Michault A *et al.* (2006) Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* **3**: e263.
- Sinkins SP, Braig HR & O'Neill SL (1995) *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc Biol Sci* **261**: 325–330.
- Straif SC, Mbogo CN, Toure AM, Walker ED, Kaufman M, Toure YT & Beier JC (1998) Midgut bacteria in *Anopheles gambiae* and *An. funestus* (Diptera: Culicidae) from Kenya and Mali. *J Med Entomol* **35**: 222–226.
- Terenius O, de Oliveira CD, Pinheiro WD, Tadei WP, James AA & Marinotti O (2008) 16S rRNA gene sequences from bacteria associated with adult *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *J Med Entomol* **45**: 172–175.
- Tortosa P, Courtiol A, Moutailler S, Failloux AB & Weill M (2008) Chikungunya–*Wolbachia* interplay in *Aedes albopictus*. *Insect Mol Biol* **17**: 677–684.
- Tortosa P, Charlat S, Labbe P, Dehecq JS, Barre H & Weill M (2010) *Wolbachia* age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: a host evolutionary response to cytoplasmic incompatibility? *PLoS One* **5**: e9700.
- Tsuchida T, Koga R & Fukatsu T (2004) Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* **303**: 1989.
- Unckless RL, Boelio LM, Herren JK & Jaenike J (2009) *Wolbachia* as populations within individual insects: causes and consequences of density variation in natural populations. *Proc Biol Sci* **276**: 2805–2811.
- Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D *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**: e1168.
- Warnecke F, Luginbuhl P, Ivanova N *et al.* (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* **450**: 560–565.
- Zhou W, Rousset F & O'Neil S (1998) Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc Biol Sci* **265**: 509–515.
- Zouache K, Voronin D, Tran-Van V & Mavingui P (2009a) Composition of bacterial communities associated with natural and laboratory populations of *Asobara tabida* infected with *Wolbachia*. *Appl Environ Microb* **75**: 3755–3764.
- Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mousson L, Failloux AB & Mavingui P (2009b) Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One* **4**: e6388.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Fig. S1. Relative density of *Wolbachia* wAlbA in *Aedes albopictus* males from different collection sites in Madagascar.
Fig. S2. Relative density of *Wolbachia* wAlbB in *Aedes albopictus* males from different sites in Madagascar.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

3- Publication N°2

Détection moléculaire de *Wolbachia* dans des populations naturelles de moustiques, *Culex antennatus*, *Culex decens*, *Culex quinquefasciatus*, et *Mansonia uniformis* de Madagascar

Auteurs : Fara N. RAHARIMALALA^{1, 2}, Van TRAN-VAN¹, Lala H. RAVAOMANARIVO², Bakoly O. RALISOA², Patrick MAVINGUI^{1*}

Résumé

Wolbachia, une bactérie intracellulaire obligatoire des invertébrés et transmis verticalement, infecte la plupart des insectes. Cette bactérie est surtout connue pour sa capacité à manipuler la reproduction de ses hôtes, principalement par induction de l'incompatibilité cytoplasmique (CI), pour augmenter sa diffusion dans les populations. Cependant, des travaux récents ont montré que *Wolbachia* est aussi capable d'interférer avec la multiplication ou la transmission de différents pathogènes comme le *Plasmodium gallicum* et les virus de la dengue et du chikungunya, chez les insectes infectés. Connaître la présence et la prévalence de *Wolbachia* dans les populations naturelles de moustiques est devenue nécessaire avant d'envisager son utilisation. Si la présence de *Wolbachia* dans le complexe *Culex pipiens* a été largement étudiée, elle est très peu connue dans les autres espèces de *Culex*. A Madagascar, une réémergence d'épidémie de la fièvre de la vallée du Rift a sévi en 2009. Il a été mis en évidence que les genres *Culex* et *Mansonia* jouent un rôle primordial dans la transmission de cet arbovirus. Or, à ce jour, aucune étude n'avait été menée sur la caractérisation de la présence de *Wolbachia* dans ces deux genres à Madagascar. Dans cette étude, nous avons exploré la présence de *Wolbachia* dans les espèces *Culex antennatus*, *Culex decens*, *Culex quinquefasciatus* ainsi que *Mansonia uniformis*. Parmi les trois espèces de *Culex*, seule l'espèce *C. antennatus* est dépourvue de *Wolbachia*. Les espèces *Culex decens* et *Culex quinquefasciatus* sont infectés par la souche *Wolbachia* du clade B. A notre connaissance, l'infection par *Wolbachia* est ici mise en évidence pour la première fois chez *C. decens*. Enfin, les résultats

montrent que l'espèce *Mansonia uniformis* est bi-infectée par les souches de *Wolbachia* des clades A et B.

Mots clés : Endosymbionte, *Wolbachia*, prévalence, *Culex* spp, *Mansonia uniformis*, Madagascar.

Introduction

Ces dernières années, des émergences et des réémergences de nombreux arboviroses ont été constatées dans l'Europe et l'Océan Indien entre 2004 et 2007 à cause de l'accroissement des mouvements et échanges humains (Adams et Kapan, 2009) ainsi que l'effet du changement climatique global (Pachauri et Reisinger, 2007 ; Barclay, 2008). En l'absence de vaccins efficaces contre la plupart de ces arboviroses, la lutte antivectorielle demeure la méthode de choix et les insecticides chimiques le moyen le plus utilisé. Cependant, ces composés présente une forte rémanence environnementale et engendrent des dégâts écologiques sur les espèces non cibles. De plus, les moustiques développent de plus en plus de résistance vis-à-vis des produits utilisés (Hemingway *et al.*, 2004). Ces dernières années, la lutte biologique par l'utilisation d'endosymbiontes capables d'interférer avec la dynamique de transmission est envisagée comme méthode alternative, et les communautés bactériennes endosymbiotiques sont considérées comme des candidats à fort potentiel (Werren, 2008 ; Saridaki et Bourtzis, 2010)

Tous les insectes hébergent de nombreux microorganismes dont le nombre excède celui de leurs propres cellules (Dillon and Dillon, 2004). A ce jour, les études visant à décrire le rôle biologique des microorganismes associés aux insectes se sont principalement limitées aux interactions mutualistes entre bactéries et insectes phytophages. Il est en effet démontré que les communautés bactériennes sont capables de modifier le développement de ces insectes, leur permettant d'envahir rapidement les populations hôtes et de conduire à terme l'évolution des espèces. Plus précisément, les bactéries symbiotiques joueraient un rôle essentiel dans la croissance, le développement, la pathogénèse et l'adaptation environnementale de leurs hôtes (Buchner, 1965 ; Moran *et al.*, 2008 ; Moya *et al.*, 2008). Aussi surprenant que cela puisse paraître, la nature et l'impact du microbiote sur l'écophysiologie des insectes hématophages ont été peu étudiés. Les travaux les mieux documentés concerne *Wolbachia pipientis*, bactérie intracellulaire obligatoire, appartenant aux Alphaprotéobactéries à Gram négatif (Dumler *et al.*, 2001). Identifiée pour la première fois chez les moustiques du complexe *Culex pipiens* (L.) (Herting & Wolbach,

1924), *Wolbachia* infecte la plupart des invertébrés, incluant les insectes, les araignées, les acariens, les crustacés isopodes et les nématodes (O'Neill et al., 1992 ; Bouchon et al., 1998 ; Anderson et al., 2001 ; Iturbe-Ormaetxe et al., 2007 ; Saridaki & Bourtzis, 2010). De nombreux travaux ont mis en évidence différents effets de *Wolbachia* chez les organismes hôtes, tels l'incompatibilité cytoplasmique, la féminisation, la parthénogenèse, et le mâle-killing (Werren, 2008). Ces effets conduisent généralement à la diffusion et la persistance de *Wolbachia* dans les populations hôtes; plus de 66% d'espèces d'arthropodes sont infectés par cette bactérie (Werren et al. 1995a ; Jeyaprakash & Hoy, 2000 ; Hilgenboecker et al., 2008). Fait étonnant, des travaux récents ont montré que *Wolbachia* était capable d'interférer avec la multiplication ou la transmission de différents pathogènes comme le *Plasmodium gallicum* et les virus de la dengue et du chikungunya, chez les moustiques infectés ouvrant ainsi des voies à des applications potentielles (Moreira et al., 2009 ; Kambris et al., 2009 ; Bian et al., 2010 ; Glaser et al., 2010). Cependant, étant donné l'existence de multiinfections pouvant conduire à des phénomènes d'incompatibilité cytoplasmique, l'utilisation de *Wolbachia* comme inhibiteur ou modulateur de la transmission vectorielle demande une connaissance préalable du statut d'infection dans les populations naturelles.

Il est connu que *Wolbachia* infecte tous les individus des espèces du complexe *Culex pipiens* avec une prévalence importante de mono-infection par la souche *Wolbachia* du clade B (Sinkins et al., 1995). A Madagascar, la prévalence de *Wolbachia* a été principalement étudiée dans les populations naturelles d'*Aedes albopictus* (Zouache et al., 2011). Par contre, peu d'études ont été menées sur les autres espèces de *Culex* ainsi que chez l'espèce de *Mansonia uniformis*. Cette étude explore la prévalence de *Wolbachia* dans les populations naturelles de *Culex antennatus*, *Culex decens*, *Culex quinquefasciatus* et *Mansonia uniformis* provenant de plusieurs sites de Madagascar par des méthodes moléculaires utilisant des amplifications PCR et le séquençage d'ADN génomique.

Matériel et méthodes

Capture des moustiques

Les moustiques adultes nocturnes ont été capturés durant la période d'Octobre 2007 à Octobre 2009 sur différents sites de Madagascar (Figure 1 ; Raharimalala et al., 2011). La méthode utilisée pour capturer les moustiques est une méthode dite «parc à zébus». Elle consiste à mettre un large tulle maintenu par des piquets autour d'une étable en laissant un espace d'un mètre entre la

barrière et le tulle pour permettre la circulation des captureurs à l'intérieur et un espace de 20cm entre le sol et le tulle, pour permettre l'entrée des moustiques (Figure 2). Les moustiques femelles se nourrissent sur les zébus et viennent se poser sur le tulle quand elles sont repues. Les captureurs les attrapent à l'aide d'un aspirateur à bouche et les stockent dans des gobelets en cartons, fermés par un tulle maintenu par un élastique. Le nombre de femelles par gobelet a été maintenu à 15 pour réduire la compétition entre individus et la mortalité. Un coton humidifié d'eau sucrée à 6 % est mis à la disposition des moustiques pour les maintenir en vie jusqu'à leur utilisation. Les gobelets sont disposés dans une glacière pour maintenir une température stable. Les moustiques capturés sont triés, puis séparés par espèce, date de capture, site, sexe. Ils sont ensuite stockés, soit dans du silicagel pour être séchés soit dans de l'alcool à 70°.

Extraction d'ADN de moustiques

L'extraction d'ADN génomique a été effectuée par individu entier par une méthode classique (Zouache et al., 2009). Brièvement, chaque individu en entier est désinfecté à l'alcool, rincé 5 fois à l'eau stérile, puis broyé à l'aide d'un broyeur électrique et de billes en inox de 5mm de diamètre (VWR, France) dans un tampon de lyse à base de CTAB (bromure d'hexadécyltriméthylammonium) préchauffé à 60°C. Après centrifugation, le surnageant est récupéré. Par la suite, les protéines sont éliminées par une extraction au phénol/chloroforme/alcool isoamylique (25/24/1), puis l'ADN est précipité en présence d'isopropanol. Le culot de l'ADN a été repris dans 40 µl de tampon.

Amplification PCR et séquençage

Plusieurs couples d'amorces (Tableau 1) ont été testés pour détecter la présence de *Wolbachia* dans les ADN extraits. La qualité de l'ADN a été éprouvée par amplification du gène 16S rRNA généraliste des bactéries à l'aide des amorces pA et pH. Ces amorces étant utilisées pour cibler la quasi-totalité (1500 pb) du gène 16S rRNA de l'ensemble des bactéries (Bruce et al., 1992). Seuls les échantillons positifs en PCR 16S ont été utilisés pour la recherche de *Wolbachia*. Les amorces *Wolbachia* genre-spécifiques comprennent le couple 99F/1994R qui amplifie un fragment d'environ 864 bp du gène 16S spécifique de *Wolbachia* (O'Neill et al., 1992), et 81F/691R qui génère un fragment de 600 pb du gène *wsp* codant une protéine membranaire de *Wolbachia*. La discrimination des clades a été effectuée avec les amorces spécifiques 328F/691R amplifiant un fragment de 379pb du gène *wsp*, et 183F/691R amplifiant un fragment de 500 pb du même gène du

clade B (Zhou et al., 1998). Les amplifications PCR ont été réalisées à partir de 30 ng d'ADN de moustique comme matrice. Les produits de PCR ont été migrés sur gel d'agarose 1% (wt:vol), puis colorés à l'aide du bromure d'éthidium et photographiés avec l'appareil Gel Doc 2000 system (BioRad, USA). Les produits PCR présentant des bandes de taille attendu ont été soumis au séquençage à BIOFIDAL-DTAMB (FR BioEnvironment and Health, Lyon, France).

Résultats

Détection de *Wolbachia* dans espèces étudiées

Un total de 117 individus a été utilisé pour l'étude de la prévalence de *Wolbachia*. Excepté l'espèce *Mansonia uniformis* dont seuls 3 échantillons sur les 19 étaient positifs en pour le gène 16S rRNA généraliste des bactéries, tous les autres échantillons testés (34 *Culex antennatus*, 22 *Culex decens*, 42 *Culex quinquefasciatus*, et 19 *Mansonia uniformis*) avaient été positifs (Tableau 2) ce qui témoigne de la bonne qualité des extractions d'ADN. Les amplifications genre-spécifique ont permis détecter des bandes de taille attendue dans la majorité des individus de *Culex decens* (71.4%) et *Culex quinquefasciatus* (95.5%). Des bandes de *Wolbachia* ont été également obtenues avec les échantillons des 3 individus de *Mansonia uniformis* dont les ADNs étaient de bonne qualité. Aucun signal de *Wolbachia* n'a été détecté dans les 34 échantillons de *Culex antennatus*.

Présence de multi-infection à *Wolbachia*

Etant donnée la co-existence de plusieurs clades de *Wolbachia* chez certains insectes, y compris les moustiques comme *Aedes albopictus* (Zouache et al., 2009), nous avons recherché les souches de *Wolbachia* wAlbA et wAlbB dans les populations capturées par amplification du gène *wsp* à l'aide des amorces souche-spécifique. Dans la littérature, il a été rapporté que le complexe *Culex pipiens* n'est infecté que par la souche wAlbB (Zhou et al., 1998). Nous avons pu confirmer cette mono-infection à wAlbB non seulement chez les individus de *Culex quinquefasciatus* mais aussi chez ceux de *Culex decens* (Tableau 2). Par contre, sur les 3 individus de *Mansonia uniformis* portent un bi-infections aux wAlbA et wAlbB (Tableau 2), ce résultat est similaire aux données des populations naturelles de *Mansonia uniformis* de Taiwan (Tsai et al., en 2004). Le séquençage des amplifiats PCR a confirmé l'ensemble des amplifications tant au niveau du genre que des souches de *Wolbachia* (Données Non présentées).

Discussion et conclusion

Cette étude a permis de démontrer que sur les quatre espèces de moustiques de Madagascar capturés sur terrains, trois sont naturellement infectées par *Wolbachia* avec une prévalence forte chez *Culex decens* (95,5%), suivi de *Culex quinquefasciatus* (71,4%) puis de *Mansonia uniformis* (15,8%). Cependant, chez ce dernier seuls 3 échantillons sur 19 étaient de bonne qualité, cette prévalente mériterait d'être analysé de nouveau. Ce résultat confirme les données antérieures qui stipulent que cette bactérie se rencontre communément dans la plupart des populations naturelles des moustiques (Sinkins et al. 1995, Kittayapong et al., 2000, Tsai et al., 2004).

L'infection de *Culex decens* par *Wolbachia* est ici rapportée pour la première fois puisque, à notre connaissance, aucune donnée de la littérature ne mentionne la présence de cette bactérie chez cette espèce. Les amplifications avec la souche spécifique du gène *wsp* codant la protéine membranaire de *Wolbachia*, a permis d'avancer que *Culex decens* est mono-infecté par la souche de *Wolbachia* du clade B. Ce résultat corrobore les études antérieures qui ont démontré que la plupart des espèces de *Culex* sont mono-infectées par la souche *wAlbB* (Zhou et al., 1998 ; Tsai et al., 2004). L'espèce *Mansonia uniformis* est, quant à elle, bi-infectée par les souches de *Wolbachia* des clades A et B. Les deux souches de *Wolbachia* infectent également la plupart des populations d'*Aedes albopictus*, y compris celle de Madagascar (Zouache et al., 2011). La multiinfection par *Wolbachia* est une situation souvent rencontrée chez de nombreux insectes hôtes (Breeuwer et al. 1992, Rousset et al. 1992, Rousset and Solignac 1995 ; Tsai et al., 2004).

Cependant, tous les 34 individus testés de *Culex antennatus* sont dépourvus de *Wolbachia* alors que ces les amplifications du gène 16S rRNA étaient toutes positives, témoignant de la présence d'autres bactéries endosymbiotiques. L'absence de *Wolbachia* a déjà été rapportée dans plusieurs taxons de moustiques, incluant le vecteur du paludisme *Anopheles gambiae* Giles (Brown et al. 2001). Cette absence pourrait être expliquée par différents facteurs : les filtres de rencontre, une perte de la bactérie au cours de l'évolution consécutive à une transmission non optimale ou une compétition pour les ressources et l'espace (West et al. 1998, Kittayapong et al. 2000). Si l'existence de filtre de rencontre est souvent difficile à démontrer, les phénomènes de perte de *Wolbachia* par certains insectes y compris les moustiques ont pu avoir lieu comme le témoigne la découverte des gènes ou fragments du génome de la bactérie dans le génome des hôtes (Kondo et al., 2002 ; Hotopp et al., 2007).

En conclusion, nos résultats nous ont permis de confirmer la présence de *Wolbachia* chez les deux espèces de *Culex* (*Culex decens* et *Culex quinquefasciatus*), et de détecter pour la première fois la bactérie chez *Culex decens* alors que l'espèce *Culex antennatus* en est dépourvue. Les souches de *Wolbachia* wAlbAet wAlbB détectées chez les espèces étudiées sont connues pour induire l'incompatibilité cytoplasmique. Comme pour d'autres insectes, ce phénomène doit participer à la dynamique des populations des espèces infectées. De plus, des récents travaux ont montré que la souche wPip du clade A était capable de diminuer la densité de parasite de filaire chez *Culex pipiens*. La nature précise des interactions que *Wolbachia* établie avec les espèces étudiées mérite d'être explorée.

Remerciements

Les auteurs remercient toutes les personnes qui ont autorisé la capture nocturne dans leurs étables ainsi que dans les hôpitaux. La thèse de FNR a été financée par La Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB, ancien IFB, contrat FRB-CD-AOOI-07-012). Ce travail a été conduit dans le cadre du GDRI "Biodiversité et Développement Durable à Madagascar" et COST action F0701 "Arthropod Symbioses: from fundamental to pest disease management".

Références

- Adams B and Kapan DD. 2009. Man bites mosquito: understanding the contribution of human movement to vector-borne disease dynamics. PLoS One **4**: e6763.
- Anderson CL, Karr TL. 2001. *Wolbachia*: Evolutionary novelty in a rickettsial bacterium. BMC Evol Biol **1**: 10.
- Barclay E. 2008. Is climate change affecting dengue in the Americas?, Lancet **371** : 973–974
- Bian G, Y Xu, P Lu, Y Xie, and Z Xi. 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. PLoS Pathog **6**:e1000833.
- Bouchon D, Rigaud T, Juchault P. 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod curstaceans: molecular identification and host feminization. Proc. R. Soc. Lond B. **265**: 10–81-10-90.
- Breeuwer JAJ, Stouthamer R, Barns SM, Pelletier DA, Weisburg WG, and Werren JH. 1992. Phylogeny of cytoplasmic incompatibility microorganisms in the parasitoid wasp genus

- Nasonia* (Hymenoptera: Pteromalidae) based on 16S ribosomal DNA sequences. *Insect Mol. Biol.* **1**: 25-36.
- Buchner P. 1965. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. New York. **901**
 - Dillon RJ and Dillon VM. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* **49**:71-92
 - Dumler JS, Barbet AF, Bekker CP, Dasch GA, Palmer GH, Ray SC, Rikihisa Y, and Rurangirwa FR. 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila* *Int. J Syst Evol Microbiol* **51**:2145-2165.
 - Glaser RL, Meola MA. 2010. The Native *Wolbachia* Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. *PLoS One* **5** (8) : 1-11.
 - Hemingway J, NJ Hawkes, L McCarroll, and H Ranson. 2004. The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol* **34**:653-65.
 - Hertig M, Wolbach SB. 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J Med Res* **44**: 329–374.
 - Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*? A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett* **281**: 215–220.
 - Hotopp JC, Clark ME, Oliveira DC, Foster JM, Fischer P et al., 2007. Widespread lateral gene transfer from intracellular bacteria to multicellular eukaryotes *Science* **317**: 1753-1756.
 - Iturbe-Ormaetxe I, O'Neill SL. 2007. *Wolbachia*-host interactions: connecting phenotype to genotype. *Curr Opin Microb* **10**: 221–224.
 - Jeyaprakash A, Hoy MA. 2000. Long PCR improves *Wolbachia* DNA amplification: wsp sequences found in 76% of sixty-three arthropod species. *Insect Mol Biol* **9**(4): 393–405.
 - Kambris Z, PE Cook, HK Phuc, and SP Sinkins. 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* **326**:134-6.

- Kittayapong P, Baisley KJ, Baimai V, and O'Neill SL. 2000. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol* **37**: 340-345.
- Kondo N, Nikoh N, Ljichi N, Shimada M, Fukatsu T. 2002. Genome fragment of *Wolbachia* endosymbiont transferred to X chromosome of host insect. *Proc Natl Acad Sci USA* **99** :14280-142-85.
- Moran NA, JP McCutcheon, and A Nakabachi. 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet* **42**:165-90.
- Moreira LA, I Iturbe-Ormaetxe, JA Jeffery, G Lu, AT Pyke, LM Hedges, B C Rocha, S Hall-Mendelin, A Day, M Riegler, L E Hugo, K N Johnson, BH Kay, EA McGraw, A F van den Hurk, PA Ryan, and SL O'Neill. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* **139**:1268-78.
- Moya A, Peroto J, Gil R, Latorre A. 2008. Learning how to live together : genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat Rev Gente* **9** :218-229.
- O'Neill SL, Giordano R, Colbert AME, Karr TL. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc Natl Acad Sci US.* **89**: 2699–2702.
- Pachauri RK and Reisinger A. 2007. Climate Change 2007: Synthesis Report, Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change. IPCC, Geneva. **104**.
- Raharimalala FN, LH Ravaomanarivo, P Ravelonandro, L S Rafaraso, K Zouache, V Tran-Van, L Mousson, A-B Failloux, C Valiente Moro, BO Ralisoa, P Mavingui. 2011. Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasites and vectors*. In Press
- Rousset F, and M. Solignac. 1995. Evolution of single and double *Wolbachia* symbiosis during speciation in the *Drosophila simulans* complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* **92**: 6389-6393.
- Rousset F, Vautrin D, Solignac M. 1992. Molecular identification of *Wolbachia*, the agent of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila simulans*, and variability in relation with host mitochondrial types. *Proc. Biol. Sci.* **247**(1320): 163--168.
- Saridaki A, Bourtzis K. 2010. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Curr Op Micro* **13**: 67–72.

- Sinkins S P, Braig H R, and O'Neill SL. 1995. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc. R. Soc. Lond. Ser.B. Biol. Sci* **261**: 325-330.
- Tsai K-H, Lien J-C, Huang C-G, Wu W-J, and Chen W-J. 2004. Molecular (Sub) Grouping of Endosymbiont *Wolbachia* Infection Among Mosquitoes of Taiwan. *J. Med. Entomol* **41**(4): 677-683.
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nature Rev Micro* **6**: 741–751.
- Werren JH, Windsor D, and Guo LR 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **262**: 197-204.
- West SA, Cook JM, Werren JH, and Godfray HCJ. 1998. *Wolbachia* in two insects host-parasitoid communities. *Mol. Ecol* **7**: 1457-1465.
- Zhou W, Rousset F, and O'Neill SL. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B Biol. Sci.* **265**: 509-515.
- Zouache K, Voronin D, Tran-Van V & Mavingui P. 2009. Composition of bacterial communities associated with natural and laboratory populations of *Asobara tabida* infected with *Wolbachia*. *Appl Environ Microb.* **75**: 3755–3764.
- Zouache K, Raharimalala FN, Raquin V, Tran-Van V, Ravaomanarivo Raveloson LH, Ravelonandro P, Mavingui P. 2011. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol* **75** : 377-389.

Tableau 1. Amorces utilisées pour la caractérisation de *Wolbachia*

| Organisme | Gène | Amorces | Séquences (5'-3') | Taille amplifié pb/Tm (°C) | Références |
|------------------|------------|--------------|--------------------------------|-------------------------------|-----------------------|
| <i>Bacteria</i> | <i>rrs</i> | pA | 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' | environ 1500/55 | Bruce et al. (1992) |
| | | pH | 5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGCA-3' | | |
| <i>Wolbachia</i> | <i>rrs</i> | 16S (V3) 99F | 5'-TTGTAGCCTGCTATGGTATAACT-3' | 864/52 | O'Neill et al. (1992) |
| | | 994R | 5'-GAATAGGTATGATTTTCATGT-3' | | |
| | <i>wsp</i> | 81F | 5'-TGGTCCAATAAGTGATGAAGAAAC-3' | 600/55 | Zhou et al. (1998) |
| | | 328F | 5'-CCAGCAGATACTATTGCG-3' | 379/52 | Zhou et al. (1998) |
| | | 183F | 5'-AAGGAACCGAAGTTCATG-3' | 501/52 | Zhou et al. (1998) |
| | | 691R | 5'-AAAAATTAACGCTACTCCA-3' | | |

Tableau 3. Prévalence de *Wolbachia* dans les quatre espèces étudiées.

| Espèces | Individus testés | N 16S rRNA (%) | N <i>wsp</i> positif (%) | <i>wsp</i> Clade A | <i>wsp</i> Clade B |
|-------------------------------|------------------|----------------|--------------------------|--------------------|--------------------|
| <i>Culex antennatus</i> | 34 | 34 (100) | 0 | - | - |
| <i>Culex decens</i> | 22 | 22 (100) | 21 (95,5) | - | + |
| <i>Culex quinquefasciatus</i> | 42 | 42 (100) | 30 (71,4) | - | + |
| <i>Mansonia uniformis</i> | 19 | 3(15,8) | 3 (15,8) | + | + |

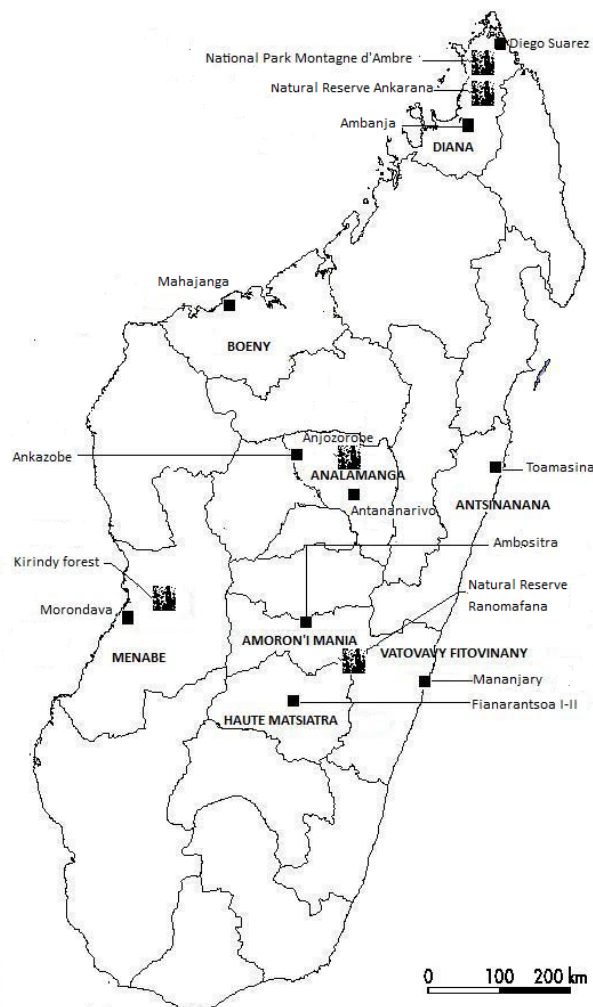
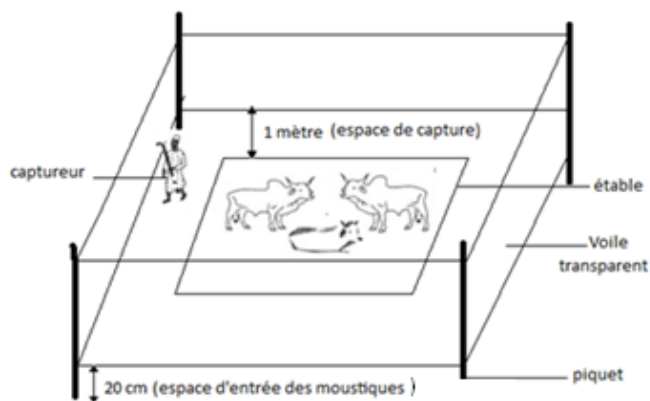


Figure 1. Différents sites de capture des moustiques nocturnes de Madagascar. Zones forestières Villes.



Méthode de capture des moustiques nocturnes par voile autour d'un parc à zébus

Figure 2. Type de piège «parc à zébus»

CHAPITRE 3.

RECHERCHE D'ARBOVIRUS CHEZ LES MOUSTIQUES ET LES LEMURIENS

1- Contexte et objectifs

Ces dix dernières années, on assiste à une réémergence d'arboviroses dans les îles de l'Océan Indien. Madagascar n'a pas fait exception à la règle puisque des foyers épidémiques d'arboviroses de grandes envergures ont été signalés dans plusieurs régions de l'île. Avec plus de vingt millions d'habitants, des mouvements croissants de populations, et des changements climatiques apparents, Madagascar peut devenir rapidement un «hot spot» de maladies vectorielles. Dans ce contexte, il est primordial d'actualiser et d'approfondir les connaissances sur la biologie des vecteurs principaux d'arboviroses. Ainsi, l'objectif de ce chapitre présenté sous forme de manuscrit est de caractériser les communautés de *Culicidae* potentiellement vecteurs de virus de la fièvre de la vallée du rift, arbovirose en émergence et qui à sévit ces dix dernières années. Par ailleurs, en Afrique les primates non humains constituent des réservoirs majeurs des arboviroses comme le Chikungunya et la dengue. Il est envisageable que les lémuriens, primates prosimiens, puissent remplir ce rôle de réservoir à Madagascar. Cette hypothèse mérite d'être explorée puisque des sérologies positives antérieures démontrent des contacts pouvant être fréquents entre lémuriens et les arbovirus.

La recherche de virus de la fièvre de la Vallée du Rift au niveau des pools de *Culex antennatus* et des différentes espèces de lémuriens par la méthode moléculaire (qRT-PCR) a permis de démontrer la présence de deux pools de moustiques et de deux espèces de lémuriens (*Lepilemur edwardsi* et *Eulemur rufus*) infectés par le RVFV. Ces résultats ont permis de confirmer, pour les moustiques, que l'espèce testée représente un bon vecteur de cet arbovirus, donnée déjà avancée par d'autres chercheurs (Ratovonjato et al., 2010). Pour le cas des lémuriens, ces résultats préliminaires démontrent pour la première fois la présence de l'ARN viral chez ces animaux emblématiques. Des études complémentaires sont en cours dans l'équipe d'accueil à Lyon.

2- Publication

Exploring the presence and prevalence of the Rift Valley Fever virus in mosquito *Culex antennatus* and Lemurs' status in epidemic regions of Madagascar

Fara N. RAHARIMALALA^{1,2}, Lanto B. RAMAROMILANTO³, Van TRAN-VAN¹, Lala H. RAVAOMANARIVO², Andry RASAMINDRAKOTROKA⁴, Phillipe BARAZER⁵, Brigitte Crouau-Roy⁵, Bakoly O. RALISOA², Patrick MAVINGUI^{1*}

¹Université de Lyon, F-69622, Lyon, France; Université Lyon 1, Villeurbanne; CNRS, VetAgro Sup, UMR5557, Ecologie Microbienne.

²Département d'Entomologie de la Faculté des Sciences d'Antananarivo, Madagascar.

³Parc Botanique et Zoologique de Tsimbazaza (PBZT) Antananarivo-Madagascar.

⁴Département de Biologie Médicale de la Faculté de Médecine d'Antananarivo, Madagascar.

⁵Université Paul Sabatier UMR CNRS 5174 EDB, Toulouse France

* Corresponding author. Mailing address: UMR CNRS 5557 Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, 43 boulevards du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne cedex, France.

Phone: +33 4 72 43 11 43. Fax: +33 4 72 43 12 23.

E-mail: patrick.mavingui@univ-lyon1.fr

Abstract:

The Rift valley virus Fever (RVFV) is a Phlebovirus that causes RVF in human and animals. RVFV is transmitted by bite of mosquitoes and by contact or inhalation of aerosol from sick animals. Recently, several regions of Madagascar suffered a severe outbreak of RVF in 2008. To get insights into the factors involved in these outbreaks, we conducted a survey on nocturnal mosquitoes in the fields. We also sampled lemurs as potential reservoirs. A total of 53 lemur blood samples and 56 pools of *Culex antennatus* were screened for the presence of the virus by qRT-PCR targeting the M segment of VFVR and sequencing. Two mosquito pools and two lemur species (*Lepilemur edwardsi* et *Eulemur rufus*). The possible role of animals in the RVFV outbreaks in Madagascar is discussed.

Introduction

Firstly isolated in Kenya in 1930 during an epizootic of disease in the Rift valley, the Rift Valley fever virus (RVFV) was found to induce a high rate of abortion and death in both young and adult infected animals. The disease was responsible of 3500 deaths of goats and 1200 of sheep (Daubney et al., 1931; Findlay et al., 1931). The virus belongs to the genus *Phlebovirus* of the family *Bunyaviridae*. Virions are enveloped and contain 3 single-stranded RNA genome segments designated large (L), medium (M), and small (S) coding for the viral proteins. In 1945, Rift Valley fever (RVF) was decreed as an arthropod-borne zoonosis, transmitted by bite of mosquitoes (Smithburn, 1948). The transmission in human occurred by contact or inhalation of generated aerosols when handling sick or dead infected animals or their fresh tissues. Outbreaks of RVFV seem to occur periodically every 10 to 15 years, and mosquitoes such as *Aedes* were believed to maintain the virus through vertical transmission in the interepidemics' periods (Zeller, 1997). Epidemics' areas of the RVFV were restricted to sub-Saharan Africa (SAA) until the late 20th century. Egypt was the first country to report RVFV outside the African continent, with epidemics that affected both animal and human populations in 1977 (Walsh, 1988; Meegan *et al.*, 1979). Nowadays, RVF was detected in many countries in Africa, including in north countries such as Morocco, Algeria, Tunisia and Libya (Pepin, 2011). As for many arboviroses, the geographical expansion of RVFV is thought to be linked with global changes and an increase in human and animal movements. Indeed, RVFV outbreaks were associated with climate variations, in particular with the increase in rainfall that favor hatching of mosquito eggs and the subsequent emergence of a large number of adult mosquitoes. The wide range of RVFV host and vector species have led to fears that epidemics will continue to emerge worldwide.

In Madagascar, RVFV was firstly detected in the forest of Perinet (Moramanga district) during a raining saison in the March 1979 (Clerc and Coulanges, 1981). Nevertheless, the precise implication of a particular mosquito species as a vector in the RVFV transmission was not demonstrated as all the pools, except that of *Mansonia uniformis*, were made up of a mixture of different species (Morvan et al., 1991a, b; Ratovonjato et al., 2010). Then, an RVF epizootic occurred in 1990. A significant high incidence of abortions in domestics' animals and diseases in humans was reported in Fenoarivo Atsinanana on the east coast (Morvan et al., 1991a,b). In 2008, RVFV outbreak in humans and animals was again detected and confirmed in central highlands of

Madagascar causing 476 human suspected cases (of which 19 died) in 15 districts (Andriamandimby et al. 2010; Ratovonjato et al., 2010). In this case, the detection of the virus was facilitated by the existence of a human sentinel surveillance network set up by the Malagasy Ministry of Health in collaboration with the Pasteur Institute of Madagascar since March 2007 (Randrianasolo et al. 2010). From 1978 to 1986, survey of 156 lemurs blood sampling were showed their prevalence sera with a DEN1 and DEN4 to 4 and 23% (Fontenille et al., 1988). These results were gave evidence that lemurs had contact with an arbovirose but any tangible proof about their participation in the cycle transmission of the arbovirose.

The aim of this study was to survey presence and prevalence of VRVF in natural populations of the mosquito *Culex antennatus*, a dominant species that has been proved as an efficient RVFV vector (Ratovonjato et al., 2010), as well as Lemurs suspected to be a possible vertebrate reservoirs.

Materials and methods

Geographic location and characteristics of study areas.

Mosquitoes were sampled in cities and villages (Ambositra cities, Fianarantsoa I-II cities, Ranomafana and Montagne d'Ambre villages), whereas lemurs were captured in natural reserves and forests (Ivoloina Park, Ankarafantsika and Montagne d'Ambre forests,) of Madagascar (Figure 1).

The Amoron'i Mania region (Ambositra) and Haute Matsiatra region (Fianarantsoal-II) are in the highlands of Madagascar and have 1200-1433 m of altitude, with a tropical altitude climate. In these areas, two seasons are observed: a hot and rainy period (November to April), and a relatively dry cool season at the rest of the year. Ranomafana forest is situated in the region between Amoron'i Mania and Vatovavy Fitovinany in the western side of Madagascar. The climate is tropical humid and rainy. The temperatures vary from 14 to 20 °C. The annual rainfall reaches 2600 mm. The Atsinanana region (Ivoloina Park in Toamasina) is at the eastern plains of the island. The climate is hot and wet and the raining extends all the year with the mean annual rainfall of about 3200 mm and relative humidity around 87%.

The Boeny region (Natural Park Ankarafantsika in Mahajanga) is located in the western plains. It has an equatorial climate with an arid and warm summer (mean temperature of 27°C) with moderate rainfall (mean precipitation is about 400 mm per year). The Diana region is located in

north plains in the North-West of Madagascar, and it hosts the reserved forests of Montagne d'Ambre. The climate is equatorial dry and this area is situated in 1400m. It is characterized by alternance of wet and dry season (May to November) and a hot and humid season (December to April). Temperature is situated at 27°C and rainfall varies from 985 to 2171 mm per year.

Sampling and processing of mosquitoes

Nocturnal adult mosquitoes were captured monthly from October 2007 to October 2009, using a method named as «zebu park» (Figure 2). It consists of a large tulle hold on the peg around the space where domestics' animals were stored. One-meter larger space was let between the fence and the tulle as well as 20 cm space between the tulle and ground allowing the entry of the mosquitoes. After blood-feeding on zebu, female mosquitoes rest on the tulle, then the capturer can recover them using oral aspirator. In hospital, mosquitoes landing on walls were collected earlier in the morning using oral aspirator. Collected mosquitoes were stored in cups covered with veil on which impregnated cotton with 6% sucrose solution was placed. Species were identified using morphological characteristic keys (Stone et al., 1959; 1961; 1963; 1967; 1970). Numbers of individuals, date of capture and location site, sexes were recorded and then different species were separately desiccated in the silicagel.

Capture of Lemurs.

Lemurs were captured at the periphery of protected areas ; Malagasy laws forbidden capturing inside these areas. A compressed air gun type Tele-Injection-Applicators (TELINJECT GMBH 2007) was used to immobilize animals by injecting anesthesia (telazol, ketamine, tiletamine ...) at a dose of 10mg/kg body weight. The animal weight was estimated based on data published in "Lemurs of Madagascar" (Mittermeier et al. 2006). The pressure was function of a distance between the animal and the primatologists' specialists from the Zoological and Botanical Park of Tsimbazaza (PBZT Antananarivo). When the animal falls, it was captured by the net and brought to the laboratory camp for blood sampling. The lab camp was usually installed closer to the place of capture to facilitate the release. The animal was weighted to calculate the blood volume to be taken. His heart beat and sex were verifying. During the handling of the animal, a rectal temperature was taken every five minutes and artificial tear was put in his eyes to prevent drying. All manipulations were done while the animal was calm to avoid any accident. Once all medical examinations were completed, 1 mL

blood per kg was collected by femoral vein puncture and placed immediately in a tube (Nunc[®]) containing 1.8 mL of buffer composed of sodium tetraethylene acetate 0.1 M, Tris base 0.1 M and sodium dodecyl sulfate 2% (Longmire et al. 1992). Tubes were then stored immediately in a container of liquid nitrogen to preserve blood components. A serum lactate Ringer was injected subcutaneously to the animal, according to the amount of blood taken to compensate the lost electrolytes and to eliminate the effect of anesthesia. When animal was recovered well, he was released in his own territory previously quoted by GPS coordinates. Then, his status was monitored and surveyed until the animal had recovered all faculties and was able to flee.

Extraction of nucleic acids

Pools of 25 females each were used to extract total RNA. Each pool was washed three times with sterilized water, surface-disinfected in ethanol 70° for 5 min, and rinsed three times in water. Then, mosquitoes were crushed with 200 µl of extraction buffer (Hexadecyltrimethyl Ammonium Bromide 2%, NaCl 1.4 M, EDTA 0.02 M, Tris.Cl 0.1 M at pH 8.0, and β-mercaptoethanol 0.2 %) pre-warmed at 60°C. The homogenates were processed for RNA extraction using Trizol (Zouache et al., 2009). Purified RNA was dissolved in DEPC-treated water.

For Lemurs, total RNA was extracted from 56 specimens using 150 µl of blood sample and RNeasy kit according to manufacturer's instructions (QIAGEN). Extracted RNA was dissolved in sterilized RNA-free water. Genomic DNA was also extracted using 50 µl of blood sample and genomic tissues kits following the manufacturer's recommendations (QIAGEN). All RNA and DNA samples were quantified using Nanodrop and stored at -80°C until used.

PCR and qRT-PCR

To detect viral RNA, the primers Upp(A) 5'-CATGGATTGGTTGTCCGATCA-3' and Low(A1) 5'-TGAGTGTAATCTCGGTGGAAGGA-3' were selected to amplified a 108 bp fragment of the medium (M) segment of RVFV (Moutailler, 2007). A one-step RT-PCR reaction was performed in the LightCycler apparatus (Roche, Meylan, France) using EXPRESS One-Step SYBR[®]GreenER[™] Kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) in a volume of 20 µL containing 10 ng of RNA template, 1X EXPRESS SYBR[®] GreenER[™] SuperMix Universal, 200 nM of each primers and 1X of EXPRESS Superscript[®] Mix. Amplifications consisted of an initial reverse transcription 30 min at 50°C and enzyme inactivation 95°C for 2 min; then 40 cycles of 95°C for 5 s, 57°C for 1 min, and 72°C for 30 s.

Quantification of viral RNA was achieved through a standard curve generated using duplicates of 10-fold serial dilutions of RVFV RNA synthetic transcripts (Moutailler, 2007).

To tentatively characterize the Lemurs' species, PCR amplification of a mitochondrial D-loop 550 bp fragment was performed with primers FL 15957 (5'-CGTCCAAGACACCTCAAGG-3') and RH 16589 (5'-ACCATCTGCCTGACAGCTCAG-3'). The amplification steps were composite of an initial denaturation at 94°C for 30min, followed by 42 cycles of 94°C for 45s, 57°C for 60s, 72°C for 45s, and a final extension at 72°C for 10min. Reactions were made in 30 µl volume containing 40 ng of DNA template, 6µl of 5X Gotaq buffer, 1,5 µl of 10 µM of each primer, 2,4µl of 2 mM of dNTP mix (INVITROGEN, France), and then 0,2µl of 1U of Gotaq (PROMEGA, France).

Products of amplification were checked in 2 % agarose gel electrophoresis in TBE buffer. After staining in ethidium bromide solution, gels were photographed using Gel Doc 2000 system (BioRad, USA). Remaining products showing bands of expected size were sent to sequencing at BIOFIDAL-DTAMB (SFR BioEnvironment and Health, Lyon, France).

Results and discussion

During nocturn entomological surveys, a total of 2137 adult female mosquitoes were caught in the four selected regions of Madagascar (Table 1). They belonged to *Culex antennatus*, *Culex decens*, *Culex quinquefasciatus* and *Mansonia uniformis*. Only *Culex antennatus* was screened for RVFV as this species represented 85% of the total mosquitoes captured. Moreover, Clerc and Coulanges reported the presence of RVFV in *Culex antennatus* in Madagascar (Clerc and Coulanges, 1979). Recently, RVFV was also detected in *Culex antennatus* and two *Anopheles* species in the Haute Matsiatra region of Madagascar (Ratovonjato et al., 2010), where human and animal infections had occurred a year before the entomological survey (Andriamandimby et al., 2010). In addition, previous data incriminated the species *Culex antennatus* as a principally vector in the transmission of RVFV in Nigeria in 1967, Kenya from 1981 to 1984 (Linthicum et al. 1985, EFSA 2005). Finally, a high vector competence of *Culex antennatus* towards RVFV has been demonstrated experimentally (EFSA 2005; Gad et al., 1987).

A total of 53 pools, consisted each of 25 *Culex antennatus* females, was tested. Two pools were found positive in qRT-PCR targeting fragment M of RVFV. These pools, names E6 and E8, were collected in villages near the Natural Park of Montagne d'Ambre in the North-West of Madagascar.

For pool E6, signal was detected after 33 cycles and the average copy number of virus RNA was about 1.7×10^3 , whereas E8 amplified viral products appeared at 29 cycles with the average RNA copy number of 1.8×10^4 (Figure 3). No amplification signal was observed in negative controls. All the qRT-PCR assays were repeated three times and similar results were obtained, suggesting strongly infection of *Culex antennatus* by RVFV.

In contrast to previous reports (Andriamandimby et al., 2010; Ratovonjato et al., 2010), here the infected mosquitoes were found in Diana region where RVFV cases were never been documented. Thus, the virus could being maintained among mosquitoes through vertical transmission as already reported in *Culex antennatus* (Linthicum et al. 1985 ; Turell et al. 1990), or circulating via unidentified vertebrate reservoirs. Indeed, it is well established that birds and primates are reservoirs of several abovirus, including RVFV, in silvatic areas (Kaschula et al., 1978; Wolfe et al., 1998; Inoue et al., 2003; Sidenko et al., 1974). To get insights into potential vertebrate reservoirs of RVFV, viral investigation was performed on lemurs as they represent the only nonhuman primates in Madagascar. In addition, serological surveys against some arboviruses found positive response in lemurs of Madagascar, indicating at least a contact between the two organisms. A total of 56 lemurs were captured in three regions of Madagascar and they belonged to genera *Eulemur*, *Epilemur*, *Hapalemur* and *Varecia* (Table 2), as ascertained by sequence analysis of D-loop (Figure 4). PCR screening of M RNA segment of RVFV in the lemur blood samples showed positive RT-PCR in two individuals. The two specimens were captured near the Ankarafantsika National Park in the Boeny region. They were called AKF3 and AKF23 and belonged to *Lepilemur edwardsi* and *Eulemur rufus*, respectively (Figure 5). For AKF3, amplified products arose after 22 cycles with an average RNA copy number of 2.3×10^6 . For AKF23, the detection of viral RNA was achieved at 35 cycles with an average copy number of 1.4×10^3 . As for mosquitoes, qRT-PCR assays were repeated three times with similar positive results in the two infected samples and no amplification signal in negative controls.

Analysis of the four sequences of 108 bp obtained from the two mosquitoes and two lemur blood samples demonstrated a 100 % identity to each other. The Blast Identity Search (NCBI) revealed a 99% identity with sequences of M RNA segment from RVFV isolates of Madagascarian human sera (DQ380201 to DQ380210), 97 % with identity with a sequence of RVFV isolate of a Central Africal Republic human serum (DQ380221), 96 % with a sequence of RVFV bovine isolate from Zimbabwe (DQ380222), and 94 % with a sequence of RVFV isolate from the mosquito *Aedes*

macitoshi from Kenya (DQ380198) (Figure 6). Although, the size of the targeting M segment was, analysis could evidence differences between sequences obtained here and those retrieved from Genebank; the closest M sequence were from RVFV strains isolated in human sera in Madagascar (Bird et al., 2007). To better characterize RVFV genomes in both mosquitoes and lemurs, an ongoing effort is underway to isolate the viruses and amplify S and L RNA segments. Although, positive serology against several arboviruses was reported in lemurs (Fontenille et al., Sondgeroth et al., 2007), this is the first report on the presence of RVFV genomic RNA in these nonhuman primates suggesting their role as potential reservoirs in Phlebovirus transmission.

Acknowledgements and Funding

We are grateful to Madagascar National Parks (formely ANGAP) for authorizing collection of wild mosquitoes and lemurs. FNR was supported by the Fondation pour la Recherche sur la Biodiversité (FRB, formely IFB). The research work was funded by the FRB-CD-AOOI-07-012 (IFB) and the Centre National de la Recherche Scientifique, and was carried out within the frameworks of GDRI “Biodiversité et Développement Durable à Madagascar”.

References:

- Andriamandimby SF, AE Randrianarivo-Solofoniaina, EM Jean-Marie, L Ravololomanana, LT Razafimanantsoa, T Rakotojoelinandrasana, J Razainirina, J Hoffmann, JP Ravalohery, JT Rafisandratantsoa, PE Rollin, and JM Reynes. 2010. Rift Valley fever during rainy seasons, Madagascar, 2008 and 2009. *Emerg. Infect. Dis.* **16**: 963-970.
- Bian GW, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi ZY. 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to Dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Path* **6**: e1000833.
- Bird BH, Khristova M L, P E Rollin, TG Ksiazek, and ST Nichol. 2007. Complete Genome Analysis of 33 Ecologically and Biologically Diverse Rift Valley Fever Virus Strains Reveals Widespread Virus Movement and Low Genetic Diversity due to Recent Common Ancestry! *J of Vir* **81** (6): 2805–2816.
- Buchner P. 1965. Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. New York. 901.
- Clerc Y, Coulanges, P. 1981. Rapport du Laboratoire des arbovirus 1980. Arch Inst Pasteur.
- Coulanges P, Clerc Y, Jousset FX, Rodhain F & Hannoun C. 1979. Dengue à La Réunion. Isolement d’une souche à l’Institut Pasteur de Madagascar. *Bull Soc Path Ex.* **72** : 205-209.

- Daubney R, Hudson JR, Garnham PC. 1931. Enzootic hepatitis of Rift Valley fever: an undescribed virus disease of sheep, cattle and human from East Africa. *J Pathol Bacteriol.* **34**: 545-579.
- Dillon RJ and Dillon VM. 2004. The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* **49**:71-92.
- [EFSA] European Food Safety Authority. 2005. The Risk of a Rift Valley Fever Incursion and its Persistence within the Community. *EFSA Journal.* **238**: 1–128.
- Findlay GM and Daubney R. 1931. The virus of Rift Valley fever or enzootic hepatitis. *Lancet ii* : 1350-1351.
- Fontenille D, Traore-Lamizana M, Diallo M, Thonnon J, Digoutte J-P, Zeller HG. 1998. New vectors of Rift Valley fever in west Africa. *Emerg Infects Dis* **4**:289-293.
- Gad AM, Hassan MM, El Said S, Moussa MI, Wood OL. 1987. Rift Valley fever virus transmission by different Egyptian mosquito species. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **81**(4): 694-698.
- Glaser RL, Meola MA. 2010. The Native *Wolbachia* Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. *PLoS One.***5** (8): 1-11.
- Inoue S, K Morita, R R Matias, J V Tuplano, R R Resuello, J R Candelario, D J Cruz, C A Mapua, F Hasebe, A Igarashi, and F F Natividad. 2003. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *J Med Primatol* **32**: 89-94.
- Kambris Z, PE Cook, HK Phuc, and SP. Sinkins. 2009. Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* **G**: 134-6.
- Kaschula VR, Van dellen AF, Devos V. 1978. Some infectious diseases of wild vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*) in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* **49** : 223-227.
- Linthicum KJ, Davies FG, Kairo A, Bailey CL. 1985. Rift valley fever virus (family Bunyaviridae, genus *Phlebovirus*). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J Hyg (Lond).* **95**:197–209.
- Longmire et al. 1992. Cerebral edema from valproate? *J Toxicol Clin Toxicol.* **30** (4): 685-6.
- Meegan JM. 1979. The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-78. 1. Description of the epizootic and virological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* **73**: 618-623.

- Mittermeier RA, Konstant WR, Hawkins F, Edward EL, Langrand O, Ratsimbazafy JH, Rasoloarison R, Ganzhorn JU, Rajaobelina S, Tattersall I, & Meyers D. 2006. Lemurs of Madagascar, second edition, Conser. Interna. 330-403.
- Moran NA, JP McCutcheon, and A Nakabachi. 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet* **42**: 165-90.
- Moreira L A, I Iturbe-Ormaetxe, JA Jeffery, G Lu, AT Pyke, LM Hedges, BC Rocha, S Hall-Mendelin, A Day, M Riegler, L E Hugo, KN Johnson, BH Kay, EA McGraw, A F van den Hurk, PA Ryan, and SL O'Neill. 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* **139**: 1268-78.
- Morvan J, Fontenille D, Saluzzo JF, Coulanges P. 1991b. Possible Rift Valley fever outbreak in man and cattle in Madagascar. *Trop Med Hyg.* **85**: 108. DOI: 10.1016/0035-9203(91)90178-2
- Morvan J, Saluzzo JF, Fontenille D, Rollin PE, Coulanges P. 1991a. Rift Valley fever on the east coast of Madagascar. *Res Virol.* **142**: 475-482. DOI: 10.1016/0923-2516(91)90070-J
- Moutailler S. 2007. Conséquences de l'infection par le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift pour deux espèces vectrices : *Culex pipiens quinquefasciatus* et *Aedes vexans*. Thèse de l'Université Pierre et Marie Curie (Paris VI). 153 pages.
- Moya A, Peroto J, Gil R, Latorre A. 2008. Learning how to live together : genomic insights into prokaryote-animal symbioses. *Nat Rev Gente* **9** :218-229.
- Pepin M. 2011. Fièvre de la Vallée du Rift. *Med et mal. infect.* : 1-8.
- Randrianasolo L, Raelina Y, Ratsitorahina M, Ravolomanana L, Andriamandimby S, Heraud JM, Rakotomanana F, Ramanjato R, Randrianarivo-Solofoniaina AE, Richard V. 2010. Sentinel surveillance system for early outbreak detection in Madagascar. *BMC Public Health* **10**:31
- Ratovonjato J, Olive M -M, Tantely L M, Andrianaivolambo L, Tata E, Razainirina J, Jean-Marie E, Reynes J-M, Elissa N. 2010. Detection, Isolation, and Genetic Characterization of Rift Valley Fever Virus from *Anopheles (Anopheles) coustani*, *Anopheles (Anopheles) squamosus*, and *Culex (Culex) antennatus* of the Haute Matsiatra Region, Madagascar. *Vect. Born and Zoonotic Dis.* Short communication. 1-8.
- Sindeko VP, Grekov V S. 1974. *Ornitologiya.* **11** : 356-360.
- Smithburn KC, Haddow AJ, Gillet JD.1948. Rift valley fever: isolation of the virus from wild mosquitoes. *Br J Exp Pathol.* **29**: 107-121.

- Stone A. 1961. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, Supplement I (Diptera, Culicidae). Proc. Ent. Soc. Wash. **63** : 29-52.
- Stone A. 1963. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, Supplement II (Diptera, Culicidae). Proc. Ent. Soc. Wash. **65**: 117-224.
- Stone A. 1967. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, Supplement III (Diptera, Culicidae). Proc. Ent. Soc. Wash. **69**: 197-224.
- Stone A. 1970. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, Supplement IV (Diptera, Culicidae). Proc. Ent. Soc. Wash. **72**: 137-171.
- Turell MJ, and JO Lundstrom. 1990. Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes aegypti* and *Ae. taeniorhynchus* for Ockelbo virus. Am J Trop Med Hyg **43**:543-50.
- Walsh J. 1988. Rift Valley fever rears its head. Science. **240** (4858): 1397-1399.
- Wolfe ND, Escalante AA, Karesh WB et al., 1998. Wild primate populations in emerging infectious disease research: the missing link? Emerg. Infect. Dis. **4** : 149-158.
- Zeller HG. 1997. Dengue, arbovirus et migrations dans l'Océan Indien. Lab Vir Inst Past Mada.
- Zouache K, Voronin D, Tran-Van V & Mavingui P. 2009. Composition of bacterial communities associated with natural and laboratory populations of *Asobara tabida* infected with *Wolbachia*. Appl Environ Microb. **75**: 3755–3764.

Figures

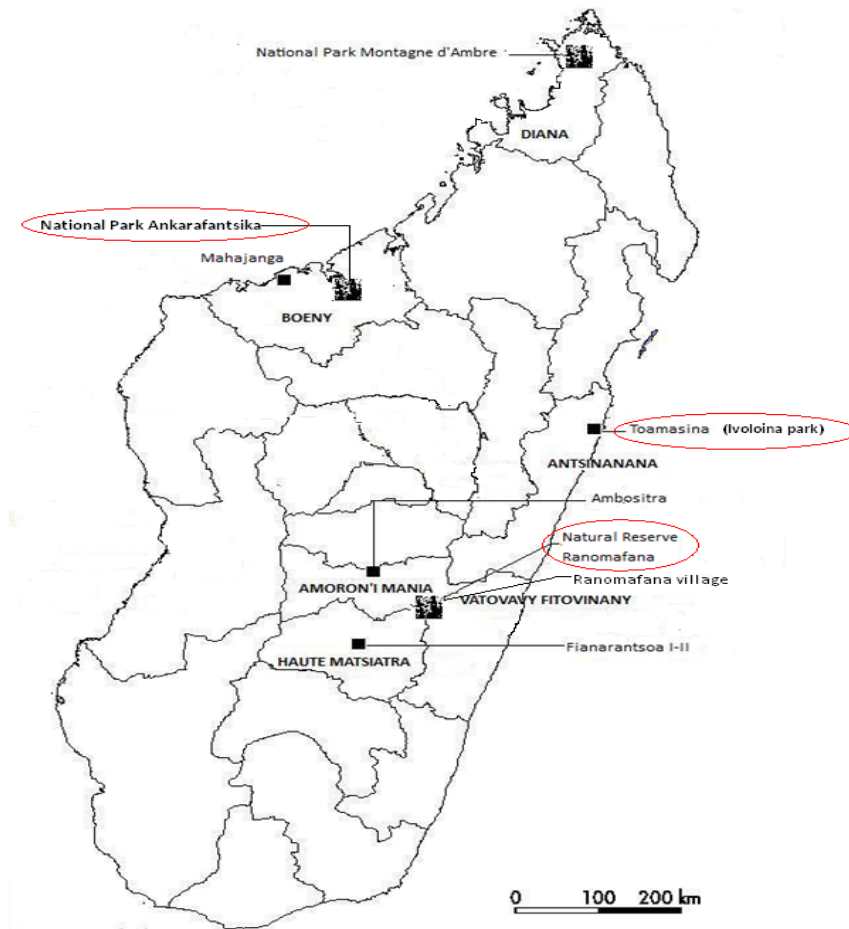
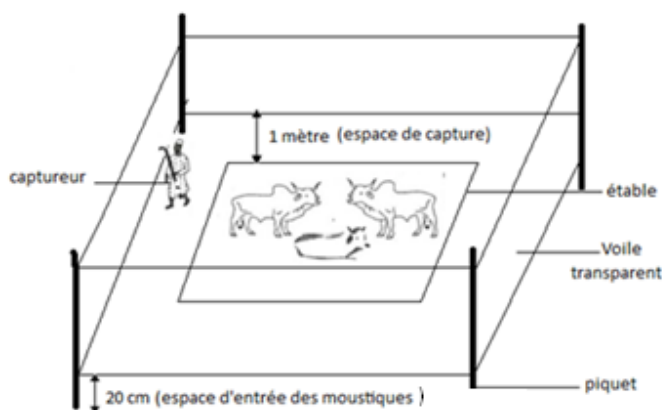


Figure 1. The different locations used for this study in six regions in Madagascar. Lemurs' sites are encircled.



Méthode de capture des moustiques nocturnes par voile autour d'un parc à zébus

Figure 2. Method «zebu park» to capture nocturn mosquitoes.

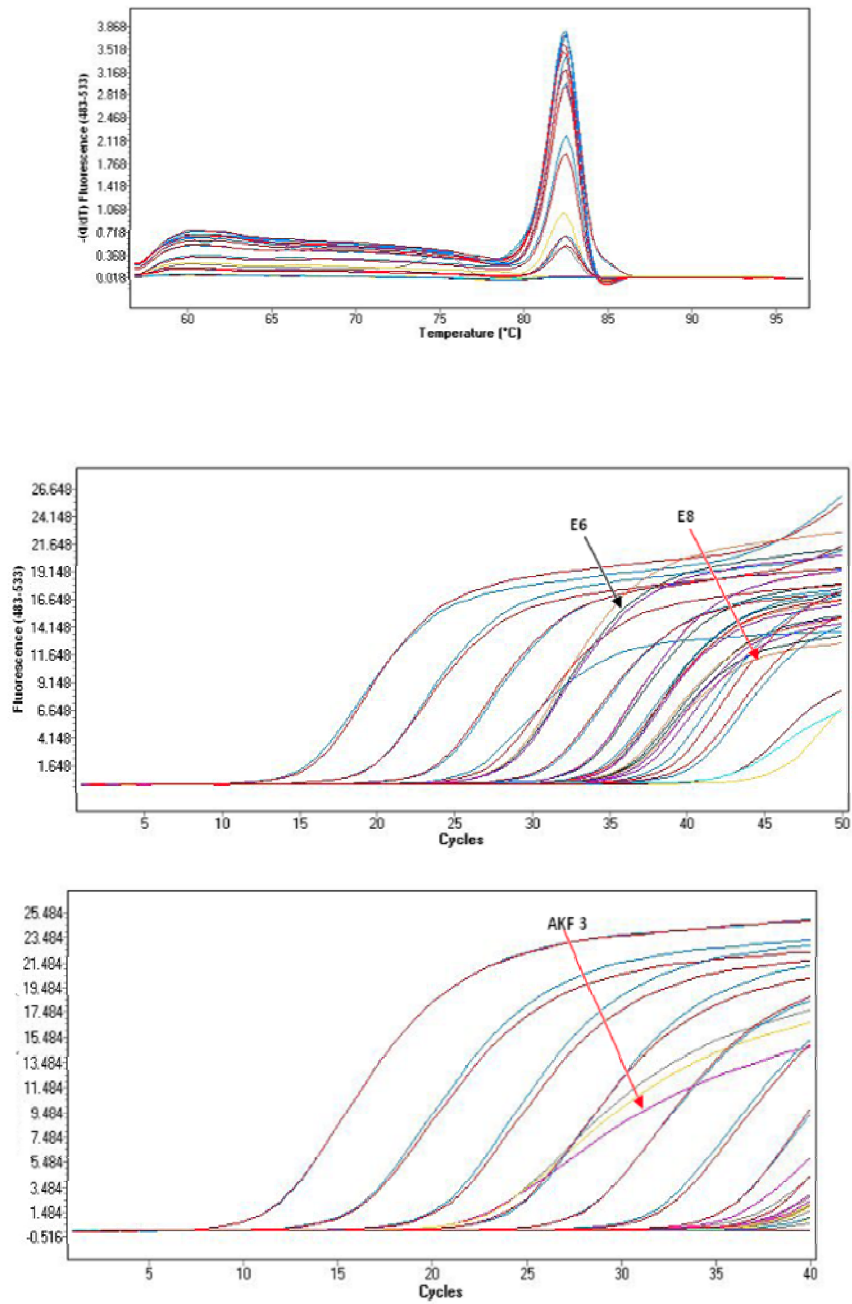


Figure 3. qRT-PCR specificity (upper graph) and amplification cycles of M RNA segment of RVFV. E6 and E8, mosquito samples; AKF3, lemur blood sample.

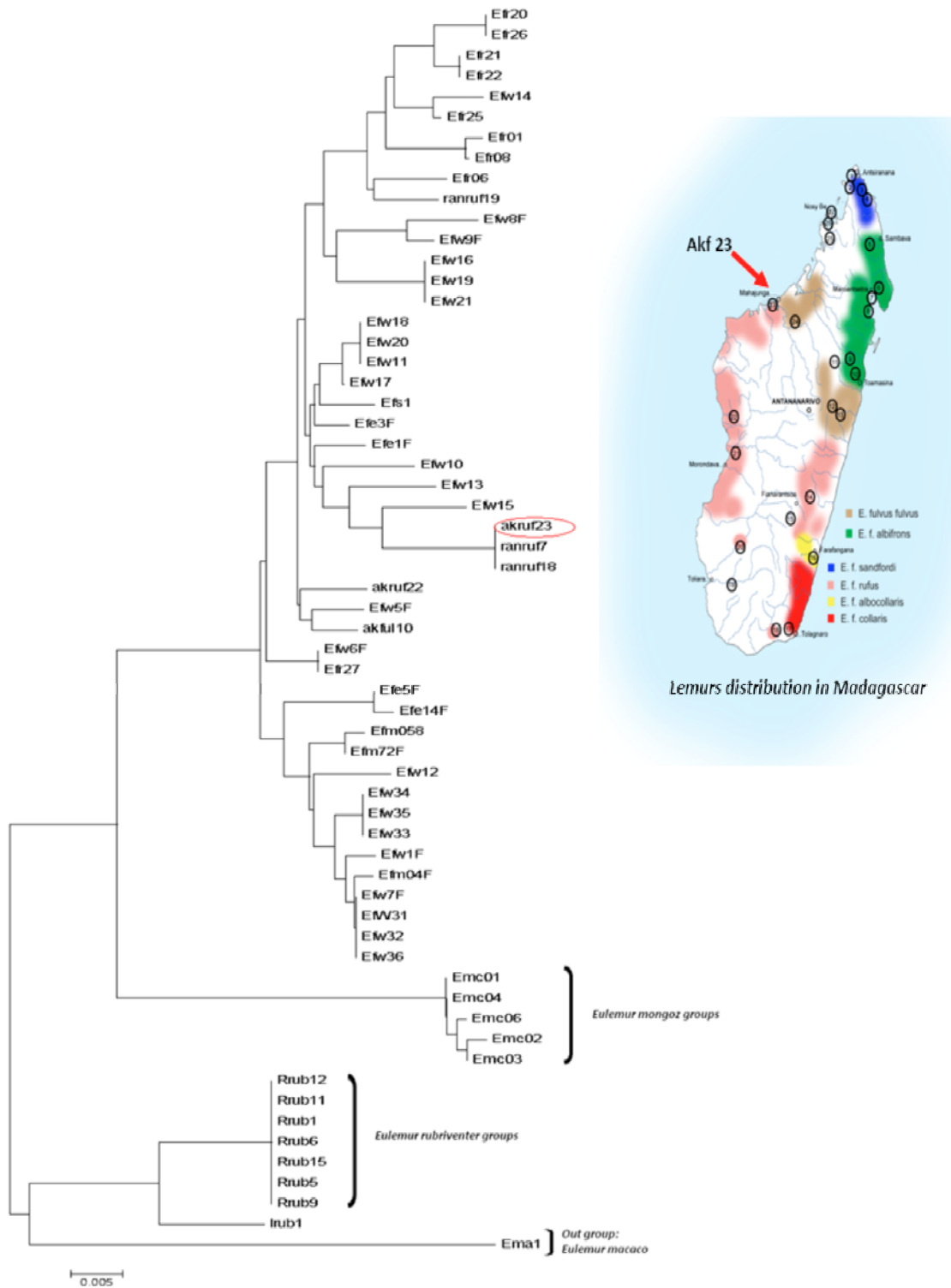


Figure 4. Phylogenetic tree built with D-loop sequences of lemurs by maximum likelihood (ML) method based on the general time reversible (GTR) model.



AKF 3: *Lepilemur edwardsi*



AKF 23: *Eulemur rufus*

Figure 5. The two lemurs positive in RVFV

```

E6_Culex_antennatus_Madagascar CATGGATTGGTTGTCCGATCAACAGGGTTCAAGATATCATCAGCAGTTGC 50
E8_Culex_antennatus_Madagascar CATGGATTGGTTGTCCGATCAACAGGGTTCAAGATATCATCAGCAGTTGC 50
AKF3_Lepilemur_edwardsi_Madaga CATGGATTGGTTGTCCGATCAACAGGGTTCAAGATATCATCAGCAGTTGC 50
AKF23_Eulemur_rufus_Madagascar CATGGATTGGTTGTCCGATCAACAGGGTTCAAGATATCATCAGCAGTTGC 50
DQ380201_Human_sera_Madagascar CATGGATTGGTTGTCCGATCAACAGGGTTCAAGATATCATCAGCAGTTGC 50
DQ380221_Human_sera_Cent_Afric CATGGATTGGTTGTCCGATCAACAGGGTTCAAGATATCATCTGCAGTTGC 50
DQ380222_Bovine_Zimbabwe CATGGACTGGTTGTCCGATCAACAGGGTTCAAGATATCATCTGCAGTTGC 50
DQ380198_Aedes_macitoshi_Kenya CATGGATTGGTTGTCCGATCAACAGGGTTCAAGATATCATCTGCAGTTGC 50
*****

E6_Culex_antennatus_Madagascar TTGTGCTAGCGGAGTTTTCGTCACAGGATCACAGAGTCCTTCCCACCGAGA 100
E8_Culex_antennatus_Madagascar TTGTGCTAGCGGAGTTTTCGTCACAGGATCACAGAGTCCTTCCCACCGAGA 100
AKF3_Lepilemur_edwardsi_Madaga TTGTGCTAGCGGAGTTTTCGTCACAGGATCACAGAGTCCTTCCCACCGAGA 100
AKF23_Eulemur_rufus_Madagascar TTGTGCTAGCGGAGTTTTCGTCACAGGATCACAGAGTCCTTCCCACCGAGA 100
DQ380201_Human_sera_Madagascar TTGTGCTAGCGGAGTTTTCGTCACAGGATCGCAGAGTCCTTCCCACCGAGA 100
DQ380221_Human_sera_Cent_Afric TTGTGCTAGCGGAGTTTTCGTCACAGGATCGCAGAGTCCTTCCTACCGAGA 100
DQ380222_Bovine_Zimbabwe TTGTGCTAGCGGAGTTTTCGTCACAGGATCGCAGAGTCCTTCCTACCGAGA 100
DQ380198_Aedes_macitoshi_Kenya TTGTGCTAGCGGGGTTTTCGTCACAGGATCGCAGAGTCCTTCCTACTGAGA 100
*****

E6_Culex_antennatus_Madagascar TTACTACTCA 109
E8_Culex_antennatus_Madagascar TTACTACTCA 109
AKF3_Lepilemur_edwardsi_Madaga TTACTACTCA 109
AKF23_Eulemur_rufus_Madagascar TTACTACTCA 109
DQ380201_Human_sera_Madagascar TTACTACTCA 109
DQ380221_Human_sera_Cent_Afric TTACTACTCA 109
DQ380222_Bovine_Zimbabwe TTACTACTCA 109
DQ380198_Aedes_macitoshi_Kenya TTACTACTCA 109
*****

```

Figure 6. Alignment of sequences of M RVFV RNA segment. In colour bases that differed between samples (See text).

Table 1. Sampling sites and numbers of captured mosquitoes

| Areas | Region | Sites | Adult sites | <i>C. antennatus</i> | <i>C. decens</i> | <i>C quinquefasciatus</i> | <i>M. uniformis</i> |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------|----------------------|------------------|---------------------------|---------------------|
| Highlands | Amoron'i Mania | Ambositra city | Hospital | 432 | 10 | 63 | 2 |
| Western side | Near Vatovavy Fitovinany | Ranomafana village | Zebu park | 788 | 27 | 11 | 5 |
| | Haute Matsiatra | Fianarantsoa I-II city | Zebu park | 326 | 0 | 29 | 3 |
| North Plains - North West | Diana | Montagne d'Ambre village | Zebu park | 286 | 77 | 35 | 43 |
| Total | | | | 1832* | 114 | 138 | 53 |

C, Culex ; M, Mansonia.

* A total of **1325 females were used to form pools as follows** : Ambositra (350 females = 14 pools of 25 individuals), Ranomafana (450 females = 17 pools of 25 individuals), Montagne d'Ambre (250 females = 10 pools of 25 individuals), Fianarantsoa (300 females = 12 pools of 25 individuals).

Table 2. Lemurs' species and capture sites as in Figure 1

| Capture site | Species | Code | Sexe |
|----------------------------|--|--------|---------|
| PARC ZOOLOGIQUE D'IVOLOINA | - <i>Eulemur rubriventer</i> | I 1 | Male |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | I 2 | Femelle |
| | - <i>Eulemur coronatus</i> | I 3 | M |
| | - <i>Eulemur coronatus</i> | I 4 | F |
| | - <i>Hybride (E. coronatus et albifrons)</i> | I 5 | F |
| | - <i>Hybride (E. coronatus et albifrons)</i> | I 6 | M |
| | - <i>Eulemur fulvus</i> | I 7 | M |
| | - <i>Eulemur fulvus</i> | I 8 | F |
| | - <i>Eulemur macaco flavifrons</i> | I 9 | F |
| | - <i>Eulemur macaco flavifrons</i> | I 10 | M |
| | - <i>Hapalemur griseus</i> | I 11 | M |
| | - <i>Hapalemur griseus</i> | I 12 | F |
| | - <i>Varecia variegata</i> | I 13 | F |
| | - <i>Varecia variegata</i> | I 14 | M |
| RANOMAFANA | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano1 | M |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano2 | F |
| | - <i>Hapalemur griseus</i> | Rano3 | F |
| | - <i>Hapalemur griseus</i> | Rano4 | M |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano5 | F |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano6 | M |
| | - <i>Eulemur rufus</i> | Rano7 | F |
| | - <i>Eulemur rufus</i> | Rano8 | M |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano9 | M |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano10 | F |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano11 | F |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano12 | M |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano13 | F |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano14 | M |
| | - <i>Eulemur rubriventer</i> | Rano15 | M |
| | - <i>Varecia variegata editorium</i> | Rano16 | M |
| | - <i>Varecia variegata editorium</i> | Rano17 | F |
| | - <i>Eulemur rufus</i> | Rano18 | F |
| | - <i>Eulemur rufus</i> | Rano19 | F |

| | | | |
|----------------|---------------------------------------|--------|---|
| ANKARAFANTSIKA | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 1 | F |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 2 | M |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 3 | F |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 4 | M |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 5 | F |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 6 | M |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 7 | F |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 8 | M |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 9 | F |
| | - <i>Eulemur rufus</i> | Akf 10 | M |
| | - <i>Eulemur rufus subadulte</i> | Akf 11 | F |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 12 | F |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 13 | M |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 14 | M |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 15 | M |
| | - <i>Lepilemur edwardsi subadulte</i> | Akf 16 | F |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 17 | F |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 19 | M |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 20 | M |
| | - <i>Lepilemur edwardsi</i> | Akf 21 | F |
| | - <i>Eulemur rufus</i> | Akf 22 | M |
| | - <i>Eulemur rufus</i> | Akf 23 | F |

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les arboviroses sont des pathologies virales adaptées à l'étude des maladies infectieuses émergentes et réémergentes en relation avec la circulation de différents agents infectieux au sein d'une population. Ces épizooties et zoonoses résultent de l'infection de vertébrés (animaux, humains) par des virus transmis par des arthropodes hématophages (moustiques, tiques, phlébotomes, punaises...) lors de leur repas sanguin. Ces dernières années, une explosion d'épidémies d'arboviroses (Chikungunya, Dengue, encéphalite japonaise, Fièvre de la Vallée du Rif, Fièvre du Nile Occidental etc.) ont été observées dans des zones que l'on croyait éradiquer depuis longtemps et s'étendent dans des régions jusque-là épargnées.

Les causes des émergences et réémergences de ces maladies infectieuses sont peu connues mais elles peuvent être aggravées par de nombreux facteurs de risques. Les perturbations environnementales, en particulier, peuvent interférer dans la circulation des agents infectieux. La compréhension des mécanismes de circulation des pathogènes nécessite d'étudier la dynamique et l'écologie des agents infectieux ainsi que les interactions qu'ils peuvent avoir entre eux et avec leurs hôtes, le tout en relation avec les modifications de l'environnement susceptibles de bouleverser les équilibres préexistants entre les pathologies et d'engendrer de nouvelles émergences et réémergences. Cette démarche de recherche est nouvelle, car jusqu'à très récemment, l'étude des maladies infectieuses reposait essentiellement sur une approche verticale, isolant le système microparasite-espèce(s) réservoir(s)-espèce(s) vectrice(s)-Homme. La problématique de recherche actuelle est d'essayer de comprendre **comment et à quels niveaux de l'interaction pathogène-vecteurs/réservoirs-hôtes, les modifications et perturbations de l'environnement peuvent conduire à la transmission des maladies à l'homme.**

Au début de ma thèse, plusieurs foyers d'épidémies de dengue et/ou de chikungunya (Schuffenecker et al. 2006 ; Ratsitorahina et al., 2008) et de fièvre de la vallée du Rift ont été déclarés dans les îles de l'Océan Indien, et l'île de Madagascar n'a pas été épargnée (Andriamandimby et al., 2010; Ratovonjato et al., 2010). Avant ces épidémies de grande envergure, peu d'information était disponible pour expliquer ou éclairer ces émergences et la dynamique locale de transmission. Par exemple, les données entomologiques des vecteurs potentiels étaient rares et anciennes.

Afin de contribuer à la compréhension de ces phénomènes d'émergences et réémergences d'arboviroses à l'échelle de Madagascar, nous avons adopté une approche intégrée multipartite qui prend en compte différents protagonistes en interaction. Ainsi, nos travaux ont porté sur trois volets principaux. Le premier volet concernait les moustiques vecteurs présents dans l'île et donc le choix du modèle à étudier. Outre les pathogènes qu'ils transmettent les données récentes montraient que les moustiques hébergent des communautés microbiennes avec lesquelles ils établissent des relations symbiotiques qui s'inscrivent dans un continuum du parasitisme au mutualisme. Ces symbioses pourraient jouer un rôle dans l'adaptation (invasion) des moustiques dans différents environnements, voir dans la vexion de pathogènes comme démontré il y a une vingtaine d'années pour certains virus transmis par des insectes phytophages (van den Heuvel et al., 1990), et plus récemment chez certains moustiques (Moreira et al., 2009 ; Bian et al., 2010 ; Glaser et al., 2010). Le second volet a donc porté sur la caractérisation et la prévalence des communautés bactériennes associées aux moustiques de Madagascar. Enfin, les réservoirs primaires des arbovirus sont les moustiques vecteurs, mais en Afrique, les primates simiens constituent des réservoirs secondaires qui contribuent au maintien de la circulation avec des passages de barrière d'espèces en cas de promiscuité. Il n'était donc pas absurde d'envisager que les lémuriens, seuls primates non humains de l'île, puisse remplir ce rôle à Madagascar. Le troisième volet a ainsi porté sur la recherche de virus chez les moustiques et les lémuriens de Madagascar. Nous discuterons des résultats acquis sur ces différents volets et il s'ensuivra une conclusion générale et les perspectives qui termineront ce rendu.

1- Enquêtes entomologiques et biogéographie des moustiques vecteurs

a- Les moustiques du genre *Aedes*

A Madagascar, la prévalence des *Aedes*, plus précisément *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, espèces vectrices majeurs de CHIKV et DENV, est très peu étudiée. Seules les études effectuées par Ravaonjanahary en 1975 et Fontenille en 1989 (Ravaonjanahary, 1975 ; Fontenille et Rhodain, 1989) font état de la répartition de ces deux espèces. Au vu des récentes épidémies qui ont sévi dans plusieurs régions de Madagascar, nous avons consacré une partie de notre recherche à la biogéographie et la prévalence de ces deux espèces à Madagascar.

Les enquêtes entomologiques ont été menées dans huit régions choisies pour des antécédents dans l'occurrence avérée ou suspectée d'épidémies d'arboviroses. Les campagnes de collecte ont permis de constater qu'actuellement, une évolution considérable s'est opérée dans la répartition géographique d'*Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*. En effet, si les anciennes données avaient montré une répartition presque égale des deux espèces (Fontenille et Rhodain, 1989), depuis *Ae. albopictus* présente une très nette dominance tant en milieux urbains que périurbains. L'aire géographique de l'espèce *Ae. aegypti* a été réduite à des environnements forestiers peu anthropisés. Nos résultats ont permis d'actualiser les informations sur la biogéographie de ces deux espèces et de dresser une nouvelle carte de distribution, ce qui constitue en soi une avancée importante dans la compréhension des phénomènes d'émergences et de transmission. Ces résultats confirment l'expansion de l'espèce *Ae. albopictus* constatée dans d'autres régions du monde, et son statut de moustique le plus invasif actuellement (Benedict et al., 2007). Les données entomologiques récentes désignent cette espèce comme le principal vecteur impliqué dans la propagation de CHIKV et de DENV dans les îles de l'Océan Indien et dans de nouvelles régions colonisées comme en Europe (Vazeille et al., 2007; Angellini et al., 2007; Delatte et al., 2008; Bagny et al., 2009a, b; Delatte et al., 2009; Gould et al., 2010; Pepin, 2011). *Aedes albopictus* semble doter d'une grande capacité d'adaptation, qui lui permet d'envahir des environnements contrastés, et Madagascar réunit toutes les conditions (climat chaud, fragmentation de l'environnement, anthropisation avancée ...) pouvant faciliter l'installation de ce redoutable vecteur.

b- Compétence vectorielle d'*Aedes albopictus*

Etant donné sa forte prévalence dans l'île et son incrimination dans les épidémies de CHIKV et DENV dans l'Océan Indien, nous avons voulu vérifier la compétence des populations capturées d'*Ae. albopictus*. Les tests ont été réalisés en laboratoire de sécurité de niveau 3 de l'Institut Pasteur de Paris. Les repas sanguins contenaient la souche virulente CHIK 06.21. Les six populations testées sont compétentes (> à 97%) vis-à-vis du virus témoignant d'un bon potentiel de vection. Etant donné que ces populations provenaient de campagnes entomologiques menées dans des régions où sévissaient les épidémies le chikungunya et/ou la dengue (données certifiées de l'Institut Pasteur de Madagascar), il est légitime d'envisager que l'espèce *Ae. albopictus* y jouait un rôle majeur.

c- Les autres moustiques vecteurs

Lors des enquêtes entomologiques, nous avons recherché les moustiques nocturnes, dont le genre *Culex*, capables eux aussi de transmettre les arbovirus comme le virus fièvre de la Vallée du Rift (VFVR) qui cause de grands ravages dans les cheptels, notamment de zébus, ces dernières années à Madagascar. A l'aide notamment de la méthode de «parc à zébu», nous avons pu ainsi capturer des moustiques appartenant majoritairement au genre *Culex*, en particulier à l'espèce dominante *C. antennatus* suivie de *Culex quinquefasciatus*, *Culex decens*, et l'espèce *Mansonia uniformis*. Ces résultats sont en accord avec les données récentes des chercheurs de l'Institut Pasteur de Madagascar (Ratovonjato et al., 2010) qui ont également mis évidence une prévalence de l'espèce *C. antennatus*, mais aussi des espèces du genre *Anopheles*, lors des enquêtes réalisées entre décembre 2008 et avril 2009 dans la région de Haute Matsiatra. Fait intéressant, ces auteurs ont détecté le VFVR chez *C. antennatus* dans le district de Fianarantsoa où sévit une épidémie (Andriamandimby et al., 2010). Bien que l'implication de *C. antennatus* dans ces épidémies n'était pas démontrée, un rôle potentiel était envisageable puisque cette espèce avait déjà été incriminée dans la transmission de VFVR à Madagascar (Clerc et Coulanges, 1979) et en Afrique (Linthicum et al., 1985; EFSA, 2005).

Ces résultats ont conforté notre intention de rechercher le VRVF dans les individus *C. antennatus* collectés lors de nos campagnes entomologiques. Sur les 53 pools (1325 individus), deux pools contenant chacun 25 individus se sont révélés positifs en qRT-PCR du segment M de VRVF. Ces pools provenaient de moustiques collectés dans la région de Diana, qui n'a à notre connaissance aucun antécédent de circulation de VRVF, ce qui suggère un maintien par transmission verticale (Inoue et al., 2003; Sidenko et al., 1974) ou via des réservoirs vertébrés. Pour cette dernière hypothèse, nous avons également recherché et détecté le VFVR chez les lémuriers (voir plus bas).

L'ensemble des données entomologiques recueillies permettent de mettre l'accent sur le fait qu'actuellement à Madagascar, dans tous les endroits où ces vecteurs potentiels existent en nombre élevé, et où toutes les conditions favorables à leur prolifération sont réunies, même si aucun signe de zoonoses n'est visible, il suffirait qu'un facteur de stress se déclare (une pluie abondante par exemple) pour qu'une flambée de ces maladies éclate puisque ces virus sont présents et certains semblent se maintenir à bas bruits. Un renforcement de la surveillance de ces

espèces est à mettre en œuvre afin d'activer à temps les systèmes d'alerte permettant de diminuer les risques épidémiologiques (Andriamandimby et al., 2010).

2- Caractérisation des bactéries endosymbiotiques dans les populations naturelles de moustiques de Madagascar

Les mesures prophylactiques permettant de lutter efficacement contre les maladies vectorielles ont montré leur limite et ne permettent pas toujours d'empêcher la dissémination des agents infectieux dans les zones d'endémies et d'épidémies récentes. Cette faiblesse est en partie due aux résistances des vecteurs et des germes vis-à-vis des pesticides et des anti-infectieux existants. Il est connu par ailleurs que la plupart des arthropodes hébergent des populations microbiennes variées avec lesquelles ils établissent des relations diverses qui s'inscrivent dans un continuum allant du parasitisme au mutualisme. Si différents microorganismes sont antagonistes d'arthropodes et produisent des pesticides, comme la toxine de *Bacillus thuringiensis*, qui sont utilisés dans la lutte contre les insectes nuisibles (Rishikesh & Quelennec 1983), d'autres partenaires microbiens contribuent au succès écologique et reproducteur des hôtes. Par exemple, de nombreux insectes ravageurs de cultures ou vecteurs de pathogènes pour l'homme doivent leur succès reproducteur et leur capacité d'adaptation à des symbioses bactériennes. D'autres symbiotes sont impliqués dans des phénotypes capables de rompre les équilibres écologiques parasites-vecteurs-réservoirs et modifier l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle. Il s'agit par exemple de la spécialisation des hôtes (Tsuchida et al. 2004), la thermotolérance (Montllor et al. 2002), la résistance vis-à-vis des parasitoides (Oliver et al. 2005), et les manipulations de la reproduction (Werren et al., 1998). Enfin, des résultats récents montrent que ces communautés bactériennes peuvent interagir directement avec des virus phytopathogènes et favoriser leur transmission. Un exemple bien documenté est l'interaction entre le virus TYLCV (pour Tomato Yellow Leaf Curl Virus) et son vecteur *Bemisia tabaci* où il a été montré l'implication de la protéine chaperon GroEL produite par les symbiotes dans la transmission virale depuis l'insecte vers la tomate. Un autre exemple, toujours chez les plantes, concerne une bactérie endosymbiotique qui favorise la circulation du virus (leafroll virus) de pomme de terre (van den Heuvel et al. 1994). Il était donc envisageable que ce type d'interactions multipartites ait lieu dans d'autres patho-systèmes vectoriels. Au cours de ces dernières années, un nombre croissant d'études montre que les

symbiotes interfèrent avec les pathogènes vectorisés à la fois au cours du cycle d'infection mais également lors de la transmission. À titre d'exemple, *Wolbachia* protège son hôte *Drosophila* contre une infection par des agents pathogènes (Hedges et al. 2008, Teixeira et al. 2008). Plus récemment, des travaux ont mis en évidence que le transfert artificiel de *Wolbachia* chez le moustique *Aedes aegypti* (McMeniman et al. 2009) permettait de contrôler la transmission d'agents pathogènes comme les arbovirus Chikungunya et dengue ainsi que les parasites *Brugia pahangi* et *Plasmodium galliceum* (Kambris et al. 2009 ; Turley et al. 2009 ; Moreira et al. 2009 ; Bian et al. 2010). La contribution importante de ces communautés microbiennes aux différents phénotypes étendus des vecteurs de maladies a conduit à proposer leur exploitation pour le contrôle biologique. C'est donc dans cet esprit de progresser dans la recherche de moyens de lutte plus efficace et plus respectueuse de l'environnement que ce volet a été mené.

a- Communautés bactériennes associées à *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* de Madagascar

En dehors de *Wolbachia*, la communauté bactérienne de ces deux espèces vectrices majeures de DENV et CHIKV est très peu connue. Pour combler ce vide, une analyse descriptive des communautés bactériennes hébergées par ces deux espèces a été entreprise, recherches auxquelles j'ai participé comme second auteur (Zouache et al., 2011). Différentes approches moléculaires, permettant de s'affranchir de la culture, ont été utilisées pour avoir accès à la diversité des populations bactériennes totales. En particulier, une amplification PCR couplée à l'analyse sur gel dénaturant (PCR-DGGE) a permis d'avoir un profil électrophorétique où chaque bande peut correspondre à une espèce ou à un groupe d'espèces taxonomiquement proches ou non. Les bandes générées peuvent ensuite être excisées et séquencées (Muyzer *et al.*, 1993).

L'analyse des profils PCR-DGGE et des séquences ont permis de détecter différents groupes bactériens appartenant aux classes des Alpha-, Beta- et Gammaprotéobactéries, ainsi qu'aux Firmicutes. Les principaux genres rencontrés inclus : (i) *Bradyrhizobium*, *Rhizobium*, *Rickettsia* et *Wolbachia* pour les Alphaprotéobactéries ; (ii) *Comamonas*, *Delftia* et *Herbaspirillum* pour les Betaprotéobactéries ; (iii) les membres de la famille des *Enterobacteriaceae*, (*Citrobacter*, *Enterobacter*, *Pantoea*, *Yokenella* et *Shigella*), ainsi qu'*Acinetobacter* et *Pseudomonas* pour les Gammaprotéobactéries ; et (iv) *Bacillus* pour les Firmicutes. La plupart des bactéries mises en

évidence lors de cette étude sont couramment rencontrées dans la nature, une acquisition dans les habitats des *Aedes* est donc envisageable, sans pour autant exclure une transmission générationnelle. Pour explorer les relations bactérie- *Aedes*-environnement, une analyse en composante principale des profils DGGE des communautés bactériennes des *Ae. albopictus* a été faite. Le résultat a permis de démontrer : (i) un regroupement de profils lié à l'origine géographique des individus, aussi bien pour les mâles que pour les femelles; et (ii) pour une même niche écologique une variabilité sexe-dépendant. La corrélation de ces données aux différences de couvert végétal et/ou de type d'hôtes vertébrés présents sur les sites de capture traduit une influence des facteurs biotiques par une différence dans la biodisponibilité en ressources. Les facteurs abiotiques n'ont pas été précisément évalués, mais les régions d'échantillonnage avaient été sélectionnées pour leur climat contrasté. Des travaux sont en cours pour étudier le rôle de certains groupes bactériens prévalent, notamment *Acinetobacter* et *Asaia*, sur la biologie des hôtes.

b- Prévalence de *Wolbachia* dans les genres *Culex* et *Mansonia* de Madagascar

A ce jour, la bactérie endosymbiotique du genre *Wolbachia* est parmi les plus étudiées chez les hôtes invertébrés. Sa capacité à manipuler la reproduction de ses hôtes par différents mécanismes, notamment par l'incompatibilité cytoplasmique (Stouthamer et al., 1999), est explorée comme moyen pour contrôler les populations d'insectes nuisibles ou véhiculer des gènes d'intérêt (Sinkins et al., 1997, Bourtzis, 2008). Chez le genre *Aedes* et le complexe *Culex pipiens*, la prévalence de *Wolbachia* a été très bien étudiée. Pourtant à Madagascar, cette prévalence n'a pas beaucoup été exploitée dans les populations naturelles de vecteurs potentiels d'arbovirose. Nous avons donc mené une recherche plus approfondie sur plusieurs espèces de *Culex* (*Culex antennatus*, *Culex decens*, *Culex quinquefasciatus*) et sur l'espèce de *Mansonia uniformis*. Les résultats nous ont permis de confirmer l'infection des *Culex quinquefasciatus* et de démontrer pour la première fois la présence de *Wolbachia* chez *C. decens*. Mieux encore, nous avons constaté l'absence de *Wolbachia* chez *Culex antennatus*, espèce infectée par le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (Ratovonjato et al., 2010). Une étude plus approfondie sur un échantillon plus important est nécessaire avant de mettre en relation les données de l'absence de *Wolbachia* et la présence du RVFV, en particulier si le non portage de *Wolbachia* favorise l'infection du moustique par les virus.

3- La prévalence du virus de la RVF chez les lémuriens de Madagascar

Compte tenu du rôle avéré des primates simiens comme réservoirs d'arboviroses (Wolfe et al., 2001), la suspicion des lémuriens de jouer un rôle similaire a été due au fait qu'ils sont les seules primates non humains qui existent à Madagascar. Notre objectif a été de caractériser la prévalence du virus de la RVF chez lémuriens de trois régions (Boeny : le parc national d'Ankarafantsika ; Atsinanana : le parc zoologique d'Ivoloina et le parc de Ranomafana qui se trouve entre la région d'Amoron'i Mania et Vatovavy Fitovinany) de Madagascar. Ces régions ont été sélectionnées du fait que des sérologies antérieures avaient montré que ces animaux pouvaient être en contact avec différents arbovirus (Fontenille et al., 1988). Au terme de notre recherche, nous avons pu trouver que parmi 56 individus testés par qRT-PCR et séquençage, deux espèces différentes (*Lepilemur edwardsi* et *Eulemur rufus*) ont été positives au RVFV. Même si les séquences obtenues du fragment M soient de petite taille (109 bases), les alignements montrent que ces séquences sont identiques à celles des 2 échantillons de moustiques *Culex antennatus* (vois plus haut) et que les plus proches voisins correspondent aux séquences des isolats de RVFV de sérum humain de Madagascar. Ces résultats suggèrent fortement que les échantillons positifs contiennent bien du virus, et encouragent la poursuite des travaux par le séquençage d'autres marqueurs et l'isolement viral sur culture cellulaire (vero ou C6/36). Une fois confirmé, ses travaux seront pionniers dans la découverte de génome viral chez les Lémuriens, et les séquences permettront de réaliser des comparaisons génomiques et déduire l'origine des souches virales. Ce sont là des conditions sine qua non pour commencer à esquisser des possibilités réelles du rôle de réservoir des lémuriens dans la dynamique de transmission des arbovirus.

4- Les causes et facteurs aggravants les émergences et des réémergences des arbovirus dans le cas de Madagascar

Madagascar se trouve parmi les pays considérés comme prioritaire en matière de biodiversité dans le monde (Myers et al., 2000). Mais, aujourd'hui, il se trouve à la tête des listes rouges des territoires à conserver et à protéger. Cette considération est liée, non seulement à son degré d'endémicité et de ses diversités très élevées mais aussi aux dégradations accélérées de ses faunes et ses flores dues aux destructions massives exercés par l'homme pour ces besoins quotidiens (Green et Sussman, 1990).

L'émergence ou réémergence d'un arbovirose peut être favorisée par tout contexte d'instabilité écologique, paysagère, environnementale ou sociale. Plusieurs grands facteurs importants sont à compter parmi les premières causes de prolifération des maladies infectieuses :

- **La promiscuité** : une anthropisation de plus en plus grandissante entraîne un contact de plus en plus étroit entre les personnes et les animaux domestiques et/ou sauvages. Cette promiscuité entre hommes, animaux domestiques, et animaux sauvages constitue alors un facteur de contagion, qui ne cesse d'augmenter avec la mondialisation des transports et des échanges.
- **L'introduction d'espèces exotiques pathogènes ou vecteurs** porteurs de microbes ou de parasites. L'exemple le plus concret est l'éradication massive de l'espèce *Ae. aegypti* à l'île de La Réunion qui a facilité l'introduction puis l'installation de l'espèce *Ae. albopictus* qui est devenue le vecteur majeur de la dengue et du chikungunya dans l'île (Gubler, 1997 ; Bracco *et al.*, 2007).
- **La perturbation du cycle de l'eau**. La modification des points d'accès d'eau pour la faune (édification de barrage par exemple) intervient également dans la propagation de pathogènes. En effet, ces nouveaux barrages favorisent l'émergence des vecteurs qui sont véhiculés vers l'intérieur des zones d'habitation.
- **L'érosion de la biodiversité** due à une déforestation grandissante entraînant le recul des prédateurs. La réduction ou disparition de prédateurs carnivores augmente les risques de transmission puisque les animaux malades ne sont pas suffisamment consommés et deviennent des facteurs de dangerosité. La déforestation massive a aussi pour conséquence l'assèchement des zones humides. Cette situation peut provoquer des migrations de populations animales vers d'autres habitats, et donc éventuellement véhiculés des pathogènes. Le même scénario est plausible pour les populations.
- **Une modification importante du couvert végétal et de l'utilisation du sol**. Le cas de la fragmentation croissante des forêts, accompagnées d'une intensification de l'urbanisation et de l'agriculture mettent brutalement en contact des pathogènes autrefois isolés en forêt avec des individus naïfs, jamais été exposés, et qui vivent dans des conditions de promiscuité favorisant la transmission.
- **Le changement climatique** : Entre 1970 à 2000, les isogéothermes (lignes marquant sur les cartes une température moyenne donnée) se sont rapprochées des pôles à raison de 56

kilomètres par décennie, offrant de nouveaux milieux à coloniser pour les pathogènes des zones chaudes (Chastel et al., 2002). Ces changements climatiques favorisent alors la propagation des agents pathogènes émergents à travers le monde. De la même manière certains pathogènes colonisent de nouveaux milieux (moins froids) en altitude.

La conjonction de ces facteurs généralistes conduit à la modification des dynamiques de circulation de pathogènes dans l'environnement. Ces facteurs sont aussi à l'origine des mutations et réassortiments génétiques des agents infectieux ayant pour conséquence la modulation de leurs capacités d'adaptation et la génération de résistants.

5- Conclusion et perspectives générales

En conclusion, les perturbations environnementales engendreront un changement de la dynamique d'un pathogène qui aura à son tour pour conséquence une modification de l'équilibre préexistant et entrainera une aggravation des symptômes de la maladie liée à un autre pathogène. Dans une situation écologique stable, celle-ci tend vers un équilibre caractérisé par l'ensemble des pathologies observées dans une situation endémique. La nouvelle pathologie résultant de la perte de l'équilibre environnementale qui pourrait être interprétée comme un phénomène d'émergence ou de résurgence, correspondait en fait à une aggravation des symptômes d'une maladie présente de longue date, sans manifestation clinique tangible. Les activités anthropiques, le facteur majeur de perturbation environnementale, modifient la pathocénose (ensemble des maladies interagissant dans le même environnement au niveau de leurs hôtes et vecteurs, Grnek, 1983) du réservoir, ce qui peut en retour favoriser la transmission à l'homme d'une zoonose.

Au terme de ces travaux de recherches, nous pouvons stipuler que la majorité des points ciblés ont été traités et que certains objectifs ont été atteints. En effet, les différents travaux menés nous ont permis d'aboutir à des conclusions qui permettraient, nous l'espérons en tout cas, de servir de base solide aux études ultérieures dans la connaissance des véritables vecteurs, d'établir des stratégies adéquates de lutte contre les maladies vectorielles à Madagascar.

Cependant, malgré ces avancées, de nombreuses questions demeurent. La figure ci-après résume certaines de nos interrogations sur les différentes relations qui s'exercent aux niveaux des entités majeures dans le schéma multipartenaire pathogènes, vecteurs et leurs communautés microbiennes, réservoirs, et hôtes sensibles. Pour pouvoir statuer sur le rôle exact joué par chacun

des acteurs, il faudrait déployer des recherches encore plus multidisciplinaires qui sont plus adaptées à ce genre d'études.

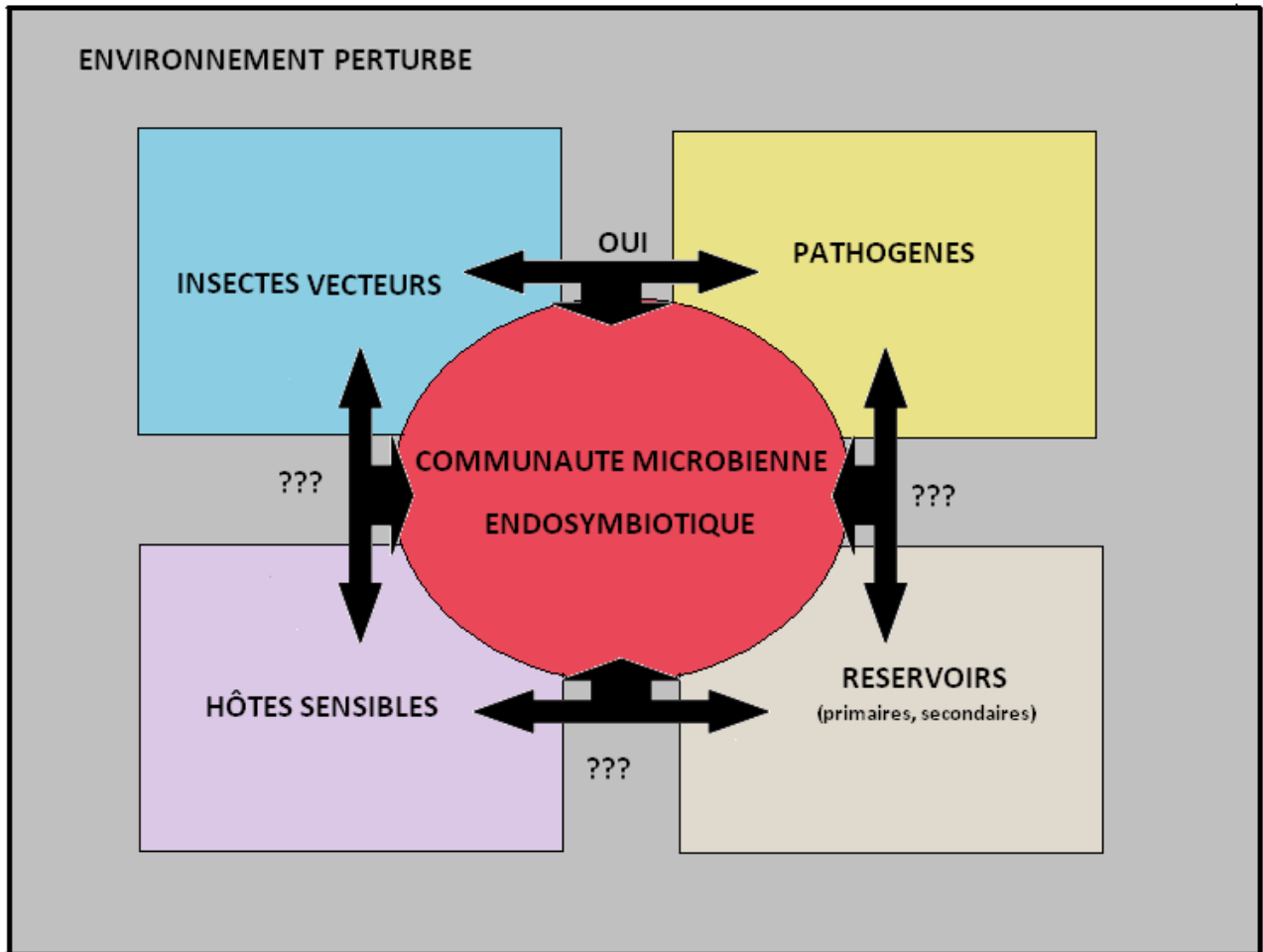


Figure 21. Perspectives générales.

Bibliographie :

- **Adhami J., and P. Reiter.** 1998. Introduction and establishment of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc* 14: 340-3.
- **Aitken T. H. G., Tesh R. B., Beaty B. J., Rosen L.**1979. Transovarial transmission of Y.F.b y mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 28 (1) : 119-1 21.
- **Aksoy S. and Rio R. V.M.** 2005. Interactions among multiple genomes: Tsetse, its symbionts and trypanosomes. *Insec. Bioc. and Molec. Biol.* 35 : 691–698.
- **Aksoy, S.** 2008. Transgenesis and the management of vector-borne disease. Preface. *Adv Exp Med Biol* 627: vii-viii.
- **Al-Hazmi, M., Ayoola, E.A., Abdurahman, M., Banzal, S., Ashraf, J., El-Bushra,A., Hazmi, A., Abdullah, M., Abbo, H., Elamin, A., Al-Sammani el T, Gadour, M.,Menon, C., Hamza, M, Rahim, I., Hafez, M., Jambavalikar, M., Arishi, H., Aqeel, A.** 2003. Epidemic Rift Valley fever in Saudi Arabia: a clinical study of severe illness in humans. *Clin Infect Dis.* 36: 245-252.
- **Amann R. I., W. Ludwig, and K. H. Schleifer.** 1995. Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev* 59:143-69.
- **Andriamandimby S.F., A.E. Randrianarivo-Solofoniaina, E.M. Jean-Marie, L. Ravololomanana, L.T. Razafimanantsoa, T. Rakotojoelinandrasana, J. Razainirina, J. Hoffmann, J.P. Ravalohery, J.T. Rafisandratantsoa, P.E. Rollin, and J.M. Reynes.** 2010. Rift Valley fever during rainy seasons, Madagascar, 2008 and 2009. *Emerg. Infect. Dis.* 16: 963-970.
- **Andrianarisoa et al.** 2007. *Med. Trop.* 67: 19-29.
- **Angelini R. , A. C. Finarelli , P. Angelini, C. Po K. Petropulacos, P. Macini, C. Fiorentini, C. Fortuna, G. Venturi, R. Romi, G. Majori, L. Nicoletti, G. Rezza, and A. Cassone.** 2007. An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill* 12: E070906 1.
- **Angellini P, Macini P, Finarelli AC et al.** 2008. Chikungunya epidemic outbreak in Emilia-Romagna (Italy) during summer 2007. *Parasitologia* 50:97-98.
- **Anonymous** 1998. An outbreak of Rift Valley Fever, eastern Africa, 1997-1998. *Can Commun Dis Rep* **24(12)**: 101-104.
- **Anonymous** 1998. Rift Valley Fever—East Africa, 1997-1998. *MMWR Mor Mortal Wkly Rep* **47(13)**: 261-264

- **Aranda C., R. Eritja, and D. Roiz.** 2006. First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol* 20: 150-2.
- **Arthur R.R., El-Sharkawy, M.S. Cope, S.T., Botros B.A., Qun, S. Morill, J.C. Shope, R.E. Hibbs, R.G. Darwish, M.A. Imam L.Z.** 1993. Recurrence of Rift Valley fever in Egypt. *Lancet.* 342: 1149-1150.
- **Arunachalam N., S. C. Tewari, V. Thenmozhi, R. Rajendran, R. Paramasivan, R. Manavalan, K. Ayanar, and B. K. Tyagi.** 2008. Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J. Med. Res.*127:395-7.
- **Ba Y., Diallo D., Dia I. & Diallo M.** 2006. Comportement trophique des vecteurs du virus de la fièvre de la vallée du Rift au Sénégal : implications dans l'épidémiologie de la maladie. *Bull Soc Pathol Exot.* 99 (4) : 283-289.
- **Bagny L., H. Delatte N. Elissa, S. Quilici, and D. Fontenille.** 2009a. *Aedes* (Diptera: Culicidae) vectors of arboviruses in Mayotte (Indian Ocean): distribution area and larval habitats. *J Med Entomol* 46:198-207.
- **Bagny L., H. Delatte S. Quilici, and D. Fontenille.** 2009b. Progressive decrease in *Aedes aegypti* distribution in Reunion Island since the 1900s. *J Med Entomol* 46:1541-5.
- **Baldo L., S. Bordenstein, J. J. Wernegreen, and J. H. Werren.** 2006. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Mol Biol Evol* **23**: 437-49.
- **Baldo, L. and J. H. Werren.** 2007. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. *Curr Microbiol* 55: 81-7.
- **Baldrige G.D., Burkhardt M.Y., Simser J.A. et al.,** 2004. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** : 6628-6636.
- **Baleta A.** 2009. Insecticide resistance threatens malaria control in Africa. *Lancet.* 374:1581-1582.
- **Balkhy HH, Memish ZA.** 2003. Rift Valley fever: an uninvited zoonosis in the Arabian peninsula. *Int J Antimicrob Agents.* 21:153-7.
- **Bancroft T. L.** 1906. On the aetiology of dengue fever. *Aust Med Gazette* 25:17-18
- **Bandi C., T. J. Anderson, C. Genchi, and M. L. Blaxter.** 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proc Biol Sci* 265: 2407-13.

- **Bandyopadhyay S, Lum L. C, Kroeger A.** 2006. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop Med Int Health*. 11(8):1238-55
- **Bauer J. H.** 1928. Laboratory colonization of *Aedes simpsoni* (Theobald) and *Eretmapodites quinquevittatus* Theobald. *Amer. J. trop. Med.* 8 : 261-282.
- **Baumann P., C. Lai, L. Baumann, D. Rouhbakhsh, N. A. Moran, and M. A. Clark.** 1995. Mutualistic associations of aphids and prokaryotes: biology of the genus *buchnera*. *Appl Environ Microbiol* 61:1-7.
- **Beatty B. J., Tesh R. B., Aitken T. H. G.** 1980. Transovarial transmission of yellow fever virus in *Stegomyia* mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29 (1) : 125-132
- **Benedict M. Q., Levine R. S, Hawley W. A, Lounibos L. P.** 2007. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis* 7:76-85.
- **Bian G. W, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z. Y.** 2010. The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to Dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Path* 6: e1000833.
- **Bocquet J.-P., Molero M.** 1996. Une hypothèse originale : La transmission transovarienne des arbovirus de Finlay à nos jours. *Les Sciences Hors d'Occident au XXe Siècle. Med et Santé.* (4):83-90.
- **Boisier P., Morvan J. M., Laventure S, Charrier N., Martin E. et al.,** 1994. Epidémie de dengue 1 sur l'île de la Grande Comore (République fédérale islamique des Comores): mars-mai 1993. *Ann Soc Belge Med Trop*, 74 : 217-229.
- **Bonilauri P., R. Bellini, M. Calzolari, R. Angelini, L. Venturi, F. Fallacara, P. Cordioli, P. Angelini, C. Venturelli, G. Meriardi, and M. Dottori.** 2008. Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg Infect Dis* 14: 852-4.
- **Bordenstein S. R., C. Paraskevopoulos, J. C. Hotopp, P. Sapountzis, N. Lo, C. Bandi, H. Tettelin, J. H. Werren, and K. Bourtzis.** 2009. Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Mol Biol Evol* 26: 231-41.
- **Bordenstein S., and R. B. Rosengaus.** 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera. *Curr Microbiol* 51:393-8.
- **Borio L., Inglesby T., Peters C. J., Schmaljohn A. L., Hughes J. M., Jahrling P. B., Ksiazek T., Johnson K. M., Meyerhoff A., O'Toole T., Ascher M. S., Bartlett J., Breman J. G., Eitzen E. M. Jr, Hamburg M., Hauer, J., Henderson D. A., Johnson R. T., Kwik G., Layton M., Lillibridge S.,**

- Nabel G. J., Osterholm M. T., Perl T. M., Russell P., Tonat K.** 2002. Hemorrhagic fever viruses as biological weapons: medical and public health management. *JAMA* 287: 2391-2405.
- **Bottieau E., M. Van Esbroeck, L. Cnops, J. Clerinx, and A. Van Gompel.** 2009. Chikungunya infection confirmed in a Belgian traveller returning from Phuket (Thailand). *Euro Surveill* **14**.
 - **Bouchon D., T. Rigaud, and P. Juchault.** 1998. Evidence for widespread *Wolbachia* infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proc Biol Sci* 265: 1081-90.
 - **Bourtzis K.** 2008. *Wolbachia*-based technologies for insect pest population control. *Adv Exp Med Biol* 627: 104-113.
 - **Breeuwer J. A., and G. Jacobs.** 1996. *Wolbachia*: intracellular manipulators of mite reproduction. *Exp Appl Acarol* 20: 421-34.
 - **Brelsfoard C. L., W. St Clair, and S. L. Dobson.** 2009. Integration of irradiation with cytoplasmic incompatibility to facilitate a lymphatic filariasis vector elimination approach. *Parasit Vectors* 2: 38.
 - **Brelsfoard C. L., Y. Sechan, and S. L. Dobson.** 2008. Interspecific hybridization yields strategy for South Pacific filariasis vector elimination. *PLoS Negl Trop Dis* 2: e129.
 - **Brighton S. W., O. W. Prozesky, and A. L. de la Harpe.** 1983. Chikungunya virus infection. A retrospective study of 107 cases. *S Afr Med J* 63: 313-5.
 - **Brighton, S. W., and I. W. Simson.** 1984. A destructive arthropathy following Chikungunya virus arthritis possible association. *Clin Rheumatol* 3: 253-8.
 - **Brinton M. A, Dispoto J. H** 1988 *Virology* 162: 290–299.
 - **Brouard C., P. Bernillon, I. Quatresous, J. Pillonel, A. Assal, H. De Valk, and J. C. Desenclos.** 2008. Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007. *Transfusion* 48: 1333-41.
 - **Brownstein J. S., E. Hett, and S. L. O'Neill.** 2003. The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. *J Invertebr Pathol* 84: 24-9.
 - **Brownstein J. S, Hett E, O'Neill S. L.** 1998. The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. *J Invertebr Pathol* 84: 24–29.
 - **Brunhes J.** 1975. La filariose de Bancroft dans la sous-région malgache (Comores-Madagascar-Réunion). *Mémoires ORSTOM*. 81 : 212 pages.

- **Buchner P.** 1965. Endosymbiosys of animals with plant microorganisms. *Interscience Publisher*. New York. 901.
- **Cahour A, Pletnev A, Vazielle-Falcoz M, Rosen L, Lai C. J.** 1995. *Virology* 207: 68–76.
- **Cao Lormeau.** 2006. Virus de la dengue et moustiques vecteurs : Protéines se liant au virus de la dengue dans les extraits de cellules cibles et de glandes salivaires de moustiques vecteurs. *Thèse de doctorat de l'Université de Polynésie Française*. 173 pages.
- **Carey D. E.** 1971 Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci* 26:243–262.
- **Carey D. E., R. M. Myers, C. M. DeRanitz, M. Jadhav, and R. Reuben.** 1969. The 1964 chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 63: 434-45.
- **Carmona R. J., S. Shaikh, and N. A. Khalidi.** 2008. Chikungunya viral polyarthritits. *J Rheumatol* 35: 935-6.
- **Carroll S. A., Reynes J-M, Khristova M. L., Andriamandimby S. F., Rollin P. E., Nichol S. T.** 2011. Genetic evidence for Rift Valley fever outbreaks in Madagascar resulting from virus introductions from the East African mainland rather than enzootic maintenance. *J. V. I* 85 (13): 6162–6167.
- **Carthy M. C. D. D. & Brent R. H.** 1943. An account of an outbreak of dengue fever in Dzaoudzi, Comoro Islands January, 1943. *East Afr Med J.* 20 : 293-298.
- **Casiraghi M., S. R. Bordenstein, L. Baldo, N. Lo, T. Beninati, J. J. Wernegreen, J. H. Werren, and C. Bandi.** 2005. Phylogeny of *Wolbachia pipientis* based on *gltA*, *groEL* and *ftsZ* gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the *Wolbachia* tree. *Microbiology* 151: 4015-22.
- **Chambers T. J, Hahn C. S, Galler R, Rice C. M.** 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 44: 649–688.
- **Chapouthier, G.**2004. Qu'est-ce que l'animal? Collection "Les petites pommes du savoir", *Editions le Pommier*, Paris.
- **Charlat, S., M. Reuter, E. A. Dyson, E. A. Hornett, A. Duplouy, N. Davies, G. K. Roderick, N. Wedell, and G. D. Hurst.** 2007. Male-killing bacteria trigger a cycle of increasing male fatigue and female promiscuity. *Curr Biol* 17: 273-7.

- **Chastel C., Ambroise-Thomas P., Nordmann R., Bastin R. Tubiana M.,** 2002. Incidence des changements climatiques planétaires sur les arboviroses transmises à l'homme par des moustiques et des tiques. Discussion. *Bul. Acad. National de médecine.* 186 (1) : 89-101.
- **Chastel, C.** 1964. [Human Infections in Cambodia by the Chikungunya Virus or a Closely Related Agent. 3. Epidemiology.]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales* 57: 65-82.
- **Chauvet G., Coz J., Gruchet H., Grjebine A. et Lumaret R.** 1964. Contribution à l'étude biologique de vecteurs du paludisme à Madagascar. Résultats de 5 années d'études (1958-1962). *Méd. trop.* 24 : 27-44.
- **Chauvet G., Ravaonjanahary C. et Brunhes J.,** 1971. Sensibilité et résistance à divers insecticides organophosphorés chez *Culex pipiens fatigans* Wied. en milieu urbain à Madagascar. *C-R- . Séances Soc. Biol.* Tananarive. 165 (2) : 444-448.
- **Chevillon C., L. Briant, F. Renaud, and C. Devaux.** 2008. The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends Microbiol* 16: 80-8.
- **Chungue E, Burocoa C, Boutin J. P, Philippon G, Laudon F et al.** 1992. Dengue-1 epidemic in French Polynesia, 1988-1989: surveillance and clinical, epidemiological, virological and serological findings in 1752 documented clinical cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 86 : 193-197.
- **Chungue E, Cassar O, Drouet M. T, Guzman M. G, Laille M et al.** 1995. Molecular epidemiology of dengue-1 and dengue-4 viruses. *J Gen Virol* 76 : 1877-1884
- **Cleland J. B., Bradley B., Mc Donald W.** 1918. Dengue fever in Australia. Its history and clinical course, its experimental transmission by *Stegomyia fasciata*, and the results of inoculation and other experiments. *J Hyg* 16: 317–418.
- **Cordel H., I. Quatresous, C. Paquet, and E. Couturier.** 2006. Imported cases of chikungunya in metropolitan France, April 2005 - February 2006. *Euro Surveill* 11: E060420 3.
- **Cordellier R.** 1984. La dengue en Afrique : son histoire, la situation actuelle et les orientations à donner aux recherches actuelles. *Bull Soc Entomol France.* 89 : 769-775.
- **Coulanges P., Clerc Y., Jousset F. X., Rodhain F. & Hannoun C.** 1979. Dengue à La Réunion. Isolement d'une souche à l'Institut Pasteur de Madagascar. *Bull Soc Path Ex.* 72 : 205-209.
- **Coz J. M. M., Valade M., Cornet M., Robin Y., Prévot M. A. R.** 1976. Transmission transovarienne d'un Flavivirus, le virus Koutango chez *Aedes aegypti* L. *C.R. Acad.Sc. Paris.* 283 : 109-110.

- **Cutwa M. M. and O'Meara G. F.** Photographique guide to common mosquitoes of Florida. *Florida Medical Entomology Laboratory*.
- **Dale, C., and N. A. Moran.** 2006. Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts. *Cell* 126:453-65.
- **Dalla Pozza G., and G. Marjori.** 1992. First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *J. Am. Mos. Con.* 3.
- **Daubney, R., Hudson, J.R., Garnham, P.C.** 1931. Enzootic hepatitis of Rift Valley fever: an undescribed virus disease of sheep, cattle and human from East Africa. *J Pathol Bacteriol.* 34: 545-579.
- **De Lamballerie X., E. Leroy, R. N. Charrel, K. Ttsetsarkin, S. Higgs, and E. A. Gould.** 2008. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology* 5: 33.
- **Delatte H., A. Desvars, A. Bouetard, S. Bord, G. Gimonneau, G. Vourc'h, and D. Fontenille.** 2009. Blood-Feeding Behavior of *Aedes albopictus*, a Vector of Chikungunya on La Reunion. *Vector Borne Zoonotic Dis.*
- **Delatte H., Gimonneau G., Triboire A. et Fontenille D.** 2009. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *Journal of Medical Entomology.* 46 (1) : 33-41.
- **Delatte H., J. S. Dehecq, J. Thiria, C. Domerg, C. Paupy, and D. Fontenille.** 2008. Geographic distribution and developmental sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) during a Chikungunya epidemic event. *Vector Borne Zoonotic Dis* 8:25-34.
- **Detinova T. S.** 1963. Méthodes à appliquer pour classer par groupe d'âge les Diptères présentant une importance médicale, notamment certains vecteurs du paludisme. *OMS, série monogr.* Genève. 47 : 220.
- **Deubel V, Kinney R. M, Esposito J. J, Cropp C. B, Vorndam A. V, Monath T. P, Trent D. W** 1988. *J Gen Virol* 69: 1921–1929.
- **Deubel V, Laille M, Hugnot J. P, Chungue E, Guesdon J. L, Drouet M. T et al.,** 1990 Identification of dengue sequences by genomic amplification : rapid diagnosis of dengue virus serotype in peripheral blood. *J. Virol. Methods* 30 : 41-54.

- **Diallo M., J. Thonnon, M. Traore-Lamizana, and D. Fontenille.** 1999. Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am J Trop Med Hyg* 60: 281-6.
- **Digoutte J.P. and Peters, C.J.** 1989. General aspects of the 1987 Rift Valley fever epidemic in Mauritania. *Res Virol* 140(1): 27-30.
- **Dillon, R. J., and V. M. Dillon.** 2004. The gut bacteria of insects: non pathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* 49:71-92.
- **Dobson S. L., K. Bourtzis, H. R. Braig, B. F. Jones, W. Zhou, F. Rousset, and S. L. O'Neill.** 1999. *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect. Biochem Mol Biol* 29: 153-60.
- **Dobson S. L., W. Rattanadechakul, and E. J. Marsland.** 2004. Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* 93: 135-42.
- **Doucet J.** 1951. Les *Anophelinés* de la région malgache. *Publications de l'Institut de Recherches Scientifiques de Tananarive Tsimbazaza*. 198 p.
- **Dumler J. S., A. F. Barbet, C. P. Bekker, G. A. Dasch, G. H. Palmer, S. C. Ray, Y. Rikihisa, and F. R. Rurangirwa.** 2001. Reorganization of genera in the families *Rickettsiaceae* and *Anaplasmataceae* in the order *Rickettsiales*: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 2145-65.
- **Dutary B. E. and Leduc J. W.** 1981. Transovarial transmission of Y. F. virus by a sylvatic vector *Hg. equinus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75 : 1173.
- **Easterday B. C., McGavran, M. H., Rooney, J. R., Murphy, L. C.** 1962. The pathogenesis of Rift Valley fever in lambs. *Am J Vet Res* 23: 470-478.
- **Economopoulou A., M. Dominguez, B. Helynck, D. Sissoko, O. Wichmann, P. Quenel, P. Germonneau, and I. Quatresous.** 2009. Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol Infect.* 137: 534-41.
- **Erasmus, B. J. and Coetzer, J.** 1981. The symptomatology and pathology of Rift Valley Fever in Domestic animals. *Contr Epidem Biostatist.* 3: 77-82.

- **Failloux A. B., M. Vazeille, and F. Rodhain.** 2002. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *J Mol Evol* 55: 653-63.
- **Failloux A. B., M. Vazeille-Falcoz, L. Mousson, and F. Rodhain.** 1999. [Genetic control of vectorial competence in *Aedes* mosquitoes]. *Bull Soc Pathol Exot* 92: 266-73.
- **Faraj C., Elkohli M., Lyagoubi M.** 2006. Cycle gonotrophique de *Culex pipiens* (Diptera : Culicidae), vecteur potentiel du virus West Nile, au Maroc : estimation de la durée en laboratoire. *Entomo.Med.* 2846 : 119-121.
- **Farajollahi A., Crans W. J., Bryant P., Burkhalter K. L., Godsey M. S. et al.,** 2005. Detection of West Nile viral RNA from an overwintering pool of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) in New Jersey, 2003. *J Med Entomol.* 42 : 490-494.
- **Favia, G., I. Ricci, M. Marzorati, I. Negri, A. Alma, L. Sacchi, C. Bandi, and D. Daffonchio.** 2008. Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. *Adv Exp Med Biol* 627: 49-59.
- **Feng Lan-chou.** 1938. A critical review of literature regarding the records of mosquitoes from China. Parts I-II.—*Peking nat. Hist.* 12: 169-181, 285-318.
- **Fontenille D. et Mathiot. C.** 1984. Résultats d'une année (1983) d'Enquêtes Entomologiques sur les vecteurs d'arboviroses à Madagascar. *Arch. Inst. Pasteur Madagascar*, 1983. 51 (1) : 161-202.
- **Fontenille D., and F. Rodhain.** 1989. Biology and distribution of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Madagascar. *J Am Mosq Control Assoc* 5: 219-25.
- **Forattini O. P.** 1986. Identification of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) in Brazil. *Rev Saude Publica* 20: 244-5.
- **Fukatsu T., and T. Hosokawa.** 2002. Capsule-transmitted gut symbiotic bacterium of the Japanese common plataspid stinkbug, *Megacopta punctatissima*. *Appl Environ Microbiol* 68: 389-96.
- **Geisbert T. W., Jahrling, P. B.** 2004. Exotic emerging viral diseases: progress and challenges. *Nat Med* 10(12 Suppl): S110-121. Review.
- **Gerardin P., G. Barau, A. Michault, M. Bintner, H. Randrianaivo, G. Choker, Y. Lenglet, Y. Touret, A. Bouveret, P. Grivard, K. Le Roux, S. Blanc, I. Schuffenecker, T. Couderc, F. Arenzana-Seisdedos, M. Lecuit, and P. Y. Robillard.** 2008. Multidisciplinary prospective

- study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Med* 5: e60.
- **Gerdes G. H.** 2004. Rift Valley fever. *Rev Sci Tech* 23(2): 613-623.
 - **Gerrard S.R., Bird, B.H., Albarino, C.G., Nichol, S. T.** 2007. The NSm proteins of Rift Valley fever virus are dispensable for maturation, replication and infection. *Virology*.359(2): 459-465
 - **Gilotra S. K. & Shah K. V.** 1967. *Amer. J. Epidem.* 86 : 379-385.
 - **Giorgi, C., Accardi, L., Nicoletti, L., Gro, M.C., Takehara, K., Hilditch, C., Morikawa, S., Bishop, D.H.** 1991. Sequences and coding strategies of the S RNAs of Toscana and Rift Valley fever viruses compared to those of Punta Toro, Sicilian Sandfly fever, and Uukuniemi viruses. *Virology*. 180(2): 738-753.
 - **Gora, D., Y. Thiongane, et al.** 2000. The potential role of rodents in the enzootic cycle of Rift Valley Fever virus in Senegal. *Microb. Infect.* 2: 343-346.
 - **Gould E. A and Higgs S.** 2009. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions of the Royal Society of Trop. Med. and Hyg.* 103: 109—121.
 - **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. *Clin Microbiol Infect* 165:1702-1704.
 - **Graham H.** 1903. The dengue: a study of its pathology and mode of propagation. *J Trop Med.* 6: 209–214
 - **Green G. M., & Sussman R. W.** 1990. Deforestation History of the Eastern rain forest of Madagascar from satellite images. *Science* 248: 212-215.
 - **Grjebine A.** 1966. Insectes diptères Culicidae Anophelinae. Faune de Madagascar. *Lahure, Paris*. XXII : 487 p. + 8 pl.
 - **Gubler D. J, Sather G. E, Kuno G & Cabral J. R.** 1986. Dengue-3 transmission in Africa. *Am J Trop Med Hyg.* 35. 1280 -1284
 - **Gubler D. J.** 1996. The global resurgence of arboviral diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*90 : 449-451.
 - **Gubler D. J.** 1997. Dengue and dengue hemorrhagic fever: its history and resurgence as a global public health problem. In *Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever* (ed. Gubler, D. J. & Kuno, G.). *Wallingford, UK: CAB International.* 1–22

- **Gubler D. J.** 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev.* 11: 480-496.
- **Gubler D. J.** 2002. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.* 33(4):330-42.
- **Gubler D. J., Trent D. W.** 1994 Emergence of epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health problem in the Americas. *Infect Agents Dis* 2: 383–393
- **Guzman M. G et al.** 1998. Enhanced severity of secondary dengue-2 infections: death rates in 1981 and 1997 Cuban outbreaks. *Pan Am J Public Health.* 11:223-227.
- **Guzman M. G. et al.** 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J Clin Virol.* 27:1-13.
- **Halstead S. B.** 1980 Dengue hemorrhagic fever—public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ* 58: 1–21.
- **Halstead S. B.** 1992 The XXth century dengue pandemic: need for surveillance and research. *Rapp Trimest Stat Sanit Mond* 45: 292–298.
- **Halstead S. B.** 2006. Dengue in the Americas and Southeast Asia: do they differ? *Rev Panam Salud Publica.* 6:407-415.
- **Halstead S. B., Papaevangelou G.** 1980 Transmission of dengue 1 and 2 viruses in Greece in 1928. *Am J Trop Med Hyg* 29: 635–637.
- **Halstead S. B., Scanlon J. E., Umpaivit P. & Udomsakdi S.** 1969. Dengue and Chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 18 : 997-1021.
- **Hammon W. M., and G. E. Sather.** 1964. Virological Findings in the 1960 Hemorrhagic Fever Epidemic (Dengue) in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 13: 629-41.
- **Hammon W. M., Rudnick A. & Sather G.** 1960. New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Transaction of the Association of American Physicians.* 73 : 140-155.
- **Hammond S. N. et al.** 2005. Differences in dengue severity in infants, children and adults in a 3-year hospital-based study in Nicaragua. *Am J Trop Med Hyg.* 73:1063-1070.
- **Harbach R. E.** 1985. Pictorial keys to the genera of mosquitoes, subgenera of *Culex* and the species of *Culex (Culex)* occurring in southwestern Asia and Egypt, with a note on the subgeneric placement of *Culex deserticola* (Diptera: Culicidae). *NHB-165, National Museum of Natural History Washington, DC 20560.* 17(2) : 82-107.

- **Hardy J. L., E. J. Houk, L. D. Kramer, and W. C. Reeves.** 1983. Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol* 28: 229-62.
- **Hawley W. A.** 1988. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association.* 4 : 1–39.
- **Hawley W. A., P. Reiter, R. S. Copeland, C. B. Pumpuni, and G. B. Craig, Jr.** 1987. *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science* 236: 1114-6.
- **Heath B. D., R. D. Butcher, W. G. Whitfield, and S. F. Hubbard.** 1999. Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Curr Biol.* 9: 313-6.
- **Hedges L. M., J. C. Brownli, S. L. O'Neil, and K. N. Johnson.** 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322: 702.
- **Hertig M, Wolbach S.** 1924. Studies on rickettsia-like microorganisms in insects. *J Med Res.* 44: 329–374.
- **Hertig M.** 1936. The *Rickettsia Wolbachia pipientis* and associated inclusion of the mosquitoes *Culex pipiens*. *Parasitology* 28: 453-486.
- **Hilgenboecker K., P. Hammerstein, P. Schlattmann, A. Telschow, and J. H. Werren.** 2008. How many species are infected with *Wolbachia*?-A statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol Lett.* 281: 215-20.
- **Hirsch A.** 1883. Dengue, a comparatively new disease: Its symptoms. In: Handbook of geographical and historical pathology. *Sydenham Society, London.* (1) : 55–81
- **Hoch T., Fourichon Ch., Seegers H.** 2005 Modélisation de la transmission horizontale d'un agent pathogène : Hypothèses biologiques liées au choix de la fonction et influence sur les résultats simulés. *Epidemiol. et Santé Anim.* 47 : 103-111.
- **Hochedez P., P. Hausfater, S. Jaureguiberry, F. Gay, A. Datry, M. Danis, F. Bricaire, and P. Bossi.** 2007. Cases of chikungunya fever imported from the islands of the South West Indian Ocean to Paris, France. *Euro Surveill* 12.
- **Hotta S. & Kimura R.** 1952. Experimental studies on dengue-1. Isolation identification and modification of the virus. *Journal of Infectious Diseases.* 90 : 1-9.
- **Howe G. M.** 1977 A world geography of human diseases. *Academic Press, New York* : 302–317 . http://lrs.afpmb.org/rlgn_app/ar_login/guest/guest

- **Huber K., Loan L. Le, Hoang T. H., Tien T. K., Rodhain F. and Failloux A-B.** 2003. *Aedes Aegypti* In. South Vietnam: Ecology, Genetic Structure, Vectorial Competence And Resistance To Insecticides. *J. Trop Med Public Health.* 34(1): 81-86.
- **Hurst G. D., and J. H. Werren.** 2001. The role of selfish genetic elements in eukaryotic evolution. *Nat Rev Genet.* 2: 597-606.
- **Hyams K. C, Oldfield E. C, Scott R. M, Bourgeois A. L, Gardiner H, Pazzaglia G et al.,** 1986. Evaluation of febrile patients in Port Sudan, Sudan: isolation of dengue virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg* 35 : 860-865.
- **Inoue S., Morita K. et al.,** 2003. Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. *J. Med. Primatol.* 32 : 89-94
- **Ishikawa, H.** 2003. Insects symbiosis: An introduction. In: Bourtzis K and Miller T, eds. Insect Symbiosis. Florida. *CRC Press* 1-21
- **Johnson B. K., Musoke S., Ocheng D., Gichogo A. & Rees P.** 1982. Dengue-2 virus in Kenya. *Lancet.* 1 : 208-209.
- **Kambris Z. , Blagborough A. M., Pinto S. B., Blagrove M. S. C., Godfray H. C. J., Sinden R. E. , Sinkins S. P.** 2010. *Wolbachia* Stimulates Immune Gene Expression and Inhibits Plasmodium Development in *Anopheles gambiae*. *PLoS Pathogens.* 6 (10): 1-9. www.plospathogens.org
- **Kambris Z., Cook P. E., Phuc H. K., Sinkins S. P.** 2009. Immune activation by life shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science* 326: 134–136.
- **Kanesa-Thanan N, Iacono-Connors L, Magill A, Smoak B, Vaughn D et al.,** 1994. Dengue serotypes 2 and 3 in US forces in Somalia. *Lancet* : 43-678.
- **Kaschula V. R., Van dellen A. F., Devos V.** 1978. Some infectious diseases of wild vervet monkeys (*Cercopithecus aethiops pygerythrus*) in South Africa. *J. S. Afr. Vet. Assoc.* 49 : 223-227.
- **Kikuchi Y., T. Hosokawa, and T. Fukatsu.** 2007. Insect-microbe mutualism without vertical transmission: a stinkbug acquires a beneficial gut symbiont from the environment every generation. *Appl Environ Microbiol.* 73:4308-16.
- **Kittayapong P., K. J. Baisley, R. G. Sharpe, V. Baimai, and S. L. O'Neill.** 2002b. Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *Am J Trop Med Hyg* 66: 103-7.

- **Kittayapong P., K. J. Baisley, V. Baimai, and S. L. O'Neill.** 2000. Distribution and diversity of *Wolbachia* infections in Southeast Asian mosquitoes (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* 37: 340-5.
- **Kittayapong P., V. Baimai, and S. L. O'Neill.** 2002a. Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg* 66: 108-11.
- **Klobucar A., E. Merdic, N. Benic, Z. Baklaic, and S. Krcmar.** 2006. First record of *Aedes albopictus* in Croatia. *J Am Mosq Control Assoc* 22: 147-8.
- **Kouri G. P et al.** 1989. Dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome: lessons from the Cuba epidemic, 1981. *Bull World Health Organ.*67:375-380.
- **Lacy, M.D., Smego, R.A.** 1996. Viral hemorrhagic fevers. *Adv Pediatr Infect Dis* 12: 21-53.
- **Laughlin, L. W., Meegan, J. M., Strausbaugh, L. J., Morens, D. M., Watten, R. H.** 1979. Epidemic Rift Valley fever in Egypt: observations of the spectrum of human illness. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 73(6): 630-633.
- **Laurence B. R.** 1960. The biology of two species of mosquito, *Mansonia africana* (Theobald) and *Mansonia uniformis* (Theobald), belonging to the subgenus *Mansonioides* (Diptera, Culicidae). *Bull. Entomol. Res.* 51.
- **Lindenbach B. D, Rice C. M.** 2001. *Flaviviridae: The viruses and their replication.* In: Knipe D. M, Howley P. M (eds) Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia *Fields Virology.* (1): 991–1041.
- **Linthicum K. J, Davies F. G, Kairo A & Bailey C. L.** 1985. Rift Valley fever virus (family Bunyaviridae, genus *Phlebovirus*). Isolations from Diptera collected during an inter-epizootic period in Kenya. *J Hyg (Lond).* 95 : 197-209.
- **Lo N., C. Paraskevopoulos, K. Bourtzis, S. L. O'Neill, J. H. Werren, S. R. Bordenstein, and C. Bandi.** 2007. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 57: 654-7.
- **Lumsden W. H.** 1955. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. II. General description and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 49: 33-57.
- **Maccarthy D.D. & Brent R.H.** 1946. An account of an outbreak of dengue fever in Dzaoudzi, Comoro Islands, January 1943. *East African Medical Journal* 20 : 293-298.

- **Madani T. A., Al-Mazrou, Y. Y., Al-Jeffri, M. H., Mishkhas A. A., Al-Rabeah A. M., Turkistani A. M., Al-Sayed M. O., Abodahish A. A., Khan A. S., Ksiazek T. G., Shobokshi O.** 2003. Rift Valley fever epidemic in Saudi Arabia: epidemiological, clinical, and laboratory characteristics. *Clin Infect Dis* 37(8): 1084-1092.
- **Markoff L, Chang A, Falgout B.** 1994. Processing of fl avivirus structural glycoproteins: stable membrane insertion of premembrane requires the envelope signal peptide. *Virology* 204: 526–540.
- **Martin E., S. Moutailler, Y. Madec, and A. B. Failloux.** 2010. Differential responses of the mosquito *Aedes albopictus* from the Indian Ocean region to two chikungunya isolates. *BMC Ecol* 10: 8.
- **Mattingly P. F. & Brown E. S.** 1955. The mosquitos (Diptera: Culicidae) of the Seychelles. *Bull. ent. Res.* 46 : 69-110.
- **Mavalankar D., P. Shastri, T. Bandyopadhyay, J. Parmar, and K. V. Ramani.** 2008. Increased mortality rate associated with chikungunya epidemic, Ahmedabad, India. *Emerg Infect Dis* 14: 412-5.
- **McCrae A. W., B. E. Henderson, B. G. Kirya, and S. D. Sempala.** 1971. Chikungunya virus in the Entebbe area of Uganda: isolations and epidemiology. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 65: 152-68.
- **McMeniman C. J, Lane R. V., Cass B. N., Fong A. W. C., Sidhu M., et al.** 2009. Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323: 141–144.
- **Meegan J. M.** 1979. The Rift Valley fever epizootic in Egypt 1977-78. 1. Description of the epizootic and virological studies. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 73: 618-623.
- **Meegan J. M., Digoutte J. P., Peters C. J., Shope R. E.** 1983. Monoclonal antibodies to identify Zinga virus as Rift Valley Fever virus. *Lancet* 1(8325): 641.
- **Mellor P. S.** 2000. Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol* 123: 231-47.
- **Metselaar D., Grainger C. R., Oei K. G., Reynolds D. G., Pudney M et al.,**1980. An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull OMS.* 58 : 937-943.

- **Miller B. R., Nasci R. S., Godsey M. S., Savage H. M., Lutwama J. J. et al.** 2000. First field evidence for natural vertical transmission of West Nile virus in *Culex univittatus* complex mosquitoes from Rift Valley province, Kenya. *Am J Trop Med Hyg.* 62 : 240-246.
- **Mitchell C. J.** 1995. Geographic spread of *Aedes albopictus* and potential for involvement in arbovirus cycles in the Mediterranean Basin. *J Vect Ecol.* 20: 44–58.
- **Montllor C. B., Maxmen A., Purcell A. P.** 2002 Facultative bacterial endosymbionts benefits pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol Entomolo* 27: 189–195.
- **Moran N. A., J. P. McCutcheon, and A. Nakabachi.** 2008. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet.* 42: 165-90.
- **Moreira L. A., Iturbe-Ormaeche I., Jeffery J. A., Lu G. J., Pyke A. T., et al.** 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* 139: 1268–1278.
- **Morrill J. C., McClain D. J.** 1996. Epidemiology and pathogenesis of Rift Valley fever and other Phlebovirus. In *“The Bunyaviridae”*. RM Elliot, ED Springer verlag/berlin: 159-188.
- **Morrison A. C. et al.** 1998. Exploratory space-time analysis of reported dengue cases during an outbreak in Florida, Puerto Rico, 1991-1992. *Am J Trop Med Hyg.* 58: 287-298.
- **Morvan J, Saluzzo J. F, Fontenille D, Rollin, P. E., et al.** 1991b. Rift Valley fever on the east coast of Madagascar. *Res Virol.* 142:475–482.
- **Morvan J., Rollin, P.E., Laventure S., Rakotoarivony I., Roux J.**1992. Rift Valley fever epizootic in the central highlands of Madagascar. *Res Virol.* 143(6): 407-415.
- **Mourya D. T., P. Yadav, and A. C. Mishra.** 2004. Effect of temperature stress on immature stages and susceptibility of *Aedes aegypti* mosquitoes to chikungunya virus. *Am J Trop Med Hyg* 70: 346-50.
- **Mousson L., Dauga C., Garrigues T., et al.,** 2005. Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse, Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet. Res. August.* 86(1) : 1–11.
- **Moutailler S, Krida G, Schaffner F, Vazeille M, Failloux AB.** 2008. Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 8:749–54.
- **Moutailler S.** 2007. Conséquences de l’infection par le virus de la Fièvre de la Vallée du Rift pour deux espèces vectrices : *Culex pipiens quinquefasciatus* et *Aedes vexans*. *Thèse de doctorat de l’Université Pierre et Marie Currie.*

- **Murgue B., Murri S., Triki H., Deubel V. & Zeller H. G.** 2001. West Nile in the Mediterranean basin: 1950-2000. *Ann N Y Acad Sci.* 951: 117-126.
- **Muyzer G., E. C. de Waal, and A. G. Uitterlinden.** 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59:695-700.
- **Myers N., Mittermeier R.A., Mittermeier C.B., De Fonseca B., & Jungers K.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- **Nobuchi H.** 1979 The symptoms of a dengue-like illness recorded in a Chinese medical encyclopedia (in Japanese). *Kanpo Rinsho* 26: 422-425
- **Nogueira RMR et al.**2003. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Pan Am J Health.* 2007. 22:258-363.
- **Novak J. E, Kirkegaard K.** 1994. Coupling between genome translation and replication in an RNA virus. *Genes Dev* 8: 1726-1737.
- **Oliver K. M., J. A. Russell, N. A. Moran, and M. S. Hunter.** 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 1803-7.
- **Oliver K. M., Moran N. A., Hunter M. S.** (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12795-12800.
- **Oliver K. M., N. A. Moran, and M. S. Hunter.** 2006. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proc Biol Sci* 273: 1273-80.
- **Onapa A. W. ; Pedersen E. M. ; Reimert C. M. ; Simonsen P. E.** 2007. A role for *Mansonia uniformis* mosquitoes in the transmission of lymphatic filariasis in Uganda? *Acta Tropica.* 101: 159-168.
- **O'Neill, S. L., M. M. Pettigrew, S. P. Sinkins, H. R. Braig, T. G. Andreadis, and R. B. Tesh.** 1997. In vitro cultivation of *Wolbachia pipientis* in an *Aedes albopictus* cell line. *Insect Mol Biol* 6: 33-9.
- **Pages F., C. N. Peyrefitte M. T. Mve, F. Jarjaval, S. Brisse, I. Iteaman, P. Gravier, H. Tolou, D. Nkoghe, and M. Grandadam.** 2009. *Aedes albopictus* mosquito: the main vector of the 2007 Chikungunya outbreak in Gabon. *PLoS One* 4: e4691.
- **Pages F., Corbel V. & Paupy C.** 2006. *Aedes albopictus* : chroniques d'un vecteur expansionniste. *Médecine Tropicale.* 66 : 226-228.

- **Pannebakker B. A., L. P. Pijnacker, B. J. Zwaan, and L. W. Beukeboom.** 2004. Cytology of *Wolbachia* induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae). *Genome* 47: 299-303.
- **Paraskevopoulos C., S. R. Bordenstein, J. J. Wernegreen, J. H. Werren, and K. Bourtzis.** 2006. Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. *Curr Microbiol* 53: 388-95.
- **Pastorino B., J. J. Muyembe-Tamfum, M. Bessaud, F. Tock, H. Tolou, J. P. Durand, and C. N. Peyrefitte.** 2004. Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. *J Med Virol* 74: 277-82.
- **Paupy C., H. Delatte, L. Bagny, V. Corbel, and D. Fontenille.** 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11: 1177-85.
- **Pepin M.** 2011. Fièvre de la Vallée du Rift. *Med et mal. infect.* : 1-8.
- **Pepper O. H. P.** 1941 A note on David Blyon and dengue. *Ann Med Hist 3rd Ser* 3: 363–368.
- **Peyrefitte C., D. Rousset, B. Pastorino, R. Pouillot, M. Bessaud, F. Tock, H. Mansaray, O. L. Merle, A. M. Pascual, C. Paupy, A. Vessiere, P. Imbert, P. Tchendjou, J.-P. Durand, H. J. Tolou, M. Grandadam.** 2007. Chikungunya virus, Cameroon, *Emerg. Infect. Dis.* 13 : 768e771.
- **Pialoux G., B. A. Gauzere, and M. Strobel.** 2006. [Chikungunya virus infection: review through an epidemic]. *Med Mal Infect* 36: 253-63.
- **Rabinowitz P. D., Coffin M. F. and Falvey D.** 1983. The separation of Madagascar and Africa. April. *Science* 4592 (220) : 67-69.
- **Rakotoarivelo R.A., R. Andrianasolo , S. H. Razafimahefa , N. S. Randremandranto Razafimbelo , M. J. D. Randria.** 2011. Severe presentations of Rift Valley Fever in Madagascar. *Med et Mal Inf.* In Press : 1-4.
- **Ratovonjato J., Olive M -M, Tantely L M., Andrianaivolambo L., Tata E., Razainirina J., Jeanmaire E., Reynes J-M., Elissa N.** 2010. Detection, Isolation, and Genetic Characterization of Rift Valley Fever Virus from *Anopheles (Anopheles) coustani*, *Anopheles (Anopheles) squamosus*, and *Culex (Culex) antennatus* of the Haute Matsiatra Region, Madagascar. *Vect. Born and Zoonotic Dis.* Short communication. 1-8.

- **Ratsitorahina M., Harisoa J., Ratovonjato J., Biacabe S., Reynes J-C., Zeller H., Raelina Y., Talarmin A., Richard V., Soares JL.** 2008. Outbreak of Dengue and Chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis.* 14 (7).
- **Ravaonjanahary C.** 1978. Les *Aedes* de Madagascar. *Travaux et documents de l'ORSTOM* : France.
- **Raveloson M. E., Ramorasata J. C., Rasolofohanitrininosy R et coll.** 2010. Fièvre hémorragique grave de la Fièvre de la Vallée du Rift : une observation à Madagascar. *Méd. Trop.* 70: 177-179.
- **Raymond M., Callaghan A., Fort P., Pasteur N.,** 1991. *Nature* 250 : 151-153
- **Reiter P., and D. Sprenger.** 1987. The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 3: 494-501.
- **Reiter P.** 1998. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? *Journal of the American Mosquito Control Association.* 14 : 83- 94.
- **Reiter P., Fontenille D., Paupy C.** 2006. *Aedes albopictus* as an epidemic vector of Chikungunya virus: another emerging problem? *Lancet Inf Dis.* 6: 463–464.
- **Reiter P., R., and F. Darsie** 1984. *Aedes albopictus* in Memphis, Tennessee (USA): an achievement of modern transportation. *Mosquitoes news.* 3. Disponible sur:
- **Renault P., J. L. Solet, D. Sissoko, E. Balleydier, S. Larrieu, L. Filleul, C. Lassalle, J. Thiria, E. Rachou, H. de Valk, D. Illef, M. Ledrans, I. Quatresous, P. Quenel, and V. Pierre.** 2007. A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg* 77: 727-31.
- **Rhodain F.** 1989. La transmission vectorielle. *Bull. Soc. Path. Ex.* 82 : 167-172.
- **Rhodain F, Clerc Y., et al.** 1982. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 76 : 227-231.
- **Rico-Hesse R.**1990. Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology.* 174:479-493.
- **Rishikesh N, Quelenec G.** 1983. *Bull World Health Organ.* 61: 93-103.
- **Rodhain F.** 1991. The role of monkeys in the biology of dengue fever and yellow fever. *Comp. Immun. Microbiol. Infect.Dis.* 14 (1) : 9-19.
- **Rodier G. R, Gubler D. J, Cope S. E, Cropp C. B, Soliman A. K et al.**1996. Epidemic dengue-2 in the city of Djibouti 1991-1992. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 90: 237-240.

- **Ros V. I., V. M. Fleming, E. J. Feil, and J. A. Breeuwer.** 2009. How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl Environ Microbiol* 75: 1036-43.
- **Rosen L.** 1987. Mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. *C R Acad Sci III.* 304 (13): 347-50.
- **Rosen L., Shroyer D.A., Tesh R.B., Freier J.E., Lien J.C.** 1983. Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med.* 32 (5) : 1108-1119.
- **Ross R. W.** 1956. The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond)* 54: 177-91.
- **Rowley, S. M., R. J. Raven, and E. A. McGraw.** 2004. *Wolbachia pipientis* in Australian spiders. *Curr Microbiol* 49: 208-14.
- **Rush AB 1789.** An account of the bilious remitting fever, as it appeared in Philadelphia in the Summer and Autumn of the year. In: Medical inquiries and observation. *Prichard & Hall, Philadelphia* : 104–117.
- **Sabin A.B.** 1952. Research on dengue during World War II. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene.* 1: 30-50.
- **Saleh A. H, Hassan A, Scott R. McN, Mellick P. W, Oldfield III E. C & Podgore J. K.** 1985. Dengue in north-east Africa. *Lancet.* 2 : 211-212.
- **Saluzzo J. F., Digoutte J. P., Chartier C., Martinez D., Bada R.** (1987). Focus of Rift Valley fever virus transmission in southern Mauritania. *Lancet* 28(1): 504.
- **Sang R. C., O. Ahmed, O. Faye, C. L. Kelly, A. A. Yahaya, I. Mmadi, A. Toilibou, K. Sergon, J. Brown, N. Agata, A. Yakouide, M. D. Ball, R. F. Breiman, B. R. Miller, and A. M. Powers.** 2008. Entomologic investigations of a chikungunya virus epidemic in the Union of the Comoros, 2005. *Am J Trop Med Hyg* 78: 77-82.
- **Santhosh S. R., P. K. Dash, M. Parida, M. Khan, and P. V. Rao.** 2009. Appearance of E1: A226V mutant Chikungunya virus in Coastal Karnataka, India during 2008 outbreak. *Virology* 6: 172.
- **Saridaki A., and K. Bourtzis.** 2010. *Wolbachia*: more than just a bug in insects genitals. *Curr Opin Microbiol* 13:67-72.

- **Sarkar J. K., S. N. Chatterjee, S. K. Chakravarti, and A. C. Mitra.** 1965. Chikungunya virus infection with haemorrhagic manifestations. *Indian J Med Res* 53: 921-5.
- **Savage H. M., V. I. Ezike, A. C. Nwankwo, R. Spiegel, and B. R. Miller.** 1992. First record of breeding populations of *Aedes albopictus* in continental Africa: implications for arboviral transmission. *J Am Mosq Control Assoc* 8: 101-3.
- **Saxena S. K., M. Singh, N. Mishra, and V. Lakshmi.** 2006. Resurgence of chikungunya virus in India: an emerging threat. *Euro Surveill* 11: E060810 2.
- **Scarborough C. L., J. Ferrari, and H. C. Godfray.** 2005. Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* 310: 1781.
- **Schaffner F., W. Van Bortel, and M. Coosemans.** 2004. First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in Belgium. *J Am Mosq Control Assoc* 20: 201-3.
- **Schaffner F., and S. Karch.** 2000. [First report of *Aedes albopictus* (Skuse, 1984) in metropolitan France]. *C R Acad Sci III* 323: 373-5.
- **Scholte E. J., E. Dijkstra, H. Blok, A. De Vries, W. Takken, A. Hofhuis, M. Koopmans, A. De Boer, and C. B. Reusken.** 2008. Accidental importation of the mosquito *Aedes albopictus* into the Netherlands: a survey of mosquito distribution and the presence of dengue virus. *Med Vet Entomol* 22: 352-8
- **Schuffenecker I., Itean I., Lichault A., Murri S., Frangeul L., Vaney M.-C., Lavenir R., Pardigon N., Reynes J.-M., Pettinelli F., Biscornet L., Diancourt L., Michel S., Duquerroy S., Guigon G., Frenkiel M.-P., Brehin A.-C., Cubito N., Despres P., Kunst F., Rey F.L.A., Zeller H. & Brisse S.** 2006. Genome Microevolution of Chikungunya viruses causing the Indian Ocean Outbreak. *Plos medicine*, 3 : 1-13.
- **Serbus L. R., C. Casper-Lindley, F. Landmann, and W. Sullivan.** 2008. The genetics and cell biology of *Wolbachia*-host interactions. *Annu Rev Genet* 42: 683-707.
- **Sergon K., C. Njuguna, R. Kalani, V. Ofula, C. Onyango, L. S. Konongoi, S. Bedno, H. Burke, A. M. Dumilla, J. Konde, M. K. Njenga, R. Sang, and R. F. Breiman.** 2008. Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg* 78: 333-7.
- **Shroyer D. A.** 1990. Vertical maintenance of dengue-1 virus in sequential generations of *Aedes albopictus* . *J Am Mosq Control Assoc* 6: 312 – 314 .
- **Sindeko V. P. Grekov V. S.** 1974. *Ornitologiya*. 11 : 356-360.

- **Sinkins S. P., and H. C. Godfray.** 2004. Use of *Wolbachia* to drive nuclear transgenes through insect populations. *Proc Biol Sci* 271: 1421-6.
- **Sinkins S. P., H. R. Braig, and S. L. O'Neill.** 1995a. *Wolbachia pipientis*: bacterial density and unidirectional cytoplasmic incompatibility between infected populations of *Aedes albopictus*. *Exp Parasitol* 81: 284-91.
- **Sinkins S. P., H. R. Braig, and S. L. O'Neill.** 1995b. *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc Biol Sci* 261: 325-30.
- **Sissoko D, Giry C, Gabrié P, et al.** 2009. Émergence chez l'homme de la fièvre de la vallée du Rift à Mayotte, 2007-2008. *BEH.* 4:33–6.
- **Sissoko D, Giry C, Gabrie P, et al.** 2009. Rift Valley fever, Mayotte, 2007-2008. *Emerg Infect Dis.* 15:568–70.
- **Sissoko D., D. Malvy, C. Giry, G. Delmas, C. Paquet, P. Gabrie, F. Pettinelli, M. A. Sanquer, and V. Pierre.** 2008. Outbreak of Chikungunya fever in Mayotte, Comoros archipelago, 2005-2006. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 102: 780-6.
- **Skuse F.** 1894. The banded mosquito of Bengal. *Indian Museum. Notes* 3 : 20.
- **Smith C.E.G.** 1956. The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Tropical Medecine and Hygiene,* 59 : 243-251.
- **Smith K. G. V.** (1973) Insects and other arthropods of medical importance. Book: *The trustees of the British Museum (Natural History) London. Service M. W. Handbook to the Afrotropical toxohynchinitine and culicine mosquitoes, excepting Aedes and Culex. British Museum (Natural History London).*
- **Smithburn K. C., Haddow A. J., Gillet J. D.** 1948. Rift valley fever: isolation of the virus from wild mosquitoes. *Br J Exp Pathol.* 29: 107-121.
- **Stone A.** 1961. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, Supplement I (Diptera, Culicidae). *Proc. Ent. Soc. Wash.* 63 : 29-52.
- **Stone A.** 1963. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, Supplement II (Diptera, Culicidae). *Proc. Ent. Soc. Wash.* 65: 117-224.
- **Stone A.** 1967. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, Supplement III (Diptera, Culicidae). *Proc. Ent. Soc. Wash.* 69: 197-224.
- **Stone A.** 1970. A synoptic catalog of the mosquitoes of the world, Supplement IV (Diptera, Culicidae). *Proc. Ent. Soc. Wash.* 72: 137-171.

- **Stouthamer R., J. A. Breeuwer, and G. D. Hurst.** 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annu Rev Microbiol* 53: 71-102.
- **Swanepoel R., Coetzer J. A. W.** 1994. Rift Valley fever. *In Infectious diseases of livestock with special reference to southern Africa. Eds.: JAW Coetzer, GR Thomson, RC Tustin. Oxford University Press. Capetown. South Africa. : 688-717.*
- **Swanepoel R., Manning B., Watt J. A.** 1979. Fatal Rift Valley fever of man in Rhodesia. *Cent Afr J Med.* 25(1): 1-8.
- **Takumi K., E. J. Scholte, M. Braks, C. Reusken, D. Avenell, and J. M. Medlock.** 2009. Introduction, scenarios for establishment and seasonal activity of *Aedes albopictus* in The Netherlands. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9: 191-6.
- **Teixeira L., Ferreira A., Ashburner M.** 2009. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, 6:e2.
- **Thaung U., C. K. Ming, T. Swe, and S. Thein.** 1975. Epidemiological features of dengue and chikungunya infections in Burma. *Southeast Asian. J Trop Med Public Health* 6: 276-83.
- **Ton nu Van Anh, Mousson L., Huber K., Le Viet Lo, Failloux A. B.** 2001. *Aedes aegypti* (Linné, 1762) and *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) (Diptera : *Culicidae*) in dengue transmission in Nha Trang (South Vietnam) : Preliminary results. *Ann Soc Entomol Fr* 37 : 473-479.
- **Toniaze. C.** 2001. Test de sensibilité aux insecticides chimiques et Biologiques de *Culex quinquefasciatus* vecteur de la filariose urbaine à Madagascar. *Mémoire CAPEN ENS Antananarivo.* 100 pages.
- **Troyo A et al.** 2006. Dengue in Costa Rica: the gap in local scientific research. *Pan Am J Public Health.* 20:350-360.
- **Tsai, K. H., C. G. Huang, L. C. Wang, Y. W. Yu, W. J. Wu, and W. J. Chen.** 2007. Molecular evidence for the endosymbiont *Wolbachia* in a non-filaroid nematode, *Angiostrongylus cantonensis*. *J Biomed Sci* 14: 607-15.
- **Tsetsarkin K. A., D. L. Vanlandingham, C. E. McGee, and S. Higgs.** 2007. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 3: e201.
- **Tsuchida T, R. Koga, T. Fukatsu.** 2004. Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* 303: 1989.
- **Tsuchida T., R. Koga, H. Shibao, T. Matsumoto, and T. Fukatsu.** 2002. Diversity and geographic distribution of secondary endosymbiotic bacteria in natural populations of the

- pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *Mol Ecol* 11: 2123-35.
- **Turell M. J, Linthicum K. J & Beaman J. R.** 1990. Transmission of Rift Valley fever virus by adult mosquitoes after ingestion of virus as larvae. *Am J Trop Med Hyg.* 43, 677-680.
 - **Turley A. P, Moreira L. A, O'Neill S. L, McGraw E. A.** 2009. *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e516.
 - **Turell M. J.** 1988. Horizontal and vertical transmission of viruses by insect and tick vectors. In Monath TP (ed). *The Arboviruses: Epidemiology and Ecology*. Boca Raton, FL: CRC Press. 1 : 127–152.
 - **Van den Heuvel, J.F., Verbeek, M., van der Wilk, F.** 1990. Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J Gen Virol* 75 :2559-2565.
 - **Van Velden D. J., Meyer J. D., Olivier J., Gear J. H., McIntosh B.** 1977. Rift Valley fever affecting humans in South Africa: a clinic pathological study. *S Afr Med J.* 51 (24): 867-871.
 - **Vavre F., Fleury, D. Lepetit, P. Fouillet, and M. Bouletreau.** 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol Biol Evol* 16: 1711-23.
 - **Vazeille M, Rosen L, Mousson L & Failloux A. B.** 2003. Low oral receptivity to dengue type 2 virus of *Aedes albopictus* from southeast Asia compared to that of *Aedes aegypti*. *Am J of Trop Med and Hyg* 68 : 203–208.
 - **Vazeille M., L. Mousson, I. Rakatoarivony, R. Villeret, F. Rodhain, J. B. Duchemin, and A. B. Failloux.** 2001. Population genetic structure and competence as a vector for dengue type 2 virus of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Madagascar. *Am J Trop Med Hyg* 65: 491-7.
 - **Vazeille M., S. Moutailler, D. Coudrier, C. Rousseaux, H. Khun, M. Huerre, J. Thiria, J. S. Dehecq, D. Fontenille, I. Schuffenecker, P. Despres, and A. B. Failloux.** 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: e1168.
 - **Walsh J.**1988. Rift Valley fever rears its head. *Science.* 240(4858): 1397-1399
 - **Weiss B. L., Wang J., Aksoy S.** 2011. Tsetse immune System maturation Requires The presence of obligate symbionts in Larvae. *PLoS Biol* 9 (5): 1-12.

- **Werren J. H.** 1997b. *Wolbachia* run amok. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 11154-5.
- **Werren J. H., L. Baldo, and M. E. Clark.** 2008. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol* 6:741-51.
- **Werren J. H., W. Zhang, and L. R. Guo.** 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc Biol Sci* 261: 55-63.
- **White G.B.** 1989. Lymphatic filariasis. In: Geographical Distribution of Arthropod-borne Diseases and their Principal Vectors. *World Health Organization, Geneva* (Document WHO/VBC/89.967).
- **Wolfe N. D., Escalante A. A., Karesh W. B. et al.,** 1998. *Emerg. Infect. Dis.* 4 : 149-158.
- **Won S., Ikegami, T., Peters, C. J., Makino, S.** 2006. NSm and 78-kilodalton proteins of Rift Valley fever virus are nonessential for viral replication in cell culture. *J Virol.* 80(16): 8274-8278.
- **World Health Organization** 2005. Dengue, Dengue Haemorrhagic Fever and Dengue Shock Syndrome in the Context of the Integrated Management of Childhood Illness. 34 pages. WHO reference number: WHO/FCH/CAH/05.13.
- **World Health Organization.** 1997. Dengue Hemorrhagic Fever: diagnosis, treatment, prevention and control, Second edition. Geneva: WHO.
- **World Health Organization.** 2006. Weekly epidemiological record. NO. 12, 204 March 2006. Disponible sur: <http://www.who.int/wer/2006/wer8112.pdf>.
- **World Health Organization.** Dengue and dengue haemorrhagic fever <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en/>
- **World Health Organization.** Weekly epidemiological record. NO. 47, 23 November 2007. Disponible sur: <http://www.who.int/wer/2007/wer8247.pdf>.
- **Wymann M. N., E. Flacio, S. Radczuweit, N. Patocchi, and P. Luthy.** 2008. Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) - a threat for Switzerland? *Euro Surveill* 13.
- **Xi, Z., J. L. Dean, C. Khoo, and S. L. Dobson.** 2005. Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. *Insect Biochem Mol Biol* 35: 903-10.
- **Yams H KH, Oldfield EC, McNair SR, Bourgeois AL, Gardiner H et al.,** 1986. Evaluation of febrile patients in Port-Sudan, Sudan: isolation of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg.* 35 : 860-865.

- **Yen J. H. and A. R. Barr.** 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *Nature*. 232: 657-658.
- **Zeller H.G.** 1997. Dengue, arbovirus et migrations dans l'Océan Indien. *Lab Vir Institut Past Madagascar*.
- **Zientz, E., T. Dandekar, and R. Gross.** 2004. Metabolic interdependence of obligate intracellular bacteria and their insect hosts. *Microbiol Mol Biol. Rev* 68:745-70.
- **Zouache K., Raharimalala F.N., Raquin V., Tran-Van V., Ravaomanarivo Raveloson L.H., Ravelonandro P., Mavingui P.** 2011. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol* **75** : 377-389.
- **Zouache K., Voronin D., Tran-Van V. & Mavingui P.** 2009a. Composition of bacterial communities associated with natural and laboratory populations of *Asobara tabida* infected with *Wolbachia*. *Appl Environ Microb.* 75: 3755–3764.
- **Zouache K., Voronin D., Tran-Van V., Mousson L., Failloux A. B. & Mavingui P.** 2009b. Persistent *Wolbachia* and cultivable bacterial infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One.* 4: e6388.

ANNEXES

Annexe 1: Extraction d'ADN à partir d'individu de moustique

Avant l'extraction, les moustiques passent à une série de lavages qui correspondent à la stérilisation de surface des moustiques. Le protocole à suivre est le suivant :

- 3 lavages à l'eau Ultra Pure stérilisée (eau aguettant)
- 1 lavage à l'éthanol 70 % pendant 5 minutes
- 5 rinçages à l'eau Ultra Pure stérilisée (eau aguettant)
- Mettre les moustiques, individuellement ou en pool dans des tubes de 2ml avec billes de 5mm à l'intérieur.
- Plonger chaque tube dans un bac d'azote liquide pendant 10 secondes maximum.
- Broyer les moustiques pendant (45 secondes X 2)
- Préchauffer le tampon de lyse de CTAB à 60°C
- Ajouter 200µl de tampon de lyse de CTAB dans chaque tube, bien mélanger
- Incuber 15mn à 60°C
- Laisser refroidir à température ambiante
- Ajouter 4µl de RNase (100mg/ml). Incuber 5min à 37°C
- Ajouter un volume de 200µl de chloroforme/isoamyl alcohol (24/1)
- Agiter vigoureusement (sur le vortex à la vitesse maximale) pendant 5mn.
- Centrifuger à 8 000 rpm pendant 10 mn
- Transférer la phase aqueuse dans un tube (phase supérieure)
- Ajouter un volume de 200µl de Phénol/chloroforme/isoamyl alcohol (25/24/1)
- Transférer la phase aqueuse dans un tube (phase supérieure). Bien noter le volume.
- Ajouter une quantité égale de volume d'isopropyl alcohol.
- Laisser l'ADN précipité à la température ambiante pendant 10 mn. Mixer toutes les 2-3mn
- Centrifuger à 10 000 rpm pendant 10mn
- Enlever le surnageant. Laver le culot d'ADN deux fois avec 700µl d'éthanol à 75%
- Centrifuger à 10 000 rpm pendant 10 mn
- Laisser sécher dans le speed vacuum pendant 10 mn
- Reprendre dans 20µl de TE (Tris 10Mm/ EDTA 1mM) chaque culot.

Annexe 2: Extraction d'ARN à partir de pool de moustique

- Faire des pools de 25 moustiques
- Laver les moustiques à l'eau UP-DEPC (x1), à l'éthanol 70% (x1, 10 min), à l'eau UP-DEPC (x2)
Bien vider toute l'eau ; Centrifuger si besoin
- Mettre chaque pool dans un tube de 2ml à RNase free avec une bille en titane de 5 mm de diamètre.
- Plonger le tube brièvement dans l'azote liquide. Broyer 45s (X2). (Ou plus : vérifier l'état des moustiques)
- Rajouter 500 µl de tampon de lyse CTAB et vortexer pour homogénéiser
- Incuber pendant 20 min à 60°C. Centrifuger 1mn à 7000 rpm.
- Ajouter 500 µl de tri - reagent (TRIzol®, Invitrogen) . Mélanger/Inversion (homogénéiser) en pipetant plusieurs fois
- Ajouter 200 µl de chloroforme. Mélanger/Inversion (homogénéiser) en pipetant plusieurs fois.
- Laisser reposer 3 min à température ambiante. Centrifuger 15 min à 12 000 g à 4°C
- Transférer la phase aqueuse incolore dans un tube propre (mettre les tubes dans un bac à glace)
- Rajouter de nouveau 200 µl de chloroforme (même processus qu'avant)
- Transférer la phase aqueuse incolore dans un tube propre (mettre les tubes dans un bac à glace)

Remarque: bien noter le volume

- Estimer le volume et rajouter un volume égal de LiCl 2M final. Mélanger par pipetage up/down. Laisser précipiter une nuit à – 80 °C
- Centrifuger 15 min à 12 000 g à 4°C
- Rincer le culot 2 fois avec 500 µl d'éthanol 70% DEPC au froid (sans perturber)
- Centrifuger 5 min à 12 000 g à 4°C
- Laisser sécher pendant 10 min au Speed Vac
- Reprendre dans 15 µl d'eau RNase-free
- Conserver à – 80°C en attendant l'utilisation.

Annexe 3 : Composition d'une reaction de mix de PCR avec BSA pour 25µl :

| | |
|-----------------|------|
| H2O: | 18,9 |
| Tampon: | 2,5 |
| MgCl2: | 0,75 |
| dNTP: | 0,5 |
| Amorce Forward: | 0,5 |
| Amorce Reverse: | 0,5 |
| BSA : | 0,25 |
| Taq : | 0,1 |

24µl + 1µl ADN

Annexe 4 : Protocole pour la RT-PCR quantitative :

But : Evaluer précisément le nombre de copies d'ARN du virus de la Fièvre de la Vallée du Rift (VRVF) après extraction d'ARN viraux à partir d'une matrice simple (cellules ou moustiques infectés).

Hygiène et sécurité :

Travail en conditions propres et stériles pour la qRT-PCR (très sensible)

Respect des règles de travail avec l'ARN.

Principe de la méthode :

Après avoir extrait et purifier les ARN totaux depuis une matrice (cellules ou moustiques infectés), on peut mesurer la quantité exacte de copies d'ARN viraux présents dans la matrice au moment de l'extraction en la comparant à des échantillons de concentration connue (gamme standard).

Matériel nécessaire :

- Plaques 96 puits roche
- Tubes 1,5ml autoclavés deux fois
- Tubes « low binding » autoclavés deux fois
- Jeu de pipettes + cônes à filtre + portoirs>spécifiques qRT-PCR (placard ARN)
- LC 480

Réactifs (chimiques et biologiques) :

- Kit qRT-PCR (EXPRESS One-Step SYBR[®] GreenER™ Kits ; cat. N° 11780-200)
- Eau DNA/RNA free UltraPure (Gibco)
- Gamme standard (transcrit ARN de RVF)
- Amorces RVF

Contrainte de la méthode :

Manipulation d'ARN et sensibilité extrême de la méthode aux erreurs de pipetages et aux contaminations.

Mode opératoire :

- Préparer à l'avance l'ensemble des calculs de dilution des ARN matrice : un volume fixe de 2µl sera déposé (faire la dilution en fonction de la quantité d'ARN matrice que l'on souhaite déposer).
- Pour la FVR, 10ng d'ARN par puits seront déposés. On prépare donc des dilutions à 5ng/µl pour pouvoir déposer 2µl.

- Préparer à l'avance son plan de plaque (quel puit contiendra quoi ?)
- Tous les échantillons ainsi que les témoins négatifs sont déposés en triplicats (3 répétitions). Les gammes seront en duplicats (2 répétitions). Pour la RVF, on a choisit une gamme allant de 10^1 à 10^8 ou de 10^2 à 10^9 copies d'ARN viral/ μ l.
- Dans les tubes destinés à la dilution des ARN matrices (tubes « low binding », ajouter le volume d'eau Gibco nécessaire à la dilution, sous hotte. Bien fermer le tube. Changer de pointe en cas de doute, et surtout vérifier à chaque fois que le volume pipeté est le bon.
- Distribuer également l'eau dans les tubes de dilution de Gamme. Généralement, on prépare plusieurs tubes de gamme de haute concentration (entre 10^{11} et 10^9 copies / μ l), et on en utilise un par manipulation, qu'on ne réutilisera plus (toujours éviter les cycles congélation/décongélation au maximum).
- Préparer le mixte qRT-PCR : Tubes 1,5ml RNase free (autoclavés 2X et mis en pot en condition RNase free).
- Le mix se prépare sous la hotte (préalablement décontaminée), en conservant au maximum les produits dans la glace et à l'abri de la lumière si besoin est.
- Une fois le mixte préparé, homogénéiser avec le Pipetman sans vortexer (attention à ne pas trop brusquer pour ne pas que le mix touche le filtre).
- Avant de distribuer le mixte dans la plaque, il est plus prudent d'ajouter des repères visuels pour identifier les puits vides ou pleins (feutre directement sur la plaque). Généralement, on évitera de remplir la totalité de la plaque. De plus, on laissera des puits vides autour des témoins négatifs pour éviter la contamination par micro-éclaboussures.
- Distribuer les ARN dans les puits : commencer par la gamme et finir par les échantillons. Bien homogénéiser entre chaque pipetage et ne pas hésiter à re-centrifuger si besoin est. Attention à ne pas confondre les puits > marquer les puits douteux sur le plan de plaque.
- La plaque est centrifugée 2min à 2000 rpm avant le lancement du programme.

Le programme d'amplification est le suivant :

| | Target (°C) | Aquisition mode | Hold | Ramp rate | Cycles | Acquisition (per °C) |
|---------------------------------------|-------------|-----------------|----------|-----------|--------|----------------------|
| RT | 50 | none | 00:30:00 | 4.40 | 1 | |
| Denaturation | 95 | none | 00:10:00 | 4.40 | 1 | |
| Amplification (quantification) | 95 | none | 00:30:00 | 4.40 | 40 | |
| | 57 | single | 00:01:00 | 2.20 | | |
| | 72 | none | 00:00:30 | 4.40 | | |
| Fusion (melting curves) | 95 | none | 00:00:05 | 4.40 | 1 | |
| | 57 | none | 00:01:00 | 2.20 | | |
| | 97 | continuous | | 0.11 | | 5 |
| Cooling | 40 | none | 00:00:10 | 2.20 | 1 | |

(Ramp rate : variation en T°)

RESUME

Les îles de l'Océan Indien ont connu des émergences et réémergences sévères d'épidémie d'arboviroses ces dix dernières années. Cependant, peu d'informations récentes sont disponibles pour éclairer la dynamique locale des arbovirus et identifier les espèces vectrices et réservoirs. Nous avons choisi l'île Madagascar pour sa forte biodiversité endémique, des conditions climatiques contrastées et des modifications importantes d'habitats en raison des activités anthropiques croissantes. Ces divers facteurs constituent des risques d'aggravation des évolutions épidémiologiques. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse a été de caractériser le rôle des espèces de *Culicidae* vecteurs majeurs, des communautés microbiennes associées aux moustiques et des réservoirs vertébrés (lémuriens) potentiels dans la transmission des arbovirus. L'utilisation de méthodes moléculaires a permis d'actualiser la distribution biogéographique des *Aedes* diurnes et de montrer la dominance de l'espèce *Aedes albopictus* constituée de populations compétentes vis-à-vis du virus chikungunya. Les moustiques nocturnes capturés appartiennent aux espèces *Culex antennatus*, *Culex decens*, *Culex quinquefasciatus* et *Mansonia uniformis*. La présence des bactéries du genre *Wolbachia* a été mise en évidence chez toutes les espèces, excepté *Culex antennatus* qui en est dépourvue. La recherche d'arbovirus par qRT-PCR a révélé l'infection de *Culex antennatus* et de lémuriens (*Lepilemur edwardsi* et *Eulemur rufus*) par le virus de la fièvre de la vallée du rift.

Title: « Exploring the role of *Culicidae* mosquitoes, their microbial communities, and vertebrate reservoirs in the transmission of arboviroses in Madagascar »

ABSTRACT

These last ten years, Indian Ocean islands have been the theatre of severe epidemics of arboviroses. However, little information was available about the local dynamics of the virus transmission and identity of the vector species and vertebrates reservoirs involved. Madagascar island was chosen for its high endemic biodiversity, contrasting climatic conditions and drastic changes in habitats due to an increase anthropic pressure. These factors increase the epidemiological risks of infectious diseases. In this context, our objective was to characterize the role of *Culicidae* as major vectors, the associated microbial communities, and wild vertebrates (lemurs) as potential reservoirs in the transmission arboviroses. Molecular techniques allowed updating the biogeography of *Aedes* and showed the dominance of *Aedes albopictus* competent to chikungunya virus. Other mosquitoes captured belonged to *Culex antennatus*, *Culex decens*, *Culex quinquefasciatus* et *Mansonia uniformis*. The bacterium *Wolbachia* was detected in most mosquito species, but *Culex antennatus*. Searching of arboviruses by qRT-PCR revealed infection of *Culex antennatus* and lemurs (*Lepilemur edwardsi* et *Eulemur rufus*) by the rift valley fever virus.

DISCIPLINE

Ecologie Microbienne

MOTS-CLES

Arboviroses, moustiques, communautés microbiennes, réservoirs, vertébrés, lémuriens, Madagascar

KEYWORDS

Arbovirose, mosquitoes, microbial communities, vertebrates reservoirs, lemurs, Madagascar

INTITULE ET ADRESSE DE L'UFR OU DU LABORATOIRE

Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557 - USC INRA, 1193 – VetAgroSup - Université Claude Bernard Lyon I – Domaine Scientifique de la DOUA – 16 rue Raphaël Dubois – 69622 VILLEURBANNE CEDEX.

Faculté des sciences – Département d'Entomologie. Université d'Antananarivo-MADAGASCAR.