



HAL
open science

Aspects moléculaires de l'influence de la température sur la transmission du virus du chikungunya par le moustique *Aedes albopictus*

Rachel Bellone

► **To cite this version:**

Rachel Bellone. Aspects moléculaires de l'influence de la température sur la transmission du virus du chikungunya par le moustique *Aedes albopictus*. Virologie. Sorbonne Université, 2021. Français. NNT : 2021SORUS072 . tel-03471039

HAL Id: tel-03471039

<https://theses.hal.science/tel-03471039v1>

Submitted on 8 Dec 2021

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

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

Sorbonne Université

Ecole Doctorale Complexité Du Vivant (ED515)

Unité Arbovirus et Insectes Vecteurs, Institut Pasteur, Paris

Aspects moléculaires de l'influence de la température sur la transmission du virus du chikungunya par le moustique *Aedes albopictus*

Par Rachel Bellone

Thèse de doctorat de Virologie

Dirigée par le Professeur Anna-Bella Failloux

Soutenue le 25 juin 2021

Devant un jury composé de :

Mr Dominique Higué, Professeur

Président du jury

Mme Isabelle Leparç-Goffart, Chercheur

Rapporteur

Mr Cyril Caminade, Chercheur

Rapporteur

Mr Christophe Paupy, Directeur de recherche

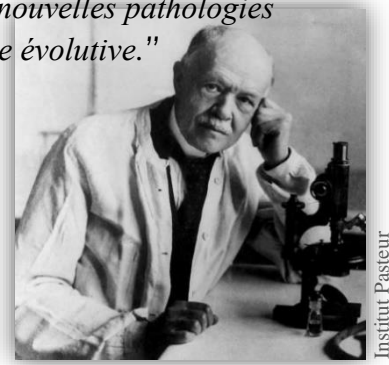
Examineur

Mme Anna-Bella Failloux, Professeur

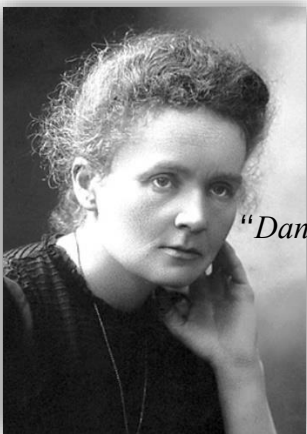
Directrice de thèse

“Depuis toujours, l’homme a vécu avec des maladies infectieuses, de nouvelles pathologies apparaissant, d’autres disparaissant, dans une permanente dynamique évolutive.”

Charles Nicolle, Prix Nobel de médecine 1928



Institut Pasteur



“Dans la vie, rien n’est à craindre, tout est à comprendre. C’est maintenant le moment de comprendre davantage, afin de craindre moins.”

Marie Curie, Prix Nobel de physique 1903 et de chimie 1911

Remerciements

Cette thèse est le résultat de beaucoup de travail, de sacrifices, de persévérance et de nombreux moments de doutes, de stress tout comme de moments de joie. Elle est également le fruit de belles rencontres, tant sur le plan scientifique qu'humain, qui ont participé à rendre cette expérience de vie indéniablement enrichissante et inoubliable.

Pour cela, j'adresse tout d'abord mes sincères remerciements à ma directrice de thèse, Anna-Bella Failloux, de m'avoir fait confiance et offert l'opportunité de réaliser ma thèse au sein de son laboratoire. Je lui suis particulièrement reconnaissante pour son soutien, sa grande implication dans la correction de mon manuscrit et pour toute l'énergie déployée afin de me permettre de travailler dans les meilleures conditions possibles.

Ce fut un réel plaisir de travailler au sein de l'Unité Arbovirus et Insectes Vecteurs dans un cadre où s'allient rigueur et convivialité. Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe (actuels ou passés) pour leur convivialité, leur soutien et leur aide durant ma thèse.

Merci en particulier à Jean-Philippe Martinet qui sans hésitation s'est impliqué pour la réalisation de mon expérience de microbiome bactérien. Merci aussi à Chloé Bohers, Adrien Blisnick, Pei-Shi Yen, Gaëlle Gabiane, Marine Viglietta, Valentine Gilbert, Jean-Charles Gantier, Malika Hocine, Christelle Scaerou, Catherine Gegat et Jocelyne Alexandre pour leur appui et leur bienveillance, en particulier durant la période de rédaction de ma thèse.

Également, merci à Catherine Dauga, pour son implication dans l'analyse de mes données et la correction de mon mémoire expérimental.

Enfin, je remercie Marie Vazeille et Laurence Mousson (ma copine souris ^^) pour leur aide, leurs précieux conseils, leur soutien, leur disponibilité, mais surtout pour la formation et toutes les connaissances que j'ai acquises avec elles. Merci à vous deux du fond du cœur. Merci également à Marie d'avoir gentiment accepté de relire la synthèse bibliographique de mon manuscrit.

Par ailleurs, j'adresse mes vifs remerciements à tous les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mes travaux, en particulier madame Isabelle Leparc-Goffart et monsieur Cyril Caminade qui ont accepté d'être rapporteurs de ma thèse.

Mes remerciements vont également à Dominique Higuët, Hervé Colinet et Hervé Bourhy qui ont participé à mon comité de suivi de thèse. Merci à vous messieurs pour vos conseils et le temps que vous m'avez accordé.

Je remercie, toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer et/ou discuter de mon projet de thèse :

Merci à Philippe Bousses et Christophe Paupy de l'IRD de Montpellier qui m'ont aidé à collecter les œufs du moustique que j'ai utilisé pour mes travaux de thèse. Merci également à Vincent Robert pour son aide durant mon passage à l'IRD de Montpellier.

Je remercie Géraldine Piorkowski et Antoine Nougairède de l'Unité des Virus Emergents de Marseille pour leur contribution et leur aide dans l'avancée de mes travaux.

Merci à Pierre Lechat et Etienne Kornobis qui ont réalisé une grande partie des analyses bio-informatiques des expériences présentées dans ce manuscrit. Merci également à Yoann Madec pour ses analyses statistiques.

Un grand merci à Julie Reveillaud, d'avoir gentiment accepté de m'aider dans le design de mon expérience sur le microbiome bactérien. Je te suis vraiment reconnaissante pour le temps que tu m'as accordé. Je remercie également Raquel Loreto et Sarah Merklings pour leurs conseils au sujet de mon expérience de transcriptome. Merci aussi à Basile Kamgang pour son aide et ses précieux conseils durant son passage au laboratoire et même après.

De plus, je tiens également à remercier les membres du premier laboratoire dans lequel j'ai travaillé, en particulier monsieur Lionel Berthoux, Natacha Mérindol et Nasser Masroori, qui ont su me transmettre le goût de la science.

La thèse ne peut pas uniquement s'ancrer dans la sphère professionnelle, le temps et l'implication que cela demande a nécessité le soutien de mes proches.

Je remercie du fond du cœur tous mes amis de m'avoir soutenue et encouragée durant les moments difficiles de ma thèse. Merci à tous pour vos messages et vos appels.

Enfin, je remercie les membres de ma famille, en particulier mes oncles, mes tantes et mes cousins, qui m'ont accompagnée depuis le début de mes études. Ma reconnaissance va spécialement à ma grand-mère Henriette et à mes tantes Catherine et Ismène qui ont grandement participé à la réussite de mes études. Je suis également reconnaissante d'avoir pu compter sur le soutien et les bons petits plats de ma grand-mère Anne-Marie, même à plus de six mille kilomètres de la Guadeloupe.

Merci à mes deux meilleurs supporters, ma mère et mon frère! Vos messages réguliers ont su m'encourager malgré la distance. Ton soutien et ton aide, maman, ont vraiment été essentiels♥.

Pour finir, je remercie les deux personnes sans qui je ne serais pas là ; mon père, et mon grand-père Gérard qui m'ont donné l'ambition de viser toujours plus loin. Merci papa. Merci papi. Ce travail est, en partie, le vôtre.

Résumé

Le virus du chikungunya (CHIKV) est un arbovirus (*arthropod-borne virus*) émergent qui, au cours des dernières décennies, s'est largement propagé à l'échelle mondiale. Il s'agit d'un virus enveloppé appartenant à la famille des *Togaviridae* et au genre *Alphavirus*. Son matériel génétique est porté par un ARN simple brin de polarité positive, d'environ 12 kb. Le virus est transmis par les moustiques du genre *Aedes*, notamment *Aedes albopictus* qui est aujourd'hui présent dans une soixantaine de départements en France hexagonale. Vecteurs de plusieurs arbovirus, *Ae. albopictus* représente une réelle menace de santé publique.

De façon générale, l'émergence d'arboviroses est liée à la convergence d'un ensemble complexe de facteurs intrinsèques et extrinsèques affectant le vecteur, l'agent pathogène et l'hôte. Le moustique étant un organisme ectotherme, dont la température interne varie avec celle de l'environnement, il est très sensible aux variations de température du milieu ambiant. Un facteur extrinsèque tel que la température pourrait alors de manière directe ou indirecte altérer différents traits de vie et processus biologiques du moustique, avec des effets sur la réplication et la transmission des agents pathogènes qu'ils véhiculent. La relation entre la température et la transmission des arbovirus est complexe et reste encore mal comprise, en particulier sur le plan moléculaire. Pourtant, une meilleure compréhension de l'effet de la température sur la transmission des arbovirus émergents tels que le CHIKV est essentielle afin d'identifier les déterminants facilitant leur transmission et évaluer le risque d'émergence notamment dans les régions tempérées où le moustique vecteur *Ae. albopictus* est désormais implanté et actif.

L'objectif général de ce projet est de mieux comprendre comment la température affecte les interactions virus-moustique et influence les cycles de transmission. Pour cela, nous étudions les aspects moléculaires du CHIKV, de son vecteur *Ae. albopictus* et de leurs interactions sous l'influence de la température. Notre étude se divise en trois axes principaux : (i) suivi de l'évolution génétique du CHIKV *in vitro*, sur cellules de moustiques et *in vivo*, chez le moustique *Ae. albopictus*, à 20°C et 28°C, (ii) analyse de la régulation transcriptionnelle de moustiques infectés et incubés à 20°C et 28°C, et enfin (iii) identification des changements induits par la température sur la composition et la structure des communautés bactériennes du moustique.

Nos résultats indiquent que le CHIKV emprunte des trajectoires évolutives distinctes en fonction du virus, du type cellulaire et de la température. Cependant, en utilisant notre système

de sélection expérimentale, nous ne sommes pas parvenus à obtenir des variants présentant de meilleures capacités de transmission par le moustique *Ae. albopictus* exposé à la température utilisée pour la sélection virale. Ces résultats nous ont conduits à explorer une autre piste, celle qui fait l'hypothèse que la température affectait fortement l'expression des gènes des moustiques, en particulier durant l'infection par le CHIKV, ce que nous avons confirmé par des approches transcriptomiques. Enfin, nous avons observé que la composition du microbiote bactérien du moustique était différemment modifiée par l'infection du CHIKV en fonction de la température d'incubation du moustique.

Dans l'ensemble, nos résultats révèlent que la température agit sur la transmission du CHIKV selon des mécanismes complexes qui agissent en interaction. De plus, ils participent à une meilleure compréhension des mécanismes facilitant la transmission virale en régions tempérées.

Mots clés : virus du chikungunya, *Aedes albopictus*, température, évolution virale, régulation transcriptionnelle, microbiome bactérien.

Abstract

The chikungunya virus (CHIKV) is an emerging mosquito-borne virus which has widely spread around the world in the last two decades. It is an enveloped virus belonging to the *Alphavirus* genus in the *Togaviridae* family. Its genome is a positive single-stranded RNA molecule of approximately 12 kb. The virus is transmitted to human hosts by *Aedes* mosquitoes, including the invasive species *Aedes albopictus*. In France, *Ae. albopictus* has conquered more than half of the territory. As a vector of several viral pathogens, *Ae. albopictus* poses a real threat to the French health authorities.

The emergence of arthropod-borne viruses (arboviruses) such as CHIKV, often results from a complex combination of both intrinsic and extrinsic factors affecting pathogens, their vectors and vertebrate hosts. Since mosquitoes are poikilothermic ectotherms (i.e., internal body temperature is not constant and depends on air temperature), ambient temperature may affect different mosquito life traits and biological processes with consequences on replication and transmission of pathogens they carry. The relation between temperature and arbovirus transmission is a complex phenomenon that remains poorly understood, especially at the molecular level. However, a better understanding of the effect of temperature on the transmission of emerging arboviruses such as CHIKV is essential in order to identify the determinants facilitating their transmission and to assess risk of emergence, particularly in temperate regions where the mosquito vector *Ae. albopictus* is now well established.

The aim of our project is to better understand how temperature affects mosquito-virus interactions and influences transmission cycles. Our studies focus on the effects of temperature on CHIKV, the vector *Ae. albopictus* and their interactions, examined at the molecular level. Our study is divided into three main axes: (i) monitoring CHIKV genetic evolution upon serial passages *in vitro*, on mosquito cells and *in vivo*, on *Ae. albopictus*, at 20°C and 28°C, (ii) examining gene differential expression of mosquitoes exposed to 20°C and 28°C, and (iii) identifying temperature-dependent changes in the mosquito microbiota composition.

Our results show that the CHIKV follows distinct evolutionary trajectories depending on the virus, the temperature and the cell type. However, CHIKV experimentally-adapted to a temperature by serial passages on U4.4 cells does not acquire replicative and transmission gains in mosquitoes exposed to the temperature used for viral selection. These results led us to consider another hypothesis; temperature strongly alters mosquito gene expression during

CHIKV infection, which we confirmed using transcriptomic approaches. Finally, we found that the mosquito bacterial microbiota composition was differently affected by CHIKV infection depending on temperature.

Collectively, our results show that the temperature acts on CHIKV transmission according to complex mechanisms which act in interaction. They may help in forecasting the emergence of CHIKV by identifying the determinants that facilitate its transmission in temperate regions.

Keywords : chikungunya virus, *Aedes albopictus*, temperature, viral evolution, transcriptional regulation, bacterial microbiota.

Table des matières

Remerciements.....	ii
Résumé.....	iv
Abstract.....	vi
Liste des figures.....	xi
Liste des tableaux.....	xiii
Liste de annexes.....	xiii
Liste d'abréviations.....	xiv

INTRODUCTION GENERALE	1
------------------------------	----------

Partie I : Synthèse bibliographique	4
--	----------

Chapitre 1 : Arbovirus et transmission vectorielle	5
1.1. Les arbovirus.....	6
1.1.1. Généralités.....	6
1.1.2. Les mécanismes responsables de la diversité génétique des arbovirus.....	8
1.2. La transmission vectorielle d'arbovirus par le moustique.....	10
1.2.1. Les cycles de transmission.....	10
1.2.2. Développement des arbovirus et défenses antivirales chez le moustique.....	11
1.2.3. Compétence et capacité vectorielle.....	17
1.3. Les arbovirus transmis par les moustiques en Europe.....	23

Chapitre 2 : Le virus du chikungunya	27
2.1. Classification virale.....	28
2.2. Morphologie virale et organisation génomique.....	29
2.3. Cycle de répllication du virus du chikungunya.....	32
2.4. Pathogenèse, manifestations cliniques, traitements et prophylaxies.....	35
2.5. Phylogénie, émergences et distribution mondiale du virus du chikungunya.....	38
2.6. Les cycles de transmission du virus du chikungunya.....	43

Chapitre 3 : <i>Aedes albopictus</i> : une espèce invasive d'importance médicale majeure	45
3.1. Classification taxonomique	46
3.2. Biologie du moustique <i>Ae. albopictus</i>	47
3.2.1. Cycles de développement.....	47
3.2.2. Description morphologique.....	49
3.2.3. Traits de vie du moustique <i>Ae. albopictus</i>	52
3.3. Origine et distribution géographique.....	54
3.4. Importance médicale et mesures sanitaires.....	58
Chapitre 4 : Système vectoriel et facteurs environnementaux	62
4.1. Epidémiologie analytique des maladies à transmission vectorielle.....	63
4.1.1. Les facteurs biotiques.....	64
4.1.2. Les facteurs abiotiques.....	66
4.2. Température et transmission d'arbovirus par les moustiques (Article1).....	69
Partie II : Mémoire expérimental	85
Contexte général.....	86
Chapitre 5 : Matériel biologique et procédures générales	88
5.1. Clones infectieux.....	89
5.2. <i>Ae. albopictus</i> du sud de la France.....	90
5.3. Infection orale des moustiques.....	90
5.4. Analyse de l'efficacité de transmission : technique de la salivation forcée.....	92
5.5. Détection virale par titrage.....	93
Chapitre 6 : Travaux expérimentaux	95
6.1. Effet de la température sur l'évolution et l'adaptation du virus du chikungunya	
6.1.1. Objectifs.....	96
6.1.2. Démarche expérimentale.....	96
6.1.3. Résultats.....	101
6.1.4. Conclusion.....	107
6.1.5. Article 2.....	108

6.2. Effet de la température sur la régulation transcriptionnelle des gènes d' <i>Ae. albopictus</i>	
6.2.1. Objectifs.....	126
6.2.2. Démarche expérimentale et analytique.....	126
6.2.3. Résultats.....	128
6.2.4. Conclusion.....	129
6.2.5. Article 3.....	130
6.3. Effet de la température sur le microbiome bactérien d' <i>Ae. albopictus</i>	
6.3.1. Objectifs.....	166
6.3.2. Démarche expérimentale.....	166
6.3.3. Résultats.....	167
6.3.4. Conclusion.....	167
6.3.5. Article 4.....	168

DISCUSSION GENERALE

183

Références bibliographiques.....	190
Annexes.....	214
Communications scientifiques et travaux collaboratifs.....	218

Liste des figures

Figure 1. Répartition mondiale des arbovirus émergents et réémergents.....	6
Figure 2. Classification des sept principales familles d'arbovirus.....	7
Figure 3. Schéma représentatif d'une quasi-espèce virale.....	8
Figure 4. Cycles de transmission des arbovirus.....	11
Figure 5. Les différentes étapes du développement des arbovirus chez le moustique.....	13
Figure 6. Schéma des voies de signalisation JAK/STAT, Toll et Imd.....	16
Figure 7. Schéma des voies de l'ARN interférant (ARNi).....	17
Figure 8. Interactions génotype x génotype entre le DENV et le moustique <i>Aedes aegypti</i>	19
Figure 9. Effet de la population de moustique, de la souche virale et de la température sur l'efficacité de transmission.....	21
Figure 10. Les facteurs influençant la compétence vectorielle et la capacité vectorielle.....	23
Figure 11. Répartition géographique du WNV, du USUV et du SINV en Europe.....	24
Figure 12. Nombre de cas importés confirmés de dengue, chikungunya et Zika par année en France hexagonale.....	25
Figure 13. Chronologie des cas autochtones de CHIKV, de DENV et de ZIKV en Europe.....	26
Figure 14. Arbre phylogénétique d'isolats représentant toutes les espèces du genre <i>Alphavirus</i>	29
Figure 15. Représentation schématique de l'organisation structurale du CHIKV.....	30
Figure 16. Représentation schématique de l'organisation génomique du CHIKV.....	30
Figure 17. Modèle de réplication du génome viral du CHIKV.....	33
Figure 18. Cycle réplicatif du CHIKV.....	34
Figure 19. Manifestations cliniques de l'infection par le CHIKV.....	37
Figure 20. Arbre phylogénétique représentant les relations phylogénétiques de 74 séquences du CHIKV isolées lors d'épidémies.....	39
Figure 21. Efficacité de transmission du CHIKV par <i>Ae. albopictus</i> du sud de la France.....	41
Figure 22. Carte de la répartition géographique des cas de transmission locale du CHIKV et de ses vecteurs majeurs, <i>Ae. aegypti</i> et <i>Ae. albopictus</i>	42
Figure 23. Cycles de transmission du CHIKV.....	44
Figure 24. Position taxonomique simplifiée d' <i>Ae. albopictus</i>	46

Figure 25. Cycle de développement du moustique <i>Ae. albopictus</i>	49
Figure 26. Photographies des stades pré-imaginaux du moustique <i>Ae. albopictus</i>	49
Figure 27. Anatomie d'une femelle de moustique.....	51
Figure 28. Photographie du moustique <i>Ae. albopictus</i>	51
Figure 29. Distribution mondiale prédictive du moustique <i>Ae. albopictus</i>	56
Figure 30. Carte de répartition du moustique <i>Ae. albopictus</i> en Europe.....	57
Figure 31. Carte de répartition du moustique <i>Ae. albopictus</i> en France.....	57
Figure 32. Triade vectorielle et système vectoriel.....	63
Figure 33. Clones infectieux du CHIKV.....	90
Figure 34. Procédure d'infection expérimentale de moustiques.....	92
Figure 35. Technique de salivation forcée de moustiques.....	93
Figure 36. Représentation schématique des passages des clones du CHIKV <i>in vitro</i> à 20°C et 28°C.....	97
Figure 37. Représentation schématique des passages <i>in vivo</i> , chez le moustique <i>Ae. albopictus</i>	99
Figure 38. Représentation schématique des évaluations d'efficacité de transmission des variants sélectionnés <i>in vitro</i> (en haut) et <i>in vivo</i> (en bas).....	100
Figure 39. Représentation schématique de nos hypothèses en lien avec l'adaptation et la sensibilité à la température des variants viraux.....	101
Figure 40. Evaluation de l'adaptation à la température des variants viraux générés <i>in vitro</i> (P30/U4.4) chez le moustique <i>Ae. albopictus</i>	103
Figure 41. Evaluation de la sensibilité à la température des clones viraux initiaux (P0-V et P0-A) et des variants viraux générés <i>in vitro</i> (P30/U4.4) chez le moustique <i>Ae. albopictus</i>	104
Figure 42. Evaluation de l'adaptation à la température des variants viraux générés <i>in vivo</i> (P5 et P30+P5) chez le moustique <i>Ae. albopictus</i>	105
Figure 43. Evaluation de la sensibilité à la température des clones viraux initial E1-226V (P0-V) et des variants viraux générés <i>in vivo</i> (P5 et P30+P5) chez le moustique <i>Ae. albopictus</i> ...	106
Figure 44. Schéma expérimental d'infection des moustiques pour l'étude du transcriptome.....	127
Figure 45. Schéma expérimental d'infection des moustiques pour l'étude du microbiome bactérien.....	167

Liste des tableaux

Tableau 1.

Les fonctions des protéines du CHIKV.....31

Tableau 2.

Récapitulatif des comparaisons différentielles des transcriptomes de moustiques.....127

Liste des annexes

Annexe 1. Cinétique de transmission des clones infectieux du CHIKV E1-226A et E1-226V (P0) chez le moustique *Ae. albopictus*.....215

Annexe 2. Récapitulatif du nombre de femelles analysées lors des infections orales de moustiques pour l'évaluation des performances de transmission par *Ae. albopictus* des variants générés *in vitro* (P30).....216

Annexe 3. Récapitulatif du nombre de femelles analysées lors des infections orales de moustiques pour l'évaluation des performances de transmission par *Ae. albopictus* des variants générés *in vivo* (P5 et P30_{U4.4}+P5).....217

Liste d'abréviations

A : Alanine	IC : Incompatibilité cytoplasmique
Aag2 : Cellules d' <i>Aedes aegypti</i>	IOL : <i>Indian Ocean Lineage</i>
ADN : Acide désoxyribonucléique	Jpi : Jour post-infection
Ae. : <i>Aedes</i>	min : Minutes
AMPs : Peptides antimicrobiens	mL : Millilitre
ARN : Acide ribonucléique	µL : Microlitre
ARNdb : ARN double brin	mM : Millimolaire
ARNi : ARN interférent	µM : Micromolaire
ARNm : ARN messenger	nsp : Protéines non-structurales
ARNsg : ARN subgénomique	nt : Nucléotides
C0 ₂ : Dioxyde de carbone	ORF : Cadre de lecture ouvert
C6/36 : Cellules d' <i>Ae. albopictus</i>	OTU : Unité Taxonomique Opérationnelle
CHIKV : Virus du chikungunya	P : Passage
Cx. : <i>Culex</i>	P. ex. : Par exemple
DENV : Virus de la dengue	PIE : Période d'incubation extrinsèque (EIP en anglais)
E1 : Protéine d'enveloppe du CHIKV	pH : Potentiel hydrogène
E1-226A : CHIKV avec une alanine en position 226 de la protéine E1	pi : Post-infection
E1-226V : CHIKV avec une valine en position 226 de la protéine E1	<i>spp.</i> : Espèces
ECDC : Centre européen de prévention et de contrôle des maladies	SVF : Sérum de veau foetal
ECSA : Est/Centre/Sud Afrique	T : Thréonine
EEEV : Virus de l'encéphalite équine de l'Est	U4.4 : Cellules d' <i>Ae. albopictus</i>
FFU : <i>Focus-forming unit</i>	V : Valine
GxG : Interactions génotype x génotype	WEEV : Virus de l'encéphalite équine de l'Ouest
GxGxE : Interactions génotype x génotype x environnement	WNV : Virus du Nil occidental
H : Histidine	Y : Tyrosine
HR : Humidité Relative	YFV : Virus de la fièvre jaune
I : Isoleucine	ZIKV : Virus du Zika
	% : Pourcentage
	°C : Degré Celsius

Introduction Générale

Réel fardeau de l'humanité, les maladies infectieuses sont depuis toujours étroitement liées à l'histoire de l'Homme. Dès l'ère néolithique, les civilisations humaines ont dû faire face à des épidémies meurtrières, qui furent pour certaines dévastatrices, changeant parfois même le cours de l'histoire. Si le caractère contagieux des maladies infectieuses fut très vite admis, l'origine et les modes de transmission de ces maladies demeuraient quant à eux énigmatiques, souvent attribués à des malédictions divines. C'est à partir du XIXe siècle, porté par la « théorie du germe » défendu par Louis Pasteur, que l'existence d'une relation de cause à effet entre micro-organismes et maladies fût établie. Toutefois, l'implication d'arthropodes vecteurs dans la transmission de certains de ces agents pathogènes ne fut découverte que plus tard, lorsque les scientifiques furent capables de les isoler de ces vecteurs. Le médecin britannique Patrick Manson observa en 1878 le développement du ver nématode *Wuchereria bancrofti* chez le moustique et fut ainsi le premier à suggérer l'implication d'un insecte dans la transmission d'un agent pathogène à l'Homme (To & Yuen, 2012). En 1881, Carlos Finlay, médecin cubain, émet l'hypothèse selon laquelle les moustiques de l'espèce *Aedes aegypti* seraient responsables de la transmission de l'agent causal de la fièvre jaune (Chiong, 1989). Cette hypothèse fut confirmée par les travaux du médecin américain Walter Reed en 1901 (Clements & Harbach, 2017), donnant ainsi naissance à l'arbovirologie, domaine de la virologie étudiant les arbovirus (acronyme de l'anglais *arthropod-borne virus*) et les maladies qui y sont associées, les arboviroses.

L'identification des modes de transmission des agents pathogènes impliqués dans les grands fléaux de santé publique a permis la mise en place de mesures préventives diminuant largement l'impact sanitaire, social et économique des maladies infectieuses. Dans les années 1930-1950, les campagnes d'éradication du moustique vecteur du virus de la fièvre jaune (YFV), *Ae. aegypti*, ainsi que le développement d'un vaccin, ont permis l'élimination de la fièvre jaune urbaine en Amérique (Frierson, 2010; Soper, 1965). À la fin du XXe siècle, l'accroissement des connaissances en microbiologie et les progrès réalisés en médecine humaine entraînent un net déclin des maladies infectieuses. Cette régression atteint un point culminant avec l'éradication de la variole en 1980. Toutefois, dans un monde en constante évolution, les changements de mode de vie, la croissance démographique, la mondialisation des échanges auxquels s'ajoute la résistance des agents pathogènes aux différents traitements ramènent les maladies infectieuses au-devant de la scène. De nouveaux agents pathogènes émergent et ceux

que l'on pensait maîtriser réapparaissent. Les maladies infectieuses émergentes et réémergentes sont une préoccupation majeure et récurrente. Avec des millions de cas chaque année et comptant pour près d'un quart des maladies infectieuses émergentes (Jones et al., 2008), les maladies à transmission vectorielle représentent une réelle menace de santé publique. Au cours des trois dernières décennies, des arbovirus tels que le virus du Zika (ZIKV), de la dengue (DENV) ou du chikungunya (CHIKV) n'ont cessé d'étendre leur répartition géographique au travers d'épidémies de plus en plus importantes et fréquentes (Mayer, Tesh, & Vasilakis, 2017). La perturbation des écosystèmes, l'intensification des échanges internationaux ainsi que l'expansion des espèces vectrices *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, ont largement contribué à la dissémination mondiale de ces virus.

En Europe, le moustique *Ae. albopictus* est implanté dans plus d'une vingtaine de pays (Duvallet, Fontenille, & Robert, 2017; Medlock et al., 2015) incluant la France, où le moustique fut introduit en 2004 dans les Alpes-Maritimes (E. Scholte & Schaffner, 2007). Aujourd'hui, *Ae. albopictus*, occupe désormais plus de la moitié du territoire français (Ministère des Solidarités et de la Santé, (2021b)). Les premiers cas de transmission autochtone assurée par *Ae. albopictus* en Europe furent détectés en 2007 dans la région de Ravenne en Italie, moins de 20 ans après les premiers signalements de la présence du moustique (Sabatini, Raineri, Trovato, & Coluzzi, 1990). Il s'agissait d'une épidémie d'une trois centaines de cas de chikungunya (Rezza et al., 2007). Par la suite, de nouveaux épisodes de transmission locale furent recensés en 2010 et en 2014 en France puis en 2017 en France et en Italie (ECDC, 2020b; Grandadam et al., 2011; Rezza, 2018), confirmant ainsi le rôle de vecteur du CHIKV de l'*Ae. albopictus* européen. Cette situation soulève de nombreuses interrogations quant au risque de survenue d'épidémies de chikungunya de grande ampleur dans les régions tempérées colonisées par *Ae. albopictus*.

De façon générale, l'émergence d'arboviroses est liée à la convergence d'un ensemble complexe de facteurs intrinsèques et extrinsèques affectant le vecteur, l'agent pathogène et l'hôte. Le moustique étant un organisme ectotherme, dont la température interne varie avec celle de l'environnement, il est très sensible aux variations de température du milieu ambiant. Un facteur extrinsèque tel que la température pourrait alors de manière directe ou indirecte altérer différents traits de vie (développement, survie, taux de pique, etc.) et processus biologiques du moustique (p.ex., durée d'incubation du virus chez le vecteur), avec des effets sur la réplication et la transmission des agents pathogènes qu'ils véhiculent. La relation entre la température et la transmission des arbovirus est complexe et reste encore mal comprise, en particulier sur le plan moléculaire. Pourtant, une meilleure compréhension de l'effet de la

température sur la transmission des arbovirus émergents tel que le CHIKV est essentielle afin d'identifier les déterminants facilitant leur transmission et évaluer le risque d'émergence notamment dans les régions tempérées qui ne sont désormais plus épargnées par ces agents pathogènes dits « tropicaux ».

L'objectif général de ce projet est de mieux comprendre comment la température affecte les interactions virus-moustique et influence les cycles de transmission. Pour cela, nous étudions les aspects moléculaires de l'effet de la température sur le CHIKV et son vecteur *Ae. albopictus*.

Ce manuscrit de thèse se compose de deux parties : une synthèse bibliographique et un mémoire expérimental.

La synthèse bibliographique a pour but de faire un état des lieux des connaissances actuelles et de fournir au lecteur tous les éléments de contexte permettant une bonne compréhension du sujet. Elle se divise en 4 chapitres :

- Le premier chapitre traite des caractéristiques des arbovirus et de leur mode particulier de transmission. Dans ce chapitre, les concepts fondamentaux de l'entomologie médicale que sont la compétence et la capacité vectorielle sont abordés ;
- Le second chapitre porte sur les connaissances générales et fondamentales sur le CHIKV ;
- Le troisième chapitre fait la description biologique du moustique *Ae. albopictus* en mettant en avant son rôle de vecteur d'agents pathogènes ;
- Enfin, le dernier chapitre vise à replacer les acteurs du système vectoriel dans leur contexte environnemental. Les facteurs environnementaux agissant sur l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle y sont décrits. Ce chapitre se termine par une revue bibliographique de l'effet de la température sur la transmission des virus par le moustique.

La deuxième partie de ce manuscrit correspond au mémoire expérimental et est composée de deux chapitres (chapitre 5 et 6). Le premier chapitre décrit le matériel biologique et les procédures techniques générales utilisées au cours des expériences de la thèse. Le deuxième chapitre présente les travaux expérimentaux et est divisé en trois sections correspondant chacune aux principaux axes étudiés dans le projet : évolution virale, régulation transcriptionnelle et modification du microbiome bactérien du moustique.

Le manuscrit s'achève par une discussion générale des résultats obtenus.



Partie I

Synthèse bibliographique

Sommaire

Chapitre 1

Arbovirus et transmission vectorielle

Chapitre 2

Le virus du chikungunya

Chapitre 3

Aedes albopictus : une espèce invasive d'importance médicale majeure

Chapitre 4

Système vectoriel et facteurs environnementaux (Article 1)

Chapitre 1

Arbovirus et transmission vectorielle

National Institute of Infectious Diseases



« Les moustiques, de simples seringues volantes ? »

Ce premier chapitre de la synthèse bibliographique illustre la complexité des interactions entre les virus et leurs vecteurs ; il est composé de trois sections. L'intérêt de ce chapitre est d'identifier les acteurs du système vectoriel et de décrire les facteurs qui les influencent.

La première partie présente des généralités sur les arbovirus et la suivante traite des mécanismes d'évolution virale. Une partie importante de ce chapitre est dédiée aux notions liées à la transmission vectorielle. Enfin, la dernière partie est consacrée à la situation épidémiologique des arbovirus en Europe.

1. Chapitre 1 : Arbovirus et transmission vectorielle

1.1. Les arbovirus

1.1.1. Généralités

Les arbovirus sont un groupe de virus transmis entre hôtes vertébrés sensibles, par le biais d'arthropodes hématophages tels que les tiques, les phlébotomes, les culicoïdes ou encore les moustiques. À l'heure actuelle, plus de 500 arbovirus ont été décrits et répertoriés dans le Catalogue International des Arbovirus. Parmi ces virus, seule une centaine serait pathogène pour l'Homme (Gubler, 2001). Les arbovirus circulent principalement dans les régions tropicales et subtropicales, où les conditions climatiques sont favorables à une transmission par les arthropodes vecteurs quasiment toute l'année (Gubler, 2002). Toutefois, depuis quelques années, cette répartition tend à changer avec l'augmentation de l'incidence de cas d'infections autochtones dans les régions tempérées comme la France (Figure 1). Les arbovirus constituent un réel problème de santé publique avec des conséquences socio-économiques importantes. L'infection chez l'Homme, se traduit par un tableau clinique polymorphe allant de cas asymptomatiques à des cas sévères, voire mortels.

De manière générale, les arbovirus sont la cause de trois principaux syndromes chez l'Homme : (i) les maladies fébriles systémiques, (ii) les fièvres hémorragiques, et (iii) les maladies neurologiques invasives (Gubler, 2001).

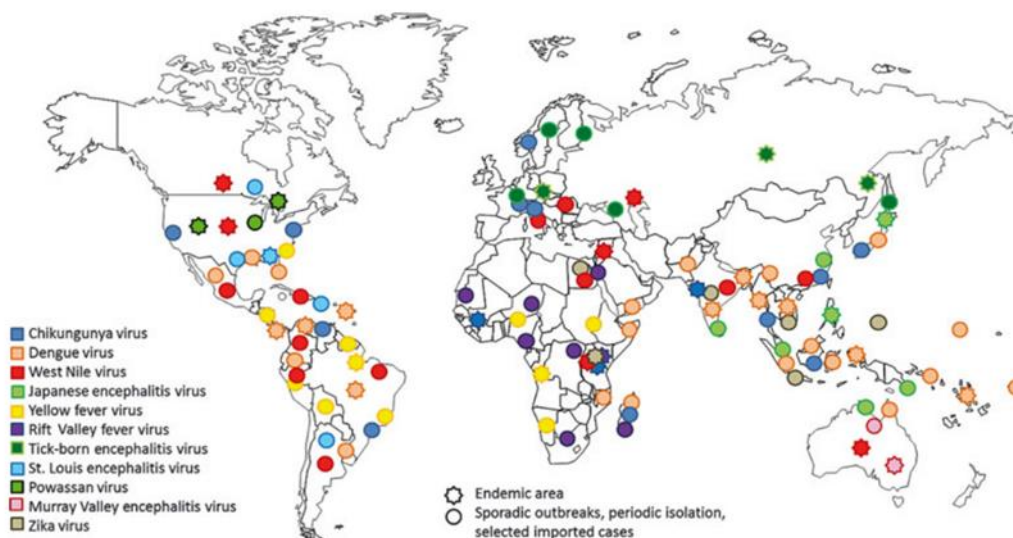


Figure 1. Répartition mondiale des arbovirus émergents et réémergents (Anez, Chancey, Grinev, & Rios, 2012).

D'un point de vue taxonomique, les arbovirus forment un groupe hétérogène de virus appartenant à des familles virales différentes. Mis à part quelques exceptions, tous les arbovirus appartiennent à sept familles virales : *Flaviviridae* (genre *Flavivirus*), *Togaviridae* (genre *Alphavirus*), *Phenuiviridae* (genre *Phlebovirus*), *Peribunyaviridae* (genre *Orthobunyavirus*), *Nairoviridae* (genre *Orthonairovirus*), *Rhabdoviridae* (genre *Vesiculovirus*) et *Reoviridae* (genre *Orbivirus* et *Coltivirus*) (Figure 2). Ces virus diffèrent de par leur type de génome, leur organisation structurale et leur stratégie de réplication. À l'exception du virus de la peste porcine africaine (Famille *Asfarviridae*, Genre *Asfivirus*) qui est un virus à ADN, le patrimoine génétique de l'ensemble des arbovirus est porté par une molécule d'ARN. Selon les caractéristiques de la famille virale, cet ARN peut être segmenté ou non, simple ou double brin et dans le cas des simples brins, de polarité positive ou négative.

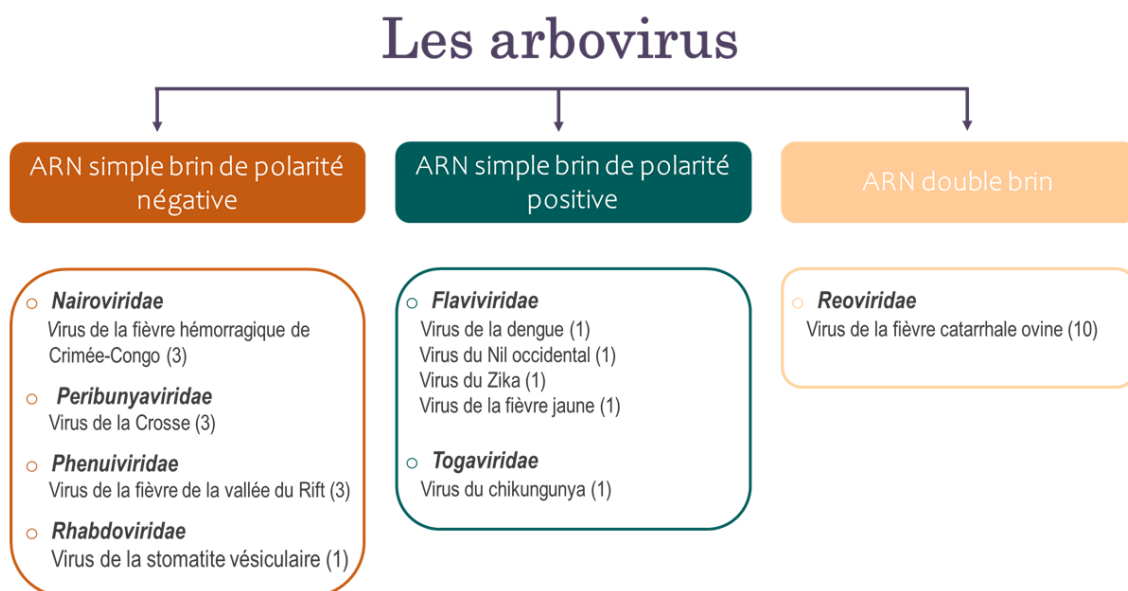


Figure 2. Classification des sept principales familles d'arbovirus. Chaque famille virale est exemplifiée par un ou plusieurs virus bien connus avec entre parenthèses le nombre de segments que possède le virus. Il faut noter que tous les virus appartenant à ces familles virales ne sont pas des arbovirus.

1.1.2. Les mécanismes moléculaires responsables de la diversité génétique des arbovirus

1.1.2.1. Mutations ponctuelles et pressions de sélection

Une des principales sources de diversité chez les arbovirus est l'incorporation aléatoire de mutations ponctuelles (insertions, délétions, substitutions) dans les séquences génomiques virales. En effet, contrairement aux polymérases à ADN, les ARN polymérases ARN-dépendantes chargées de la réplication des génomes viraux à ARN ne possèdent pas d'activité de relecture et de correction des mésappariements (E. C. Smith, 2017; Steinhauer, Domingo, & Holland, 1992). De ces caractéristiques, résulte un mode de réplication peu fidèle, conduisant à l'incorporation d'erreurs au sein des génomes viraux à ARN. En moyenne, la fréquence mutationnelle des arbovirus est de l'ordre de 10^{-4} , correspondant approximativement pour un génome de 10 kb, à une erreur par génome néosynthétisé (Coffey, Forrester, Tsetsarkin, Vasilakis, & Weaver, 2013). L'accumulation des mutations, couplée à une réplication rapide générant des populations virales de grande taille, permettent aux virus à ARN d'exister sous la forme de populations virales hétérogènes appelées quasi-espèces (Domingo & Perales, 2019). Au sein de la quasi-espèce, le processus dynamique d'équilibre entre mutation et sélection naturelle permet un maintien stable d'une population de variants génétiques organisée autour d'un génotype consensus (Figure 3). Certaines mutations bénéfiques à la réplication seront alors sélectionnées et en devenant majoritaires, pourront être intégrées à la séquence consensus tandis que d'autres mutations, délétères ou neutres, disparaîtront ou resteront minoritaires sous l'effet de la pression de sélection naturelle du milieu.

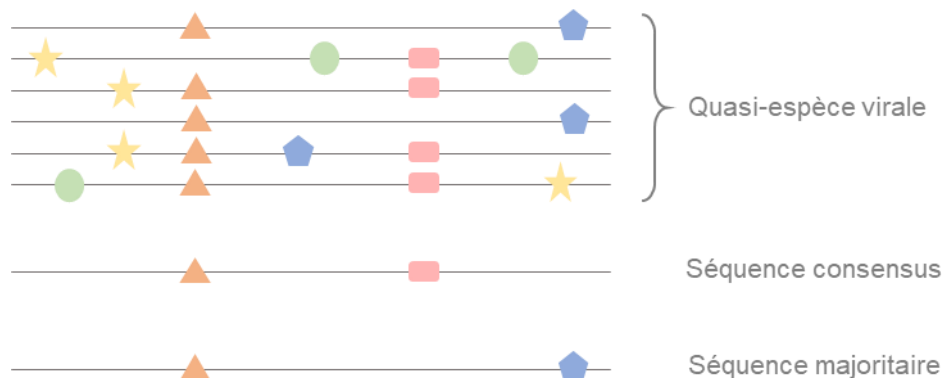


Figure 3. Schéma représentatif d'une quasi-espèce virale. Chaque ligne (n=6) correspond à la séquence d'un génome viral. Les formes géométriques placées sur les lignes représentent des mutations ponctuelles. Ensemble, les six lignes forment la quasi-espèce. La séquence consensus est la reconstitution artificielle des éléments les plus représentés (> 50%), elle n'est pas

forcément présente au sein de l'échantillon. La séquence majoritaire correspond à la séquence la plus fréquemment détectée parmi les virus séquencés (n=2).

1.1.2.2. La dérive génétique

Un autre paramètre important qui module la diversité des populations virales est la dérive génétique. Ce phénomène d'appauvrissement de la diversité génétique est le résultat du sous-échantillonnage d'une population. Lorsqu'une population subit une réduction drastique en taille et que seule une petite fraction de la diversité génétique initiale est transmise à la descendance, on parle alors de goulot d'étranglement génétique. Les épisodes de goulot d'étranglement génétique sont fréquents chez les virus (Zwart & Elena, 2015). Par exemple, lors de la transmission alternée entre hôtes vertébrés et invertébrés, seule une petite proportion de la population virale présente chez l'un des hôtes sera en mesure d'infecter l'autre hôte. L'alternance d'hôtes phylogénétiquement éloignés imposerait donc un compromis adaptatif où les variants porteurs de mutations bénéfiques pour un hôte et délétères pour l'autre sont éliminés. Les arbovirus seraient alors contraints à un champ d'exploration génétique limité afin d'assurer une répllication optimale au sein de deux systèmes métaboliquement et physiologiquement différents (Weaver, 2006). Toutefois, les effets de la dérive génétique sont contrebalancés par les propriétés réplificatives des virus ; après un goulot d'étranglement, de nouveaux variants sont générés, renouvelant ainsi la diversité génétique (Forrester, Coffey, & Weaver, 2014). Des goulots d'étranglement sont également présents au niveau intra-hôte, par exemple lors du franchissement des barrières anatomiques du vecteur (voir section 1.2.2) (Althouse & Hanley, 2015; Forrester et al., 2014).

1.1.2.3. Les transferts de séquences génétiques

Une autre source de diversité chez les virus est le transfert de séquences génétiques. La recombinaison est le mécanisme par lequel les virus d'une même espèce virale, en co-infectant une cellule, vont, par recombinaison homologue, échanger des morceaux de gènes. Un des meilleurs exemples de recombinaison observés dans la nature pour les arbovirus est celui du virus de l'encéphalite équine de l'Ouest (WEEV) qui est le produit d'une recombinaison génétique entre un virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV) et d'un virus similaire au virus Sindbis (SINV) (Weaver et al., 1997). D'autres exemples de recombinaison incluent le CHIKV

(Casal et al., 2015), le DENV (Perez-Ramirez, Diaz-Badillo, Camacho-Nuez, Cisneros, & Munoz Mde, 2009) et le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV) (Lukashev, 2005).

Le réassortiment est un second moyen pour les virus d'échanger des gènes. Ce mécanisme concerne les virus segmentés, qui durant la co-infection d'une cellule vont échanger des segments de génome et générer ainsi de nouvelles combinaisons génétiques (Vijaykrishna, Mukerji, & Smith, 2015). Particulièrement bien étudié pour les virus de la grippe, le réassortiment est possible entre tous les virus segmentés compatibles. Parmi les arbovirus, des réassortiments ont été décrits pour le virus de fièvre de la vallée du Rift (RVFV) (Sall et al., 1999) et le virus de la fièvre catarrhale ovine (BTV) (Nomikou et al., 2015).

Ensemble ces mécanismes moléculaires favorisent l'évolution et l'adaptation des arbovirus.

1.2. La transmission vectorielle d'arbovirus par le moustique

Les arbovirus sont transmis par une variété d'arthropodes vecteurs incluant des insectes tels que les moustiques, les phlébotomes, les culicoïdes et les simulies, mais aussi des arachnides comme les tiques. Les moustiques sont les principaux vecteurs d'arbovirus. Ils seront les seuls vecteurs considérés pour le reste de cette introduction.

1.2.1. Les cycles de transmission

Les arbovirus circulent essentiellement au sein de cycles selvatiques enzootiques impliquant des moustiques zoophages et des réservoirs animaux (principalement des oiseaux et des mammifères). La transmission à l'Homme se produit lorsque des moustiques anthropozoophages servent de vecteurs entre des animaux infectés et les humains. Deux cas de figure sont alors possibles :

- (1) L'Homme est un hôte accidentel ; il développe une virémie de courte durée et une faible charge virale ne permettant pas d'infecter de nouveaux vecteurs. L'hôte humain constitue alors un cul-sac épidémiologique pour le virus (cas de nombreux arbovirus tels que le virus du Nil occidental (WNV), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV), le WEEV, le EEEV, etc.).

(2) L'Homme devient hôte amplificateur ; il développe une virémie suffisamment élevée pour infecter de nouveaux vecteurs avec lesquels il entretient un cycle de transmission autonome. Dans ce dernier cas de figure, les virus circulent au sein de cycles épidémiques principalement urbains, impliquant l'Homme en tant qu'hôte amplificateur et des moustiques anthropophiles en tant que vecteurs (cas du DENV, du CHIKV, du YFV et du ZIKV) (Figure 4).

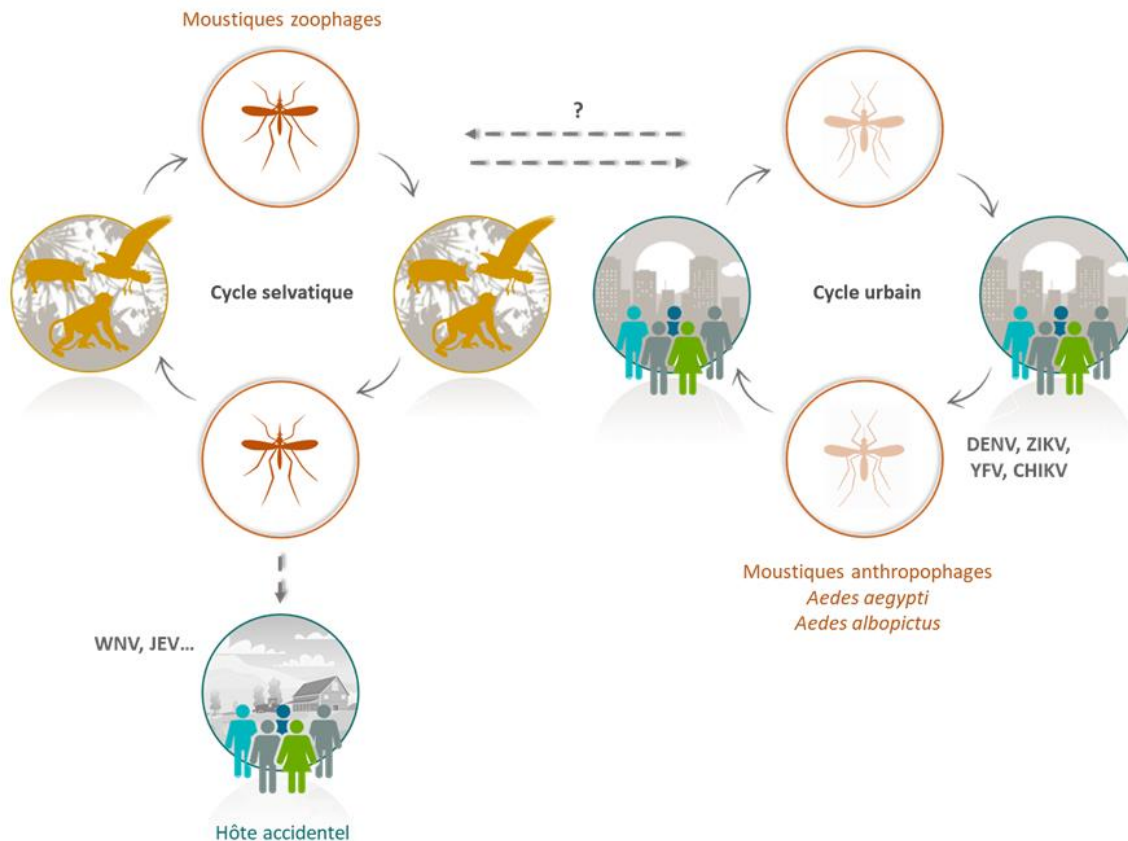


Figure 4. Cycles de transmission des arbovirus.

1.2.2. Développement des arbovirus et défenses antivirales chez le moustique

Le prélèvement de sang par la femelle est une étape essentielle du cycle de vie du moustique. Il apporte à la femelle de moustique les éléments nutritifs indispensables à la maturation de ses œufs (Yoeli & Mer, 1938). Ce trait comportemental est à l'origine de la circulation des arbovirus. Lors de la prise d'un repas sanguin sur un hôte en phase virémique, les moustiques

ingèrent avec le sang des particules virales. En pénétrant dans le tube digestif du moustique, les virus présents dans le bol alimentaire entrent en contact avec l'épithélium digestif. L'entrée par reconnaissance d'un récepteur membranaire suivie de la réplication du virus dans les cellules épithéliales du tube digestif constituent les premières étapes du développement du virus chez le moustique. Les virus néoformés franchissent la lame basale qui soutient l'épithélium digestif et sont libérés dans la cavité générale du moustique. À ce stade, le virus circule dans l'hémolymphe (fluide circulatoire chez les invertébrés, dont la fonction est analogue à celle du sang) et infecte différents organes et tissus périphériques. Il s'agit de l'étape de dissémination du virus. L'infection des organes reproducteurs peut donner lieu à des modes de transmission non vectorielle : de la femelle infectée à sa descendance (transmission verticale) ou du mâle infecté à la femelle lors de l'accouplement (transmission vénérienne). Bien qu'ayant une importance anecdotique, ces modes de transmission sont considérés comme un mécanisme de persistance des arbovirus dans la nature pendant les périodes non favorables à la transmission vectorielle (Agarwal, Parida, & Dash, 2017; Lequime & Lambrechts, 2014). L'infection des glandes salivaires puis la libération des particules virales dans la salive du moustique sont des étapes essentielles assurant la transmission vectorielle (ou horizontale) du virus par injection de salive infectieuse. En effet, au moment de la piqûre le moustique inocule à son hôte de la salive qui a pour fonction primaire de faciliter le glissement des pièces buccales, de limiter la coagulation du sang et d'anesthésier les tissus de l'hôte évitant ainsi toute réaction qui pourrait interrompre le repas sanguin. Néanmoins, il semblerait que le rôle de la salive dans la transmission virale soit beaucoup plus complexe ; des protéines présentes dans la salive du moustique faciliteraient l'infection de l'hôte en modulant la réponse immunitaire de ce dernier (Conway et al., 2014; Fong, Kini, & Ng, 2018; Sun et al., 2020). Différentes familles virales semblent être concernées par ce processus de facilitation de l'infection de l'hôte vertébré, avec des études portant sur des virus tels que le CHIKV (*Togaviridae*), le DENV, le ZIKV, le WNV (*Flaviviridae*) et le RVFV (*Phenuiviridae*) (Guerrero, Cantaert, & Misse, 2020). La virémie développée chez l'hôte vertébré suite à la piqûre du moustique infecté est déterminante pour l'infection de nouveaux vecteurs prenant un repas de sang sur cet hôte. En effet, le succès de l'infection du moustique dépend de la dose ingérée. Des seuils minimaux de dose infectieuse sont nécessaires pour l'infection du tube digestif, la dissémination et la transmission (Ledermann, Borland, & Powers, 2017; Tesla, Demakovsky, Packiam, et al., 2018; Vazeille et al., 2019). Le temps écoulé entre l'ingestion du repas infectieux et la présence de particules virales dans la salive, correspond à la période d'incubation extrinsèque (PIE) (Figure 5). Cette

période varie fortement en fonction du virus, du moustique et des conditions environnementales ; elle peut être de 2-3 jours pour des moustiques *Ae. aegypti* infectés par le CHIKV (Dubrulle, Mousson, Moutailler, Vazeille, & Failloux, 2009) et s'étendre jusqu'à 7-10 jours pour ce même vecteur infecté par le ZIKV (Roundy et al., 2017).

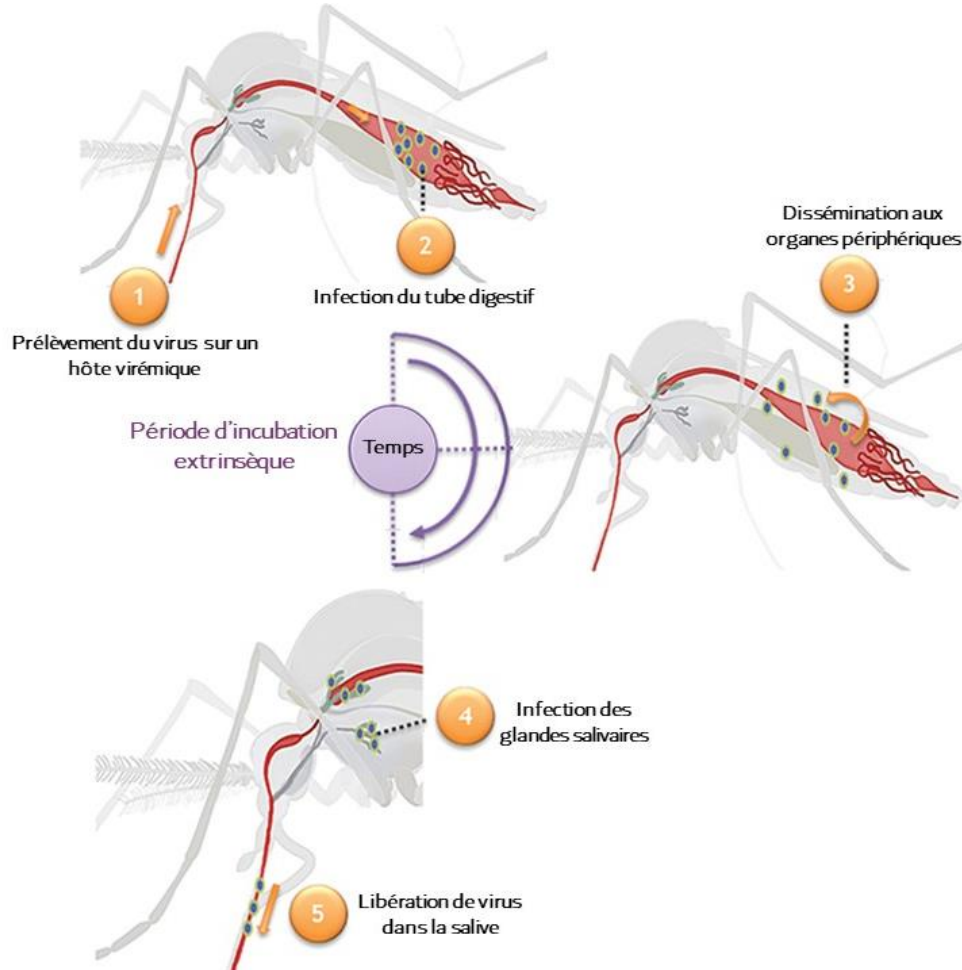


Figure 5. Les différentes étapes du développement des arbovirus chez le moustique. (Adaptée de (Thaís Chouin-Carneiro & dos Santos, 2017)).

Face à l'infection, les moustiques mettent en place des mécanismes de défense antiviraux qui permettent de limiter la réplication virale et assurent la survie du moustique. Contrairement aux mammifères, les moustiques ne possèdent pas de réponse immunitaire adaptative ; leurs défenses antivirales reposent entièrement sur la réponse immunitaire innée. Celle-ci s'organise autour de deux compartiments interconnectés : la réponse immunitaire cellulaire et la réponse immunitaire humorale. Ensemble, ces deux réactions immunitaires protègent les moustiques contre une variété d'agents pathogènes incluant les champignons, les bactéries, les parasites et les virus. La réponse cellulaire est réalisée par les hémocytes et englobe plusieurs mécanismes

distincts, comme la phagocytose, la mélanisation, l'encapsulation et la nodulation (Jiravanichpaisal, Lee, & Soderhall, 2006; Kumar et al., 2018; Lee, Webster, Madzokere, Stephenson, & Herrero, 2019). La réponse humorale correspond à l'activation de voies de signalisation menant à la synthèse et la sécrétion de molécules effectrices solubles telles que les peptides antimicrobiens (AMPs) et les dérivés réactifs de l'oxygène (en anglais : *Reactive Oxygen Species* ; ROS) (W. S. Lee et al., 2019). Les facteurs de la réponse humorale sont sécrétés dans l'hémolymphe par les hémocytes, les cellules épithéliales et le corps gras du moustique (Kumar et al., 2018). Parmi les principales voies de signalisation, on cite les voies : (i) Toll, (ii) JAK/STAT (pour *Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*) et (iii) Imd (pour *Immune Deficiency*) (Figure 6). Ces trois voies sont déclenchées par la reconnaissance des agents pathogènes au niveau des *Pattern Recognition Receptors* (PRRs). Il s'ensuit une activation en cascade de kinases/protéases qui conduit à la translocation au noyau de facteurs de transcription régulant l'expression d'effecteurs antimicrobiens (Barletta et al., 2017; Souza-Neto, Sim, & Dimopoulos, 2009; Xi, Ramirez, & Dimopoulos, 2008). L'implication des voies Toll et JAK/STAT dans la réponse antivirale du moustique a été démontrée pour le DENV et le WNV (Paradkar, Trinidad, Voysey, Duchemin, & Walker, 2012; Xi et al., 2008). Bien connue pour son activité antibactérienne, la voie Imd, semble limiter de manière indirecte la réplication du SINV par le biais du microbiote du moustique *Ae. aegypti* (Barletta et al., 2017). En parallèle, des mécanismes de suppression de ces voies de signalisation ont été décrits pour le DENV, le JEV, le virus de la forêt de Semliki (SFV) et le CHIKV (Fragkoudis et al., 2008; Lin et al., 2004; McFarlane et al., 2014; Sim & Dimopoulos, 2010). L'interférence par ARN (ARNi) est la défense antivirale la plus efficace actuellement décrite. Trois voies de l'ARNi ont été identifiées : la voie des siRNA (*small interfering RNA*), la voie des piRNA (*PIWI-interacting RNA*) et la voie des miRNA (*micro RNA*) (Blair, 2011) (Figure 7). La mise en place de la réponse ARNi repose principalement sur la reconnaissance et le clivage de molécules d'ARN double brin (ARNdb) en petits segments d'ARN de 20 à 30 nucléotides de long. Les virus à ARN, notamment les arbovirus, produisent des intermédiaires de réplication sous forme d'ARNdb (Son, Liang, & Lipton, 2015) qui induisent l'activation de l'ARNi. Dans la voie siRNA, l'ARNdb viral se lie à un complexe protéique impliquant une endoribonucléase appelée Dicer-2. L'ARNdb viral est clivé par Dicer-2 en petits segments de 21-23 nucléotides. Les petits ARN sont ensuite pris en charge par le complexe multiprotéique RISC (*RNA Induced Silencing Complex*), où un des deux brins d'ARN est sélectionné afin de servir de guide pour la détection spécifique des ARN viraux. La reconnaissance des ARN viraux

par appariement des bases entre l'ARN guide et l'ARN viral cible, conduit à la dégradation de l'ARN viral par l'endoribonucléase cellulaire Argonaute-2 (Ago2). La voie du siRNA joue un rôle majeur dans la réponse antivirale chez les arthropodes (Blair & Olson, 2015). Ce rôle a été démontré chez le moustique pour le DENV, le SINV et le virus O'nyong-nyong (ONNV) (Keene et al., 2004; Khoo, Piper, Sanchez-Vargas, Olson, & Franz, 2010; Sanchez-Vargas et al., 2009). Bien moins étudiée, la voie du piRNA présente plusieurs similitudes avec celle du siRNA. Toutefois, contrairement aux siRNAs, les piRNAs sont plus longs (24-30 nucléotides) et sont synthétisés indépendamment de l'activité de Dicer. Ils interagissent avec des membres de la famille des protéines Piwi (P-element induced wimpy testis, Piwi ; Aubergine, Aub ; et Argonaute 3, Ago3) au sein du piRISC (*piRNA-induced silencing complex*) (Siomi, Sato, Pezic, & Aravin, 2011). L'importance de la voie piRNA dans la défense antivirale a été mise en évidence pour le RVFV, le SFV, le CHIKV et SINV (Leger et al., 2013; Miesen, Girardi, & van Rij, 2015; Morazzani, Wiley, Murreddu, Adelman, & Myles, 2012; Schnettler et al., 2013). Contrairement aux si et piRNAs, les miRNAs ont une origine endogène à la cellule. Ce sont des petits ARN non codants (20-25 nt) qui jouent un rôle significatif dans la régulation post-transcriptionnelle des gènes de la cellule (Bartel, 2004). Les premières étapes de la voie des miRNAs font intervenir des effecteurs clés tels que la polymérase II et la ribonucléase Drosha localisées dans le noyau cellulaire. Dans le cytoplasme, les endoribonucléases Dicer-1 et Argonaute-1 (Ago1) prennent le relais, ce qui aboutit à la reconnaissance d'un ARNm par le complexe RISC. Il en résulte un blocage de la traduction ou une dégradation par clivage de l'ARNm cible. Les arbovirus ne semblent pas être en mesure de générer des miRNA. En effet, il a été suggéré que les virus ayant une répllication cytoplasmique n'auraient pas accès aux premières étapes de formation des miRNAs dans le noyau (W. S. Lee et al., 2019). Néanmoins, la modulation par des miRNAs de gènes impliqués dans divers processus métaboliques et notamment, dans l'immunité a été démontrée lors d'infections par le ZIKV (Saldana et al., 2017), le DENV (Etebari, Osei-Amo, Blomberg, & Asgari, 2015) et le WNV (Skalsky, Vanlandingham, Scholle, Higgs, & Cullen, 2010).

D'autres mécanismes en lien avec la réponse antivirale existent mais sont peu décrits chez le moustique (autophagie, apoptose, etc.) (Clem, 2016; Moy et al., 2014; Shelly, Lukinova, Bambina, Berman, & Cherry, 2009; H. Wang, Gort, Boyle, & Clem, 2012; J. Zhang et al., 2018). Des études démontrent notamment un rôle des ADN dérivés de virus dans la stimulation de la machinerie de l'ARNi et la tolérance du moustique au virus (Goic et al., 2016) (Figure 7).

Malgré l'existence chez le moustique de défenses antivirales efficaces, la réponse immunitaire déclenchée reste insuffisante pour éliminer complètement le virus. Un équilibre subtil entre réplication virale et réponse antivirale s'établit au sein du vecteur. Les moustiques développent des infections virales persistantes sans effets délétères majeurs, malgré des charges virales élevées, assurant ainsi une transmission à chaque nouvelle piqûre, et cela pour le reste de la vie du moustique. La contribution de chaque voie de la réponse antivirale serait plus ou moins importante selon le couple virus-vecteur. Les spécificités des réponses immunitaires déclenchées sont probablement un facteur clé déterminant l'aptitude d'un moustique à transmettre ou pas un virus donné.

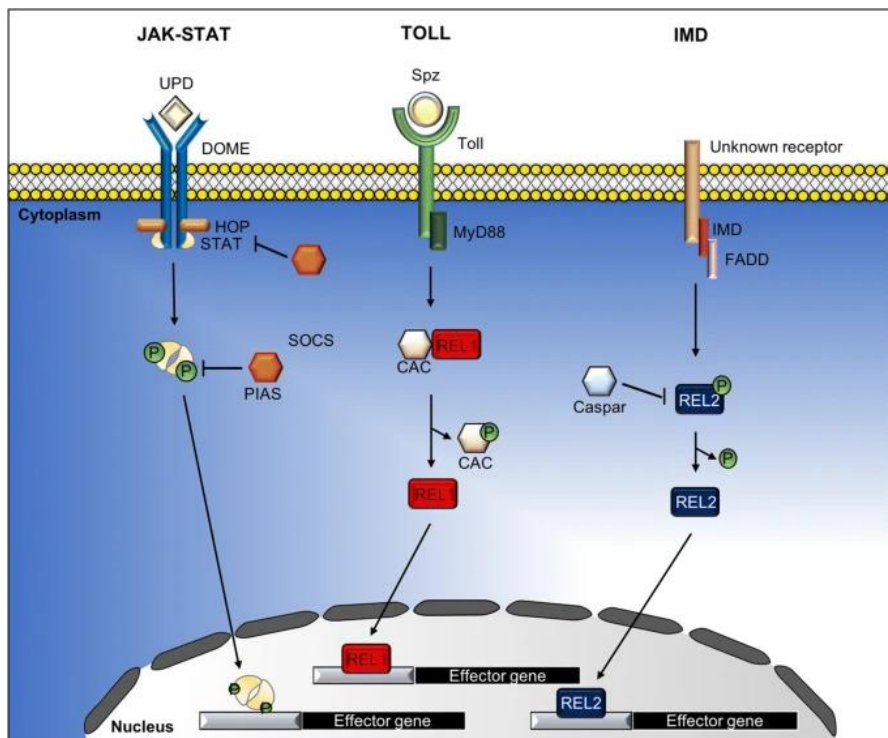


Figure 6. Schéma des voies de signalisation JAK/STAT, Toll et Imd (W. S. Lee et al., 2019).

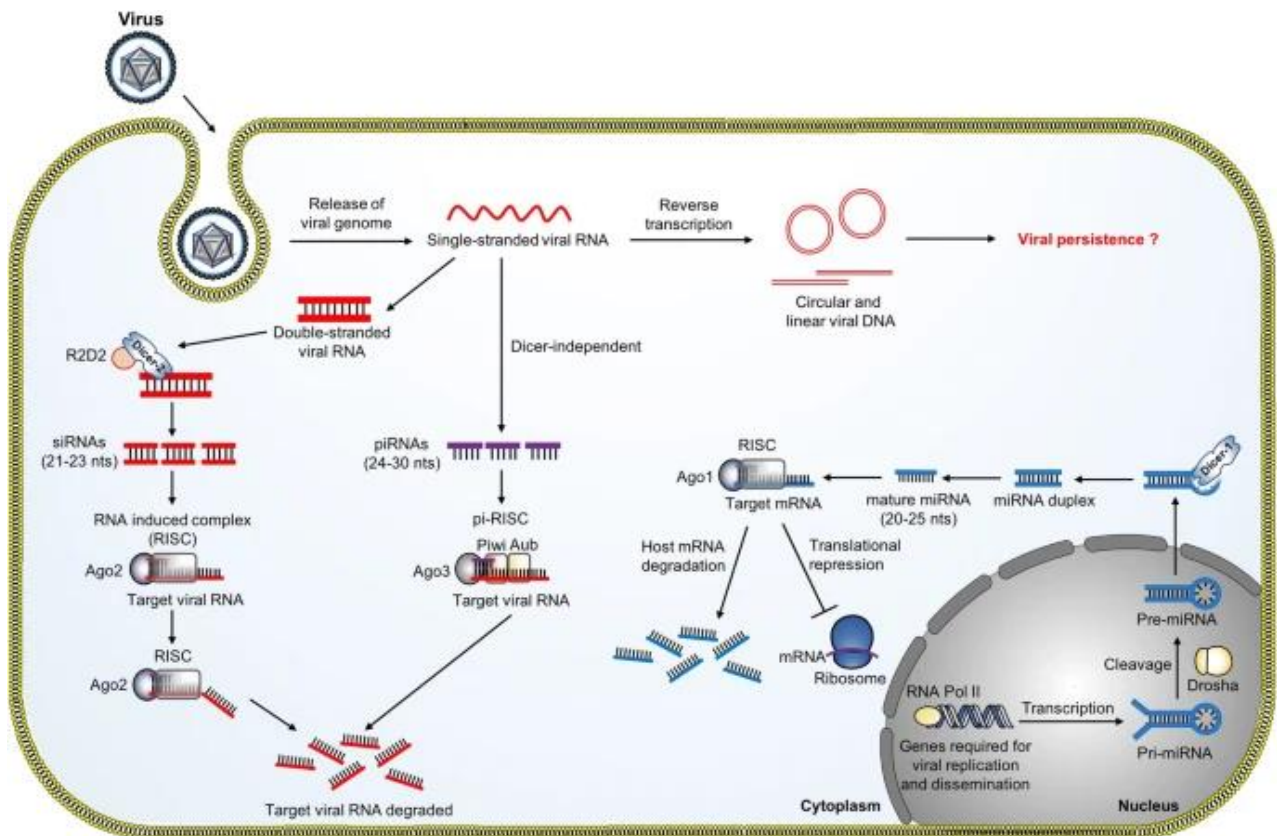


Figure 7. Schéma des voies de l'ARN interférant (ARNi) (W. S. Lee et al., 2019).

1.2.3. Compétence et capacité vectorielle

L'ensemble des facteurs déterminant l'aptitude spécifique d'un vecteur à transmettre un agent pathogène sont regroupés autour de deux concepts-clés de l'entomologie médicale : la compétence et la capacité vectorielle.

1.2.3.1. La compétence vectorielle

La compétence vectorielle se définit comme la faculté d'un vecteur à s'infecter après ingestion d'un repas de sang infectieux, puis à assurer le développement de l'agent pathogène avant de le transmettre à un nouvel hôte vertébré par piqûre (Hardy, Houk, Kramer, & Reeves, 1983). Typiquement, la compétence vectorielle mesure l'aptitude d'un agent pathogène à franchir les barrières anatomiques du vecteur. Chez le moustique, elle se divise en trois étapes : (i) l'infection du tube digestif, (ii) la dissémination de l'agent pathogène dans l'organisme et (iii) la transmission, correspondant à la présence de l'agent pathogène dans la salive. La compétence vectorielle est déterminée par l'association complexe de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

Premièrement, elle dépend de l'appariement spécifique des génotypes de l'hôte vecteur et de l'agent pathogène (Lambrechts et al., 2009). Ces interactions Génotype_{moustique} x Génotype_{virus} (GxG) contrôlent la réceptivité des vecteurs aux agents pathogènes. Tous les moustiques ne transmettent pas tous les virus. Un exemple notable de cette restriction d'hôte est celui des moustiques du genre *Anopheles*. Principalement connus pour la transmission du parasite responsable du paludisme, ces moustiques sont capables de transmettre le ONNV alors qu'ils sont réfractaires à une grande majorité des arbovirus d'importance médicale incluant le CHIKV qui est phylogénétiquement très proche du ONNV (Vanlandingham et al., 2005; Vanlandingham et al., 2006). Sans pour autant être réfractaires, les moustiques peuvent également présenter des différences de degré de sensibilité aux virus. Le moustique *Ae. albopictus* est plus réceptif à l'infection par le CHIKV qu'il ne l'est pour le DENV (Vazeille, Moutailler, Pages, Jarjaval, & Failloux, 2008). Le ZIKV est mieux transmis par *Ae. aegypti* que par *Ae. albopictus* (Ciota et al., 2017). Au-delà des associations qui existent entre les espèces de moustiques et de virus, des variations de compétences vectorielles à l'échelle des souches virales et des populations de moustiques sont fréquemment rapportées (Lambrechts, 2011; Souza-Neto, Powell, & Bonizzoni, 2019; Vega-Rua et al., 2020; Vega-Rua, Zouache, Girod, Failloux, & Lourenco-de-Oliveira, 2014). Ainsi, comme dans beaucoup d'autres systèmes hôtes/pathogènes, la spécificité de la compétence vectorielle chez le moustique tient compte du génotype du virus, du génotype du moustique et de leurs interactions (Fansiri et al., 2013; Lambrechts, 2011; Lambrechts et al., 2009) (Figure 8). Il s'agit d'un processus dynamique dans lequel les partenaires du système vectoriel sont en constante évolution. La compétence vectorielle peut donc elle aussi évoluer au cours du temps. Un des exemples les plus marquants, est celui de l'adaptation du CHIKV au moustique *Ae. albopictus* via la sélection d'un nouveau variant viral. La transmission exclusive du CHIKV par le moustique *Ae. albopictus* lors de l'épidémie de l'île de la Réunion en 2005-2006 a favorisé l'émergence d'un variant viral portant une substitution d'acides aminés (alanine par valine) à la position 226 de la glycoprotéine d'enveloppe E1 (Schuffenecker et al., 2006). Ce changement d'acides aminés a été responsable d'une augmentation significative de l'infectivité du CHIKV chez *Ae. albopictus* conduisant à une meilleure compétence vectorielle du moustique pour le virus (Tsetsarkin, Vanlandingham, McGee, & Higgs, 2007; Vazeille et al., 2007). Chez le moustique *Ae. aegypti*, la mutation n'a eu aucun effet significatif sur la compétence vectorielle, ce qui démontre la spécificité de la sélection du variant viral E1-226V (Tsetsarkin et al., 2007). Cet exemple témoigne de l'importance des interactions GxG dans la dynamique du processus de transmission vectorielle.

Les mécanismes génétiques sous-tendant les différences de réceptivité à l'infection des moustiques sont encore peu décrits. Des études ont suggéré que la sensibilité du moustique *Ae. aegypti* vis-à-vis du DENV serait sous le contrôle de deux QTL (*quantitative trait loci* ou en français, loci de caractères quantitatifs) localisés sur les chromosomes II et III (Bosio, Fulton, Salasek, Beaty, & Black, 2000; Fansiri et al., 2013). De façon plus précise, il a été démontré que la spécificité de la réceptivité au DENV serait associée au gène antiviral Dicer-2 du moustique *Ae. aegypti*. Ces résultats suggèrent que les spécificités de compatibilité hôte-pathogène seraient en partie sous l'influence d'interactions entre les gènes de l'immunité du moustique et le génome viral (Lambrechts et al., 2013). Bien moins étudiées, les séquences virales intégrées dans les génomes des moustiques (les NIRVS ; *non-retroviral integrated RNA virus sequences*), pourraient aussi être impliquées dans la modulation de la compétence vectorielle (Houe, Bonizzoni, & Failloux, 2019).

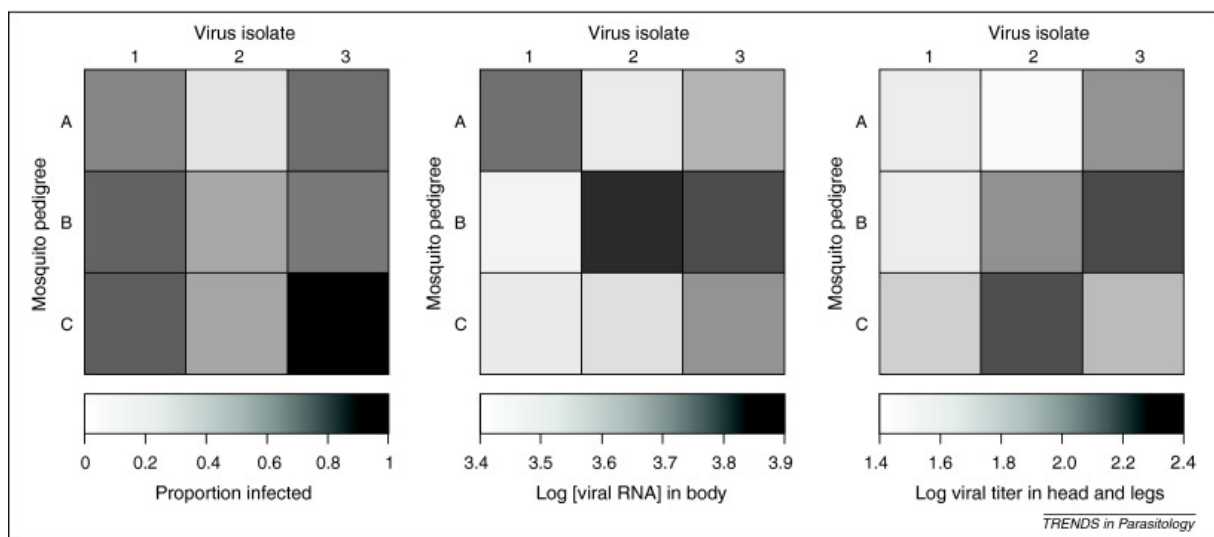


Figure 8. Interactions génotype x génotype entre le DENV et le moustique *Aedes aegypti*. Les matrices représentent les mesures expérimentales de trois indices de compétence vectorielle pour chacune des combinaisons entre trois isolats du DENV et trois lignées du moustique *Ae. aegypti*. Les valeurs phénotypiques sont converties en nuances de gris selon la barre d'échelle indiquée en-dessous. Chaque indice de compétence vectorielle dépend de manière significative de la combinaison spécifique du génotype du moustique et de l'isolat viral (Lambrechts, 2011).

La compétence vectorielle est également influencée par la flore microbienne du moustique. Ces micro-organismes influencent de nombreuses fonctions biologiques de leur hôte telles que le développement, la nutrition, la reproduction et l'immunité (Heu & Gendrin, 2018; Strand, 2018). La modulation de la réplication virale par le microbiote se fait *via* divers mécanismes,

incluant la régulation de l'immunité, la compétition pour les ressources nutritives ou encore la production de facteurs antiviraux (Dennison, Jupatanakul, & Dimopoulos, 2014). Les exemples les plus connus concernent les bactéries et notamment, les bactéries *Wolbachia spp.* dont l'effet sur la transmission des arbovirus par *Ae. aegypti*, a permis la mise en place de programmes alternatifs de lutte contre les arboviroses (Anders et al., 2018; Hoffmann et al., 2014; Nazni et al., 2019; O'Neill, 2018). *Ae. aegypti* est naturellement dépourvue de *Wolbachia*. La production de lignées stables d'*Ae. aegypti* transfectées par des *Wolbachia* issues de la drosophile a montré qu'en présence de la bactérie, la durée de vie du moustique diminue (McMeniman et al., 2009) et la transmission d'arbovirus tels que le ZIKV, le DENV et le CHIKV est inhibée (Bian, Xu, Lu, Xie, & Xi, 2010; Dutra et al., 2016; Moreira et al., 2009). Récemment découverts, les virus spécifiques d'insectes pourraient également affecter la transmission des arbovirus (Goenaga, Goenaga, Boaglio, Enria, & Levis, 2020; Vasilakis & Tesh, 2015).

Enfin, la compétence vectorielle varie en fonction de facteurs extrinsèques tels que la dose infectieuse ingérée par le moustique (Nguyet et al., 2013; Tesla, Demakovsky, Packiam, et al., 2018), la nutrition du moustique (Vaidyanathan, Fleisher, Minnick, Simmons, & Scott, 2008) et les conditions environnementales (pluviométrie, humidité, température, etc.). En tant qu'organismes ectothermes poïkilothermes, les moustiques sont très sensibles aux variations de température du milieu ambiant. La température peut non seulement agir sur la physiologie et le comportement du moustique mais aussi sur la transmission des agents pathogènes qu'ils véhiculent (Reinhold, Lazzari, & Lahondere, 2018). Il est communément admis que l'augmentation de la température conduit à la diminution de la période d'incubation extrinsèque et à l'augmentation de la compétence vectorielle. Toutefois, il semblerait que l'effet de la température sur la compétence vectorielle soit bien plus complexe. Des expériences menées au laboratoire ont mis en évidence l'existence d'interactions tripartites entre le génotype du moustique, celui du virus et la température (interactions G x G x Environnement) (Zouache et al., 2014). Dans cette expérience, l'effet de la température sur l'efficacité de transmission du CHIKV varie en fonction des combinaisons de souches virales et de populations d'*Ae. albopictus*. L'efficacité de transmission est favorisée à 20 °C pour certaines combinaisons alors que pour d'autres, on observe une meilleure transmission à 28 °C ou encore pas de différence entre les deux températures (Figure 9). Ces résultats démontrent que la température peut profondément modifier les propriétés des interactions G x G et influencer la transmission virale. Les effets de la température sur la transmission des arbovirus sont revus en détail dans la section 4.2 du chapitre 4 de cette synthèse bibliographique.

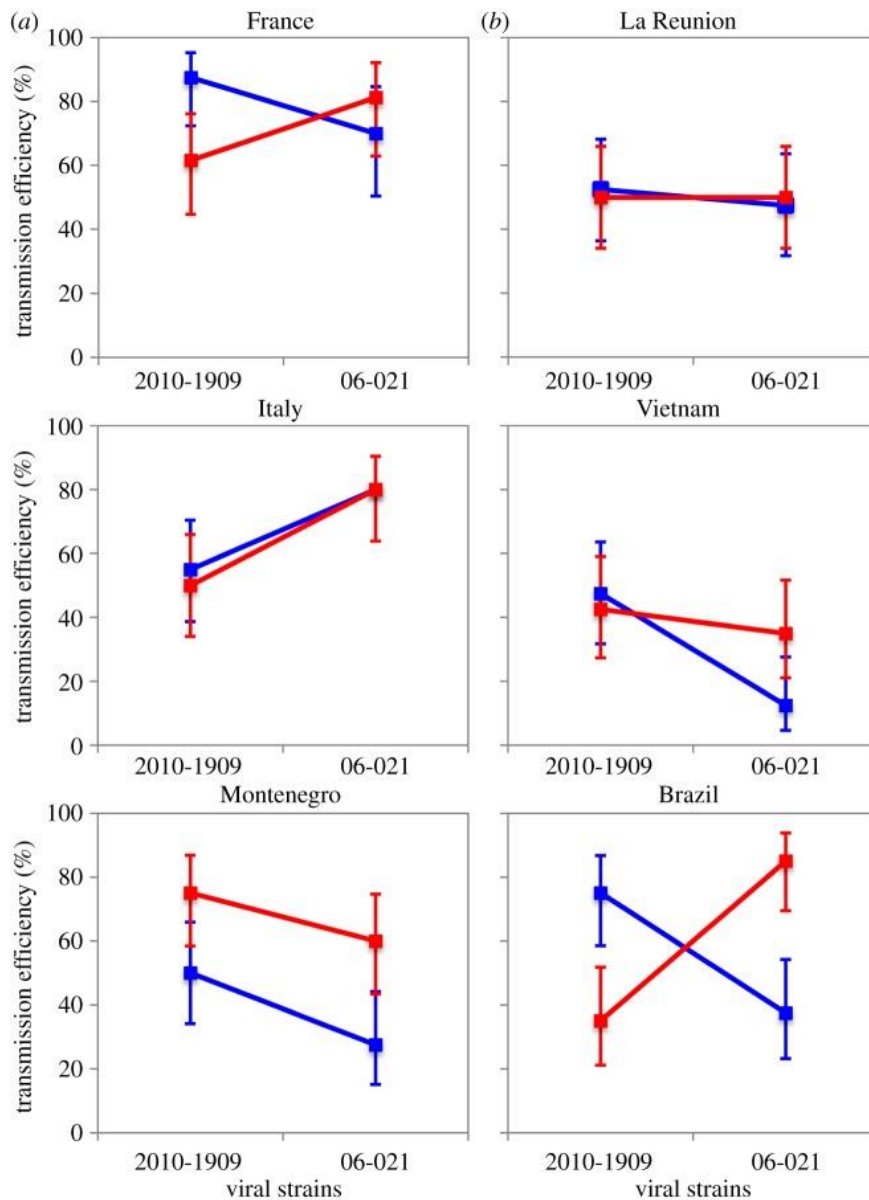


Figure 9. Effet de la population de moustiques, de la souche virale et de la température sur l'efficacité de transmission. L'efficacité de transmission (%) correspond à la proportion de femelles ayant une salive infectieuse au 6^e jour post-infection. Les panneaux représentent les différentes populations d'*Ae. albopictus* issus de régions (a) tempérées ou (b) tropicales. Dans chaque panneau, l'efficacité de transmission (moyenne de deux expériences) est déterminée pour deux souches virales du CHIKV (indiquées sur l'axe des abscisses) et deux régimes de température (ligne bleue : 20 °C ; ligne rouge : 28 °C). Les intervalles de confiance sont représentés par les barres verticales (Zouache et al., 2014).

1.2.3.2. La capacité vectorielle

La capacité vectorielle est une mesure épidémiologique qui exprime l'efficacité avec laquelle une population vectrice transmet un agent pathogène en conditions naturelles. Elle dépend de facteurs liés au vecteur, à l'agent pathogène et à l'environnement : densité, survie et préférences trophiques du vecteur, fréquence des repas sanguins, compétence vectorielle, disponibilité de l'hôte vertébré, température, pluviosité, etc. (Figure 10). La modélisation mathématique permettant d'évaluer la capacité vectorielle peut être formulée de la façon suivante (D. Fontenille & Powell, 2020) :

$$\text{Capacité Vectorielle} = \left(ma^2 \times p^n / -\ln p \right) \times bc \times 1/r$$

avec :

m : densité de vecteurs par rapport à l'hôte vertébré

a : probabilité journalière de piqûre de l'hôte par un vecteur (par jour)

p : probabilité journalière de survie du vecteur (par jour)

n : période d'incubation intrinsèque (en jours)

b : potentiel de transmission du moustique à l'hôte vertébré (infectiosité du vecteur)

c : réceptivité de l'hôte au virus (immunité, âge, santé, etc.)

1/r : période durant laquelle la virémie de l'hôte est suffisamment élevée pour infecter de nouveaux vecteurs

La capacité vectorielle constitue un indicateur du risque épidémique et est essentielle à la caractérisation de la dynamique d'un système vectoriel. Une bonne capacité vectorielle requiert la présence d'un vecteur abondant avec une compétence vectorielle élevée, une forte longévité et un contact fréquent avec des hôtes vertébrés sensibles à l'infection. Les différents paramètres qui composent la capacité vectorielle peuvent se compenser entre eux. Ainsi, une faible capacité vectorielle peut par exemple être contrebalancée par une forte abondance du vecteur. Des études de compétence vectorielle ont montré que des moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* provenant du continent américain et de la Caraïbe étaient, de façon surprenante, des vecteurs peu compétents du ZIKV. Les auteurs suggèrent que l'épidémie de 2016 du ZIKV en Amérique

aurait alors été favorisée par l'abondance élevée des moustiques (très anthropophiles) et la forte densité de population naïve au virus (T. Chouin-Carneiro et al., 2016).

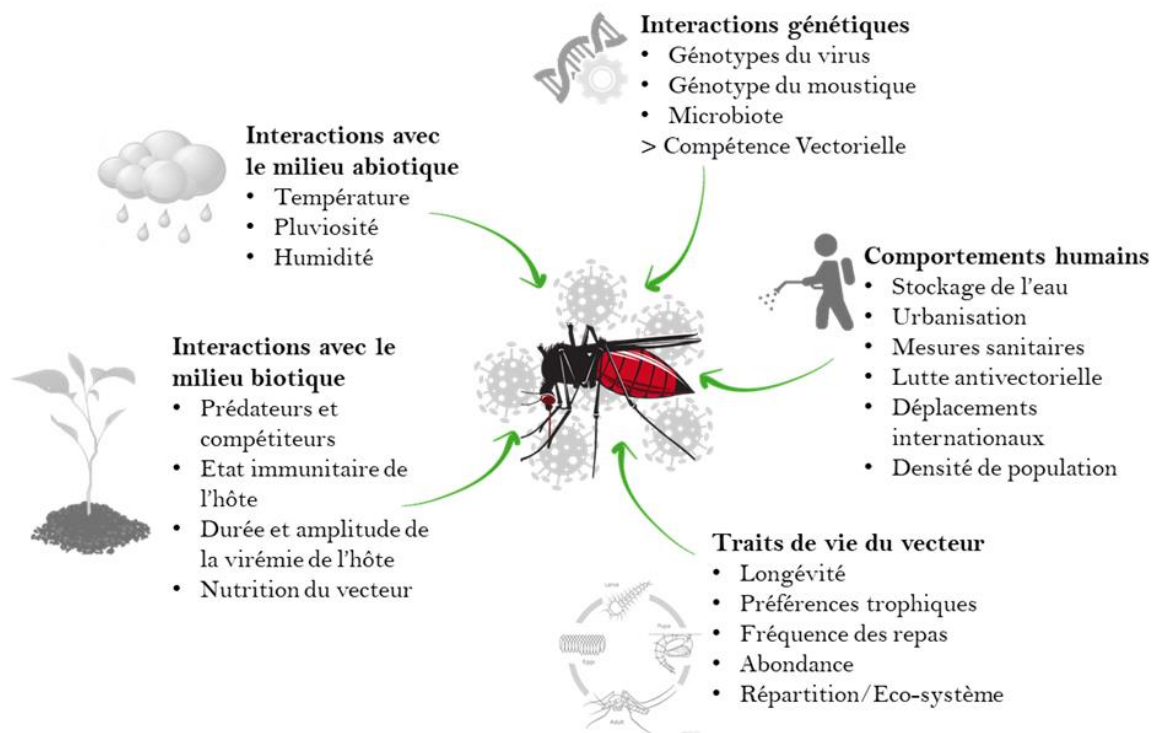


Figure 10. Les facteurs influençant la compétence vectorielle et la capacité vectorielle.

1.3. Les arbovirus transmis par les moustiques en Europe

Entre le XVIII^e siècle et le début du XX^e siècle, le continent européen a été confronté à des épidémies redoutables de dengue et de fièvre jaune (causées respectivement par le DENV et le YFV). Les zones portuaires, accueillant des bateaux en provenance de zones d'endémie, sont particulièrement touchées, avec des épisodes épidémiques causant des milliers de décès (Schaffner & Mathis, 2014). Seules les dernières épidémies de fièvre jaune les plus mortelles sont bien décrites, on peut notamment citer celles de Cadix et Séville (1800), de Barcelone et Marseille (1821), de Lisbonne (1857), de Livourne (1804) et de Gibraltar (1800/1828) (Barbieri & Drancourt, 2018; Morillon, Mafart, & Matton, 2002). Les dernières grandes épidémies de dengue en Europe surviennent en Grèce, à Athènes en 1927 et 1928. Elles furent d'une intensité exceptionnelle avec des chiffres approximatifs d'un million de cas et plus d'un millier de morts (Rosen, 1986). Ces épidémies n'entraînèrent pas de foyer endémique secondaire et aucune autre épidémie de dengue ou de fièvre jaune ne fut signalée les années suivantes en Europe.

De nos jours, des arbovirus comme le WNV, le virus Usutu (USUV) et le SINV circulent de façon endémique en Europe (Figure 11). Le WNV est maintenu au sein de cycles de transmission enzootique entre différentes espèces d'oiseaux (aussi bien migratrices que résidentes comme par exemple les passereaux et les foudres) et des moustiques du genre *Culex* (Calistri et al., 2010). L'infection chez l'Homme est accidentelle et cause dans moins de 1% des cas des atteintes neurologiques potentiellement mortelles. Les premières épidémies d'encéphalite liées au WNV en Europe furent détectées en France dans les années 1960 (H. G. Zeller & Schuffenecker, 2004). Aujourd'hui, le WNV représente une réelle préoccupation pour les autorités sanitaires. En 2018, le centre européen de prévention et de contrôle des maladies (*European Center for Disease Prevention and Control* ; ECDC) recensait pas moins de 2 083 infections humaines au WNV dont environ 180 décès. Ces chiffres dépassaient de loin le nombre cumulé de cas des sept années précédentes, soit 1 832 cas d'infection (ECDC, 2018). Le USUV est un *Flavivirus* génétiquement très proche du WNV. Il possède un cycle de transmission similaire à celui du WNV, impliquant les mêmes hôtes amplificateurs et vecteurs (Nikolay, 2015). Le USUV est très rarement pathogène pour l'Homme, ce qui rend sa détection relativement difficile. Seuls 22 cas d'infections neuroinvasives ont été décrits en Europe (Zannoli & Sambri, 2019). Néanmoins, des études de séroprévalence indiquent que la prévalence du USUV chez l'Homme serait supérieure à celle du WNV dans des zones où les deux virus co-circulent (Barzon, 2018). Le SINV est un *Alphavirus* transmis entre différentes espèces d'oiseaux par les moustiques des genres *Culex* et *Culiseta*. L'Homme est un hôte accidentel du cycle de transmission du SINV. Il développe peu ou pas de symptômes. Les cas de maladies liés à l'infection, incluant des arthralgies et des myalgies, sont rapportés périodiquement dans le nord de l'Europe (Suède, Finlande, Allemagne...) (Adouchief, Smura, Sane, Vapalahti, & Kurkela, 2016).

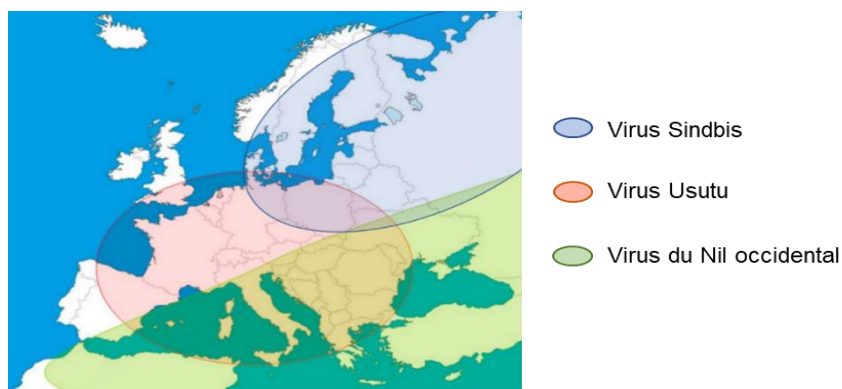


Figure 11. Répartition géographique du WNV, du USUV et du SINV en Europe (Adaptée de (Barzon, 2018; Zannoli & Sambri, 2019)).

D'autres arbovirus transmis par des arthropodes vecteurs autres que les moustiques sont endémiques en Europe. On peut citer le virus de l'encéphalite à tique (TBEV) et le CCHFV transmis par les tiques et le virus Toscana (TOSV) transmis par les phlébotomes.

L'introduction de nouvelles maladies vectorielles est une menace majeure pour l'Europe (Suk & Semenza, 2011). Le retour de voyageurs virémiques en provenance de zones endémiques permet l'introduction et la transmission locale d'arbovirus dans les zones où des vecteurs compétents sont présents. La mise en place de programmes de surveillance entomologique et épidémiologique des cas vétérinaires et humains (déclaration obligatoire des cas confirmés et suspectés) permet d'évaluer les risques de transmission et d'activer lorsque nécessaires, les mesures de prévention et de contrôle appropriées. En 2019, un total de 737 cas importés du DENV, du CHIKV et du ZIKV (confirmés) a été détecté en France hexagonale par les services de santé (Figure 12).

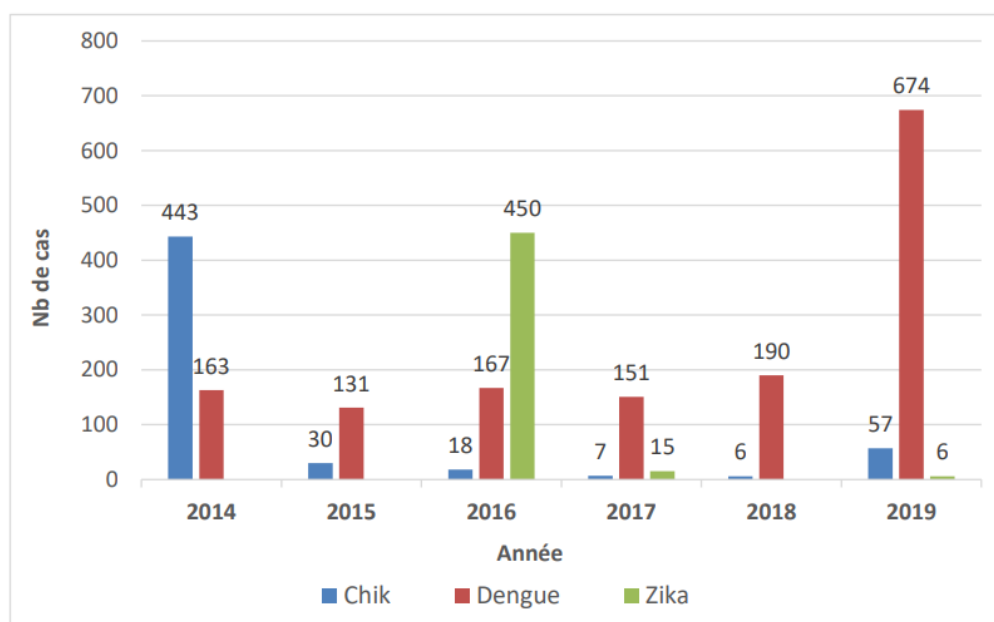


Figure 12. Nombre de cas importés confirmés de dengue, chikungunya et Zika par année (du 1^{er} mai au 30 novembre) en France hexagonale (d'après Marie-Claire Paty ; Santé publique France)

Malgré ces efforts, plusieurs cas de transmission autochtone de DENV, de ZIKV et de CHIKV ont été rapportés en Italie, en France, en Croatie et en Espagne où le moustique vecteur *Ae. albopictus* est établi et en constante expansion (Figure 13). Le CHIKV fût le premier arbovirus transmis par *Ae. albopictus* à être détecté en Europe. En 2007, environ 330 cas probables et confirmés sont identifiés dans la région d'Emilie-Romagne en Italie (Rezza et al., 2007). Par la

suite, de nouveaux cas autochtones de CHIKV sont signalés en 2010 (2 cas) et en 2014 (12 cas) en France puis à nouveau en 2017 en France (17 cas) et en Italie (270 cas confirmés et 229 probables) (ECDC, 2020b) (Figure 13). En septembre 2010, deux cas autochtones de DENV sont diagnostiqués à Nice en France (La Ruche et al., 2010). Ces cas de dengue sont les premiers en Europe depuis la sévère épidémie en Grèce à la fin des années 1920. La même année, deux cas de dengue sont également rapportés en Croatie (Gjenero-Margan et al., 2011). Entre 2013-2015 et 2018-2020, des épisodes de transmission locale d'ampleur limitée se succèdent en France, en Espagne et en Italie (Figure 13). À l'heure actuelle, on compte au total 62 cas de transmission locale du DENV en Europe depuis 2010 (ECDC, 2020c). En 2019, les autorités sanitaires françaises déclarent trois cas de transmission autochtone du ZIKV dans le département du Var. Ces cas furent les premiers et jusqu'à présent les seuls cas de ZIKV signalés en Europe (ECDC, 2019).

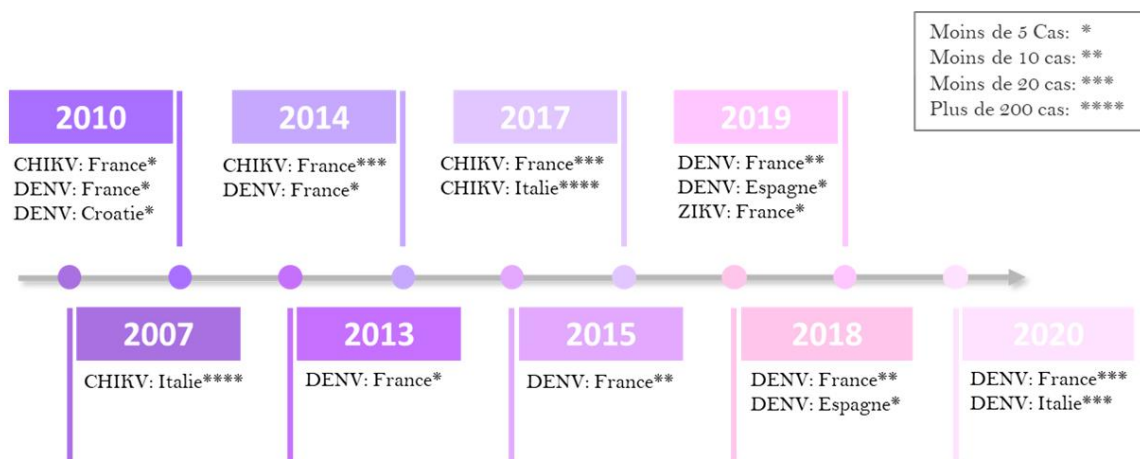


Figure 13. Chronologie des cas autochtones du CHIKV, du DENV et du ZIKV en Europe.

Chapitre 2

Le virus du chikungunya



Le nom chikungunya provient de la langue bantoue, le makondé parlé en Tanzanie et au Mozambique. Il signifie « marcher courbé », en référence à l'apparence voûtée des patients atteints de la maladie du chikungunya souffrant d'arthralgies.

Ce chapitre est une synthèse des connaissances actuelles sur le CHIKV et la maladie du même nom qu'il induit. Il se divise en six sections à travers lesquelles nous aborderons des notions purement fondamentales de la biologie du virus ainsi que les aspects cliniques et épidémiologiques de la maladie.

2. Chapitre 2 : Le virus du chikungunya

2.1. Classification virale

Le CHIKV est un virus du groupe IV de la classification de Baltimore (ARN monocaténaire de polarité positive). Il appartient à la famille des *Togaviridae* dont l'unique genre est celui des *Alphavirus* qui comprend actuellement 31 espèces virales (Rubing Chen, 2018). Avant avril 2019, la famille des *Togaviridae* incluait également le genre *Rubivirus* (virus de la rubéole) qui a été depuis déplacé au sein de la famille des *Matonaviridae*. Les *Alphavirus* sont principalement des arbovirus transmis en majeure partie par les moustiques (Lim, Lee, Madzokere, & Herrero, 2018). Ils infectent une variété d'hôtes vertébrés incluant les humains, les primates non humains, les équidés, les oiseaux, les marsupiaux, mais aussi des mammifères marins et des poissons. À l'origine, les *Alphavirus* étaient regroupés selon leurs proximités antigéniques au sein de 7 complexes antigéniques (Rubing Chen, 2018) (Figure 14). Dans ce mode de classification, le CHIKV appartient au complexe de la forêt de Semliki avec des virus comme le ONNV, le virus Mayaro (MAYV) et le SFV. Aujourd'hui, les données de similarité de séquences des protéines d'enveloppe montrent qu'il existe trois clades majeurs au sein du genre *Alphavirus* (Rubing Chen, 2018) (Figure 14). Le premier clade, inclut le complexe de l'encéphalite équine vénézuélienne et le complexe de l'encéphalite équine de l'est. Dans le second clade majeur, divergent le virus Trocara (TROV), le virus Eilat (EILV) et le complexe de l'encéphalite équine de l'ouest. Enfin, le troisième clade regroupe le virus de la forêt de Barmah (BFV), le virus de la maladie du pancréas du saumon (SPDV), le virus de l'éléphant de mer du sud (SESV), le virus Ndumu (NDUV) et le complexe de la forêt de Semliki (Rubing Chen, 2018) (Figure 14). Chez l'Homme, les infections symptomatiques par des *Alphavirus* peuvent entraîner soit des encéphalites sévères potentiellement mortelles soit des arthralgies débilitantes et souvent chroniques.

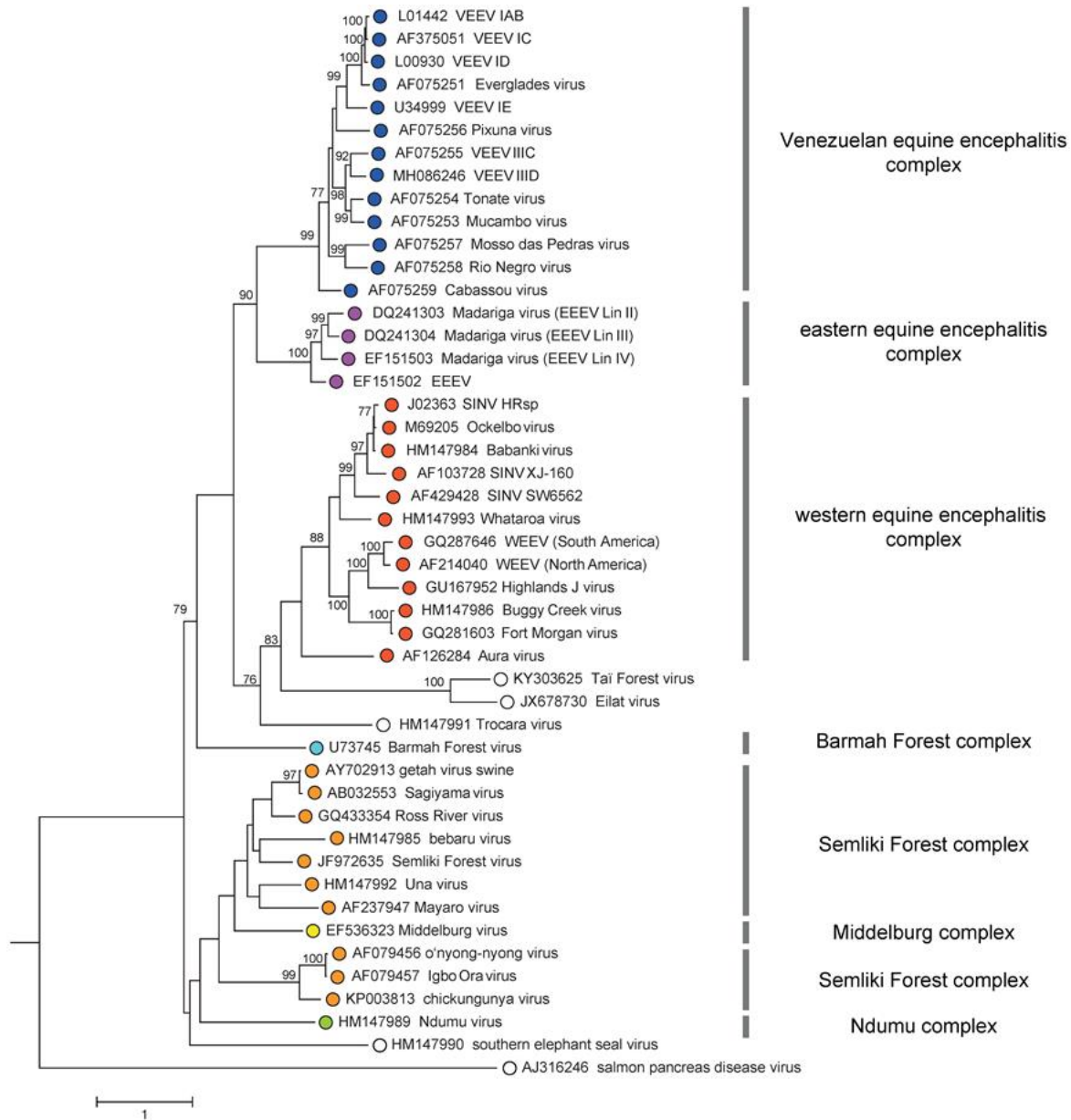


Figure 14. Arbre phylogénétique d'isolats représentant toutes les espèces du genre *Alphavirus*. L'arbre a été généré à partir des séquences des régions conservées des protéines d'enveloppe. Les pastilles colorées indiquent les 7 complexes antigéniques. Les pastilles blanches correspondent aux virus non classifiés au sein d'un complexe antigénique (Rubing Chen, 2018).

2.2. Morphologie virale et organisation génomique

Les virions du CHIKV sont de petites particules sphériques d'environ 70 nm de diamètre. Ils sont formés d'une enveloppe (bicouche lipidique provenant de la membrane cellulaire) dans laquelle sont enchâssés des spicules glycoprotéiques (formées de 3 hétérodimères des

glycoprotéines E1 et E2) et d'une capsidie icosaédrique qui renferme le génome viral (Cheng et al., 1995) (Figure 15). Le patrimoine génétique du virus est porté par un ARN simple brin de polarité positive d'environ 11 800 nucléotides (A. H. Khan et al., 2002). L'ARN génomique possède une coiffe méthylée à l'extrémité 5' et une queue poly-A à l'extrémité 3' (Ahola & Kaariainen, 1995; A. H. Khan et al., 2002). Il est composé de deux cadres de lecture ouverts (ORF ; *Open Reading Frame*) séparés par une jonction non codante. Le cadre de lecture ouvert placé du côté 5' code pour 4 protéines non structurales (nsp1, nsp2, nsp3 et nsp4) indispensables à la réplication du génome viral (Tableau 1). En position 3', le second cadre de lecture ouvert est à l'origine d'un ARN messager subgénomique (ARNsg) codant les protéines structurales du virus (la protéine de capsidie, E3, E2, 6K, TF et E1) (Solignat, Gay, Higgs, Briant, & Devaux, 2009) (Figure 16 et Tableau 1). De plus, les extrémités 5' et 3' présentent des régions non traduites qui entourent les deux cadres de lecture ouverts. Ces régions mesurent 76 et 526 nucléotides de long en 5' et 3', respectivement (Solignat et al., 2009). Des éléments de séquences répétées ont été identifiés dans la région 3' non codante et des structures secondaires dans la région 5' non codante (A. H. Khan et al., 2002).

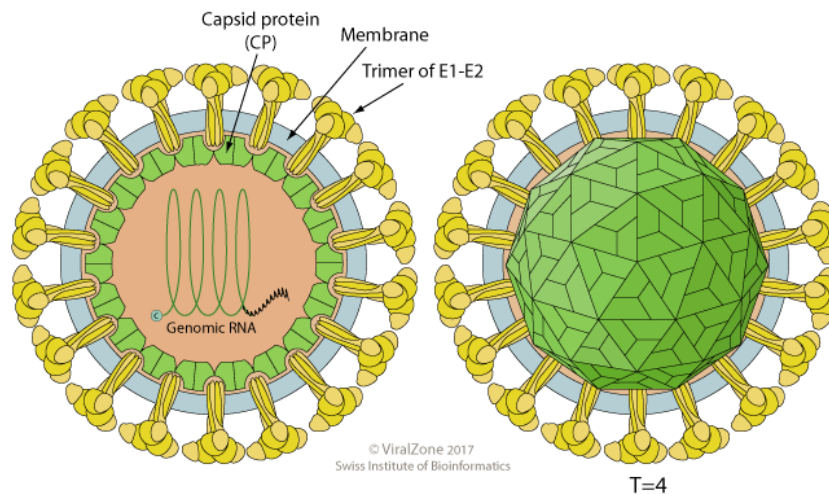


Figure 15. Représentation schématique de l'organisation structurale du CHIKV (ViralZone).

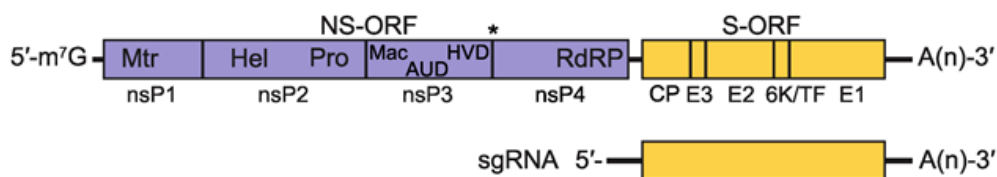


Figure 16. Représentation schématique de l'organisation génomique du CHIKV. Les régions non codantes sont représentées par des lignes noires et les cadres de lecture ouverts (ORF) par des rectangles colorés. Le rectangle violet indique le cadre de lecture des protéines non

structurales (NS-ORF) et le rectangle jaune schématise celui des protéines structurales (S-ORF). Dans chaque ORF, les séquences codant pour chacune des protéines sont délimitées par des traits verticaux. L'astérisque entre les séquences nsp3 et nsp4 indique la présence d'un codon-stop dont la lecture au travers permet la régulation de la traduction de la protéine nsp4. De plus, dans le NS-ORF, figure l'emplacement de motifs associés aux activités suivantes : (Mtr) méthyltransférase, (Hel) hélicase, (Pro) protéase, (Mac) macro domaine, (AUD) domaine unique aux alphavirus, (HVD) domaine hypervariable et (RdRP) ARN polymérase ARN-dépendante. La région concernée par l'ARN messenger subgénomique (sgRNA) est également présentée (Rubing Chen, 2018).

Tableau 1. Les fonctions des protéines du CHIKV (adapté de (Silva & Dermody, 2017)).

Protéine	Taille (acides aminés)	Fonction
Protéines non structurales		
nsp1	535	Activités méthyltransférase et guanylyltransférase pour l'ajout de coiffe aux ARN viraux ; ancrage membranaire pour le complexe réplique
nsp2	798	NTPase, hélicase, protéase et activités ARN triphosphatase
nsp3	530	Phosphoprotéine dont les fonctions sont inconnues, mais sembleraient être importantes pour la synthèse de l'ARN (-)
nsp4	611	ARN polymérase ARN-dépendante
Protéines structurales		
Capside	261	Protéine formant la nucléocapside ; possède une activité autocatalytique sérine protéase
pE2	487	Précurseur composé de E3 et E2 ; clivé par la protéase cellulaire la furine
E3	64	Le domaine N-terminal restant lié à E2 pourrait aider à bloquer le peptide de fusion de E1 pendant la sortie du virus
E2	423	Se lie aux récepteurs et aux facteurs d'attachement
6K	61	Formerait des canaux ioniques et pourrait favoriser la libération des particules virales
TF	76	Formerait des canaux ioniques et pourrait favoriser la libération des particules virales
E1	439	Protéine de fusion de type II responsable de la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane cellulaire

2.3. Cycle de réplication du virus du chikungunya

Le cycle de réplication du CHIKV est encore largement méconnu. Plusieurs des mécanismes de réplication du virus n'ont jamais été étudiés et sont donc extrapolés à partir des connaissances des cycles d'autres *Alphavirus*. Le CHIKV possède un large tropisme cellulaire permettant l'infection d'une grande variété de cellules de vertébrés et d'invertébrés pour lesquelles aucun récepteur n'a encore été identifié. Plusieurs facteurs d'attachement cellulaire du CHIKV tels que les glycosaminoglycanes, les lectines, les prohibitines et plus récemment, la molécule d'adhésion cellulaire Mxra8 ont été décrits (Prado Acosta et al., 2019; Schnierle, 2019; Weber et al., 2017; Wintachai et al., 2012; R. Zhang et al., 2018). Toutefois, aucun de ces facteurs n'est indispensable à l'entrée du virus dans la cellule, ce qui suggère l'utilisation par le virus de multiples voies d'entrée cellulaire. Un facteur d'attachement a également été identifié dans des cellules de moustique, il s'agit de la sous-unité β de l'ATP synthétase (Fongsaran et al., 2014). Du côté du virus, la reconnaissance du/des récepteur(s) cellulaire(s) est médiée par la glycoprotéine de surface E2. Après attachement à la cellule cible, les particules virales liées au récepteur sont généralement internalisées par endocytose clathrine-dépendante (Bernard et al., 2010; van Duijl-Richter, Hoornweg, Rodenhuis-Zybert, & Smit, 2015). L'acidification des endosomes entraîne des changements conformationnels des glycoprotéines de surface, menant à l'exposition et l'insertion dans la membrane endosomale du peptide de fusion de la glycoprotéine E1. La fusion de l'enveloppe virale avec la membrane endosomale permet la libération de la capsid virale dans le cytoplasme (van Duijl-Richter et al., 2015). Les informations, en lien avec le cycle répliatif du CHIKV, mentionnées ci-après proviennent de la revue (Silva & Dermody, 2017). Après le désassemblage de la capsid, le génome viral est relâché dans le cytoplasme. La traduction de l'ARN (+) viral par les ribosomes débute et aboutit à la synthèse de la polyprotéine non structurale (P1234). La polymérase virale nsp4 est séparée de la P123 par la protéase nsp2. La présence dans certaines souches d'un codon-stop entre nsp3 et nsp4 conduit, par un mécanisme de lecture au travers du ribosome, à la production des deux polyprotéines P123 et P1234. Ensemble, nsp4, P123, l'ARN viral et probablement, des protéines cellulaires forment à la membrane plasmique de petites vésicules appelées sphérules. Les sphérules sont le siège de la réplication de l'ARN viral. Des intermédiaires de réplication sous forme d'antigénome (ARN de polarité négative) y sont synthétisés et servent de matrice pour la production d'ARN (+) génomique et la transcription d'ARNm subgénomique 26S à partir d'un promoteur interne (Figure 17). À mesure que le cycle de réplication progresse, les sphérules sont internalisées au sein de grandes vacuoles (*Cytopathic vacuoles I*; CPV-I). La

traduction des ARNm subgénomiques permet la synthèse des protéines structurales. Le principal produit traduit est celui de la polyprotéine structurale incluant la protéine de capsid, E3, E2, 6K et E1. À une faible fréquence, un décalage de cadre de lecture (-1) permet la production de la polyprotéine incluant la protéine de capsid, E3, E2 et TF. Les polyprotéines sont clivées par des protéases cellulaires et virales. La protéine de capsid se libère des polyprotéines par autoprotéolyse. Elle interagit avec les génomes néosynthétisés afin de former des nucléocapsides icosaédriques. Les polyprotéines E3/E2/6K/E1 et E3/E2/TK sont ensuite adressées au réticulum endoplasmique où elles sont clivées. Lors de leur transit au sein du système sécrétoire endomembranaire, les protéines E1 et E2 subissent des changements conformationnels et des modifications post-traductionnelles (palmitoylation et glycolysation) afin de former des spicules matures qui seront dirigés vers la membrane cytoplasmique. La fin du cycle correspond à l'assemblage des nucléocapsides avec les hétérodimères E1/E2 au niveau de la membrane plasmique puis au bourgeonnement et à la libération des particules virales matures (Figure 18).

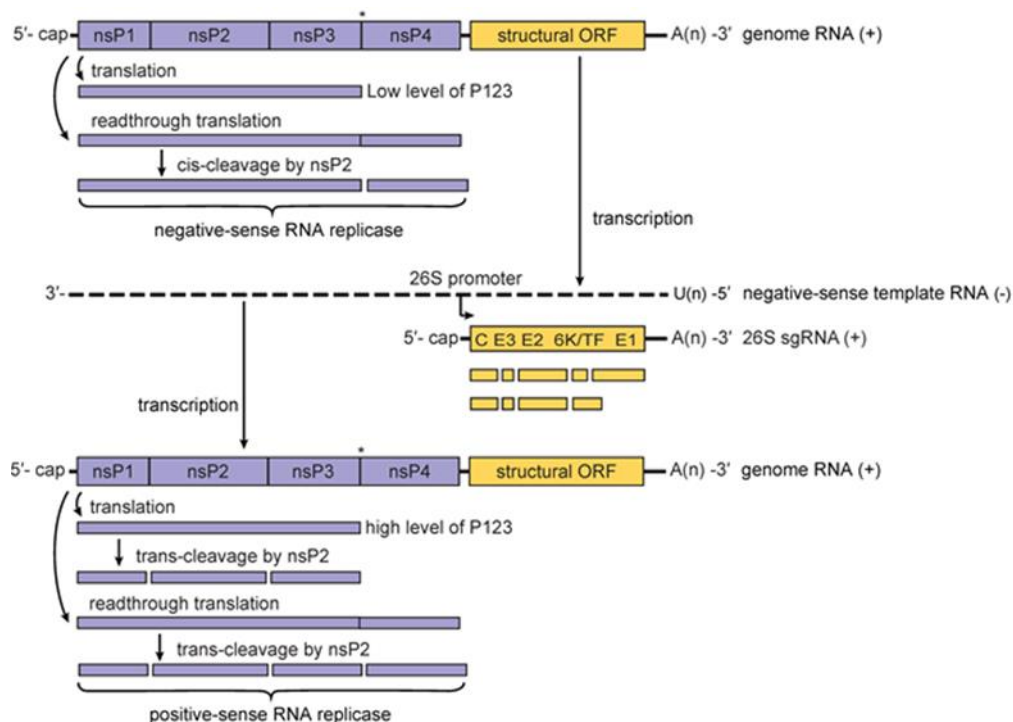


Figure 17. Modèle de réplication du génome viral du CHIKV (Rubing Chen, 2018).

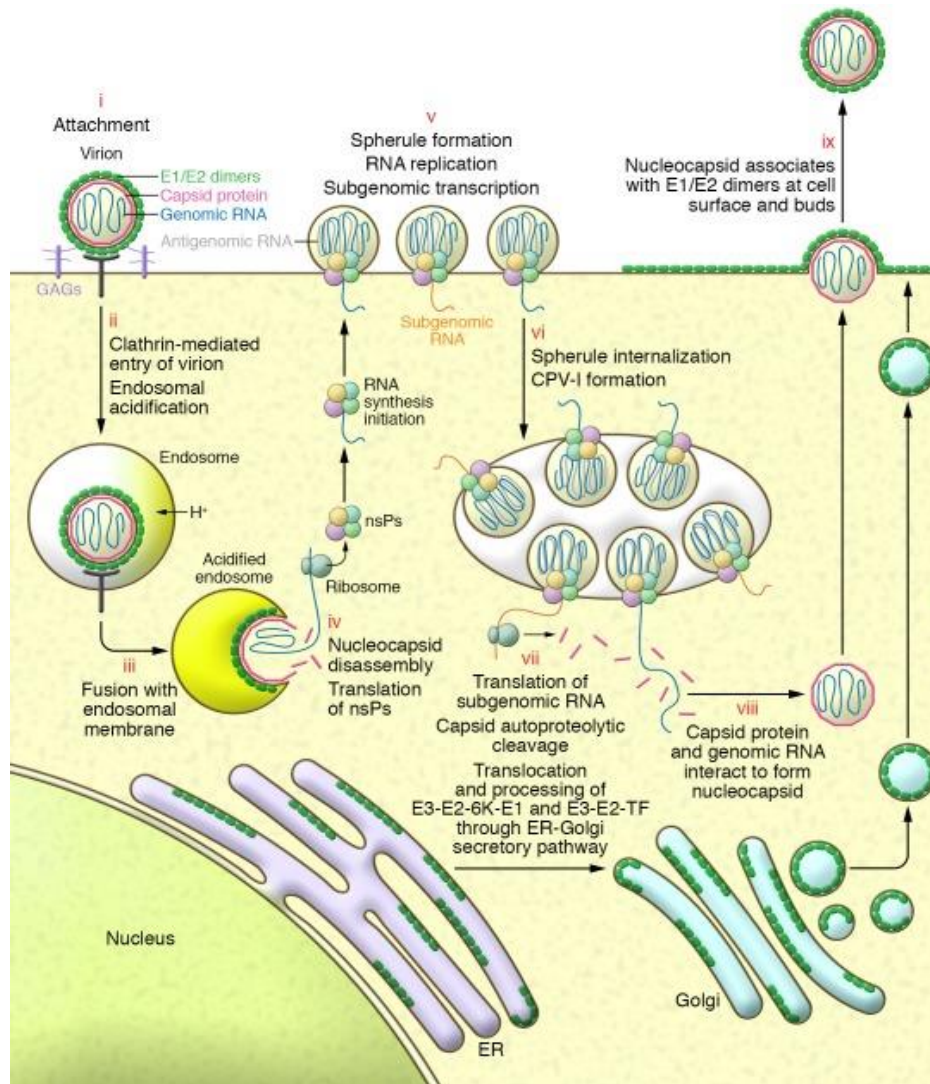


Figure 18. Cycle réplcatif du CHIKV (adapté de (Silva & Dermody, 2017)). (i) Attachement *via* E2, (ii) entrée par endocytose clathrine-dépendante, (iii) fusion de l'enveloppe virale et de la membrane endosomale médiée par E1, (iv) désassemblage de la nucléocapside, libération du génome viral et traduction des protéines non structurales, (v) formation du complexe de réplication au sein de sphérules, réplication de l'ARN viral et transcription de l'ARN subgénomique, (vi) internalisation des sphérules, (vii) traduction des protéines structurales à partir de l'ARN subgénomique, autolyse de la protéine de capsid et translocation des polyprotéines E3-E2-6k-E1 et E3-E2-TF au niveau du réticulum endoplasmique, (viii) interaction des protéines de capsid avec l'ARN génomique pour former les nucléocapsides, (ix) association des nucléocapsides avec les dimères E1/E2 à la surface cellulaire et bourgeonnement.

2.4. Pathogénèse, manifestations cliniques, traitements et prophylaxies

Suite à l'introduction du virus dans l'organisme humain par la pique d'un moustique infecté, le CHIKV se réplique dans un premier temps au site d'inoculation dans les fibroblastes et les macrophages cutanés (Lum & Ng, 2015; Silva & Dermody, 2017). Les virus sont ensuite capturés par les cellules dendritiques présentes dans la peau et transportés aux ganglions lymphatiques les plus proches. L'atteinte des ganglions lymphatiques permet la dissémination du virus vers les organes périphériques cibles, tels que la rate, la peau, les muscles, les articulations et dans les cas les plus sévères, le foie et le cerveau (Lum & Ng, 2015; Vairo et al., 2019). La libération de particules virales dans la circulation sanguine permet d'atteindre une virémie pouvant aller au-delà de 10^9 copies/mL de sérum (Parola et al., 2006). Une virémie aussi élevée est plutôt rare chez les *Alphavirus* et facilite la transmission du CHIKV de l'hôte en phase virémique aux moustiques *via* le prélèvement de sang.

Contrairement à plusieurs autres arbovirus comme le DENV, le ZIKV ou encore le WNV (environ 80% de cas asymptomatiques), l'infection par le CHIKV est le plus souvent symptomatique, avec environ 85% des personnes infectées présentant des manifestations cliniques (Burt et al., 2017). Les premiers symptômes apparaissent généralement après une période d'incubation d'en moyenne 2 à 7 jours. Le tableau clinique se caractérise par une apparition soudaine de fièvre suivie par des arthralgies et des myalgies sévères souvent débilitantes, des gonflements au niveau des articulations, des maux de tête, des nausées, de la fatigue et des éruptions cutanées (Burt et al., 2017; Vairo et al., 2019) (Figure 19). D'autres symptômes incluant des troubles digestifs et oculaires ont également été associés à l'infection par le CHIKV (de Andrade et al., 2017; Rahman, Yamagishi, Rahim, Hasan, & Sobhan, 2019). Les formes graves de la maladie sont peu fréquentes et s'observent principalement chez les sujets vulnérables comme les nouveau-nés, les personnes âgées et les personnes présentant des comorbidités (p. ex., les immunodéprimés ou les diabétiques). Les complications cliniques correspondent le plus fréquemment à des atteintes neurologiques et plus rarement, à des atteintes hépatiques, pulmonaires, cardiovasculaires ou rénales. Une étude épidémiologique menée lors de l'épidémie 2005-2006 sur l'île de La Réunion a montré qu'environ 0,3% de tous les cas d'infection par le CHIKV correspondait à des formes atypiques de la maladie, parmi lesquelles 24,1% des sujets présentaient des complications neurologiques (soit 1 cas sur 1000 infections) (Economopoulou et al., 2009). La transmission verticale de la mère à l'enfant du CHIKV est rare, mais peut atteindre près de 50% lorsque l'accouchement a lieu durant la phase virémique de la mère (Cardona-Correa, Castano-Jaramillo, & Quevedo-Velez, 2017).

L'infection chez le nouveau-né nécessite souvent une hospitalisation prolongée en raison des manifestations cliniques sévères observées dans environ 50% des cas (Gerardin et al., 2008; Torres et al., 2016; Villamil-Gomez et al., 2015). La mortalité en lien avec l'infection par le CHIKV est relativement faible avec des taux de l'ordre de 1 mort pour 1000 cas cliniques (Vairo et al., 2019).

La phase aigüe de la maladie dure environ 7 à 10 jours. La mise en place d'une réponse immunitaire adaptative marquée par la production d'anticorps neutralisants permet l'élimination du virus de la circulation sanguine et confère une immunité durable (Lum et al., 2013). La plupart des symptômes se résorbent en quelques semaines. Néanmoins, chez certains patients, les douleurs articulaires peuvent persister des mois voire des années. Des études de suivi de cohortes de patients ont montré que plus de 60% des patients souffraient d'arthralgies intermittentes avec des phases de guérisons et de rechutes, jusqu'à trois ans après avoir été infecté (Moro et al., 2012; Schilte et al., 2013). L'évolution chronique de la maladie serait liée à la persistance du virus et à l'induction d'une réponse inflammatoire continue. Les macrophages ont été identifiés comme le principal réservoir du CHIKV durant la phase chronique de l'infection (Labadie et al., 2010).

À l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement médicamenteux antiviral spécifique contre le CHIKV. La prise en charge clinique de la maladie est purement symptomatique et vise principalement à limiter la douleur et l'inflammation. L'utilisation d'antipyrétiques, d'analgésiques et d'anti-inflammatoires est recommandée (OMS, 2020). Plusieurs molécules possédant des activités antivirales contre le CHIKV ont été identifiées *in vitro* (Abdelnabi, Neyts, & Delang, 2015). Il s'agit notamment de la chloroquine (M. Khan, Santhosh, Tiwari, Lakshmana Rao, & Parida, 2010), de la ribavirine et de l'interféron alpha (Gallegos, Drusano, DZ, & Brown, 2016). D'autres stratégies thérapeutiques contre le CHIKV, comme l'immunothérapie ont démontré leurs efficacités dans les modèles animaux (Couderc et al., 2009; Powers, 2018). Toutefois, des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de déterminer l'innocuité et l'efficacité chez l'Homme de ces substances présumées anti-CHIKV avant d'envisager leur utilisation en clinique. En dépit de la forte morbidité associée à l'infection par le CHIKV et de l'impact économique qui en découle, il n'existe actuellement aucun vaccin homologué disponible sur le marché. Des recherches pour le développement d'un vaccin ont été menées en utilisant différentes approches (Schwameis, Buchtele, Wadowski, Schoergenhofer, & Jilma, 2016): (i) des vaccins à virus vivants atténués (Levitt et al., 1986; Plante et al., 2011), (ii) des particules pseudovirales (VLP en anglais pour *virus-like particles*)

(Akahata et al., 2010), (iii) des vaccins à virus recombinants (E. Wang et al., 2008), (iv) des vaccins sous-unitaires (M. Khan, Dhanwani, Rao, & Parida, 2012), (v) des vaccins à virus inactivés (Tiwari et al., 2009) et (vi) des vaccins à ADN (Mallilankaraman et al., 2011; Muthumani et al., 2008). Certaines de ces stratégies vaccinales sont en phase d'essais cliniques, mais ne seront certainement pas disponibles sur le marché avant plusieurs années. Pour le moment, la meilleure prévention repose essentiellement sur la lutte antivectorielle (destruction des gîtes larvaires, insecticides, etc.) et les moyens de protection individuels contre les piqures de moustiques (répulsifs, moustiquaires, vêtements couvrant le corps, etc.).



Figure 19. Manifestations cliniques de l'infection par le CHIKV. (a) Œdème des membres inférieurs, symptôme très fréquent chez l'adulte pendant la phase aiguë de l'infection ; (b) Raccourcissement du tendon d'Achille droit en phase chronique suite à une forte inflammation pendant la phase aiguë de l'infection ; (c) Éruptions cutanées après 80 jours d'infection ; (d) Patient de l'image c après un traitement aux corticostéroïdes, les lésions disparaissent, mais des tâches persistent ; (e) Inflammation intense au niveau des épaules et des coudes restreignant les mouvements des membres supérieurs ; (f) Alopécie après environ 18 mois d'infection, symptôme fréquent durant la phase chronique en particulier chez les femmes adultes (Cunha & Trinta, 2017).

2.5. Phylogénie, émergences et distribution mondiale du virus du chikungunya

La maladie du chikungunya fut identifiée pour la première fois en 1952 lors d'une flambée épidémique qui toucha le sud de la province de Tanganyika (correspondant actuellement au nord de la Tanzanie) (Lumsden, 1955; Robinson, 1955; Ross, 1956). Des examens rétrospectifs de descriptions de cas suggèrent que des épidémies de chikungunya ont eu lieu dès 1779, mais ont été confondues avec des épidémies de dengue en raison de la similarité des signes cliniques causés par les deux virus (Carey, 1971). Les analyses phylogénétiques des séquences du CHIKV indiquent que le virus est apparu il y a environ 500 ans en Afrique (Volk et al., 2010). Trois groupes phylogénétiques du CHIKV ont été identifiés : (i) le génotype Ouest-africain, qui est associé à de petites épidémies localisées en Afrique de l'Ouest, (ii) le génotype Est/Centre/Sud/Africain (ECSA), qui lui s'est propagé à plusieurs occasions dans de nouvelles régions provoquant d'importantes épidémies et (iii) le génotype asiatique, qui aurait divergé d'une souche ECSA introduite en Asie il y a 70 à 90 ans (Volk et al., 2010) (Figure 20).

De la découverte du virus jusqu'à la fin des années 90, les différents génotypes du CHIKV sont détectés de façon sporadique en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud selon les limites géographiques indiquées par leurs noms. En Afrique, les pays touchés sont l'Afrique du Sud en 1956 et en 1975-1977, le Zimbabwe en 1957, 1961-1962 et en 1971, la République Démocratique du Congo en 1958, 1960 et en 1999-2000, la Zambie en 1959, le Sénégal en 1960 et 1996-1997, l'Ouganda en 1961-1962 et en 1968, le Nigeria en 1964, 1969 et en 1974, l'Angola en 1970-1971, la République centrafricaine en 1978-1979, le Burundi en 1980-1982, le Gabon et le Kenya en 1982, le Malawi en 1987-1989 et la Guinée en 1992 (Powers & Logue, 2007; Wahid, Ali, Rafique, & Idrees, 2017; H. Zeller, Van Bortel, & Sudre, 2016). En Asie, la première épidémie documentée du CHIKV date de 1958 à Bangkok en Thaïlande. Par la suite, d'autres épidémies sont identifiées en Asie du Sud-Est (Malaisie, Cambodge, Vietnam, Myanmar, Taïwan, Philippines et Indonésie) et sur le sous-continent indien (Inde, Sri Lanka et Pakistan) (Powers & Logue, 2007; Wahid et al., 2017; H. Zeller et al., 2016). Au début des années 2000, des épidémies d'ampleurs croissantes sont signalées en Afrique et en Asie (Laras et al., 2005; Pastorino et al., 2004). En 2004, le chikungunya réémerge au Kenya ; sur l'île de Lamu, plus de 70% de la population est affectée (Sergon et al., 2008). La souche épidémique du virus (génotype ECSA) se propage ensuite des villes côtières du Kenya aux îles de l'océan Indien causant des épidémies d'une magnitude sans précédent aux Comores, aux Seychelles, à Mayotte, à La Réunion et à l'île Maurice (Schuffenecker et al., 2006). Sur l'île de La Réunion,

entre 2005 et 2006, plus d'un tiers de la population fut infecté et pour la première fois, des formes atypiques, sévères et mortelles de la maladie sont décrites (Economopoulou et al., 2009; Renault et al., 2007). À cette période, les souches isolées dans les îles de l'océan Indien forment un nouveau clade au sein du groupe phylogénétique ECSA, nommé *Indian Ocean Lineage* (IOL) (Kariuki Njenga et al., 2008; Volk et al., 2010) (Figure 20).

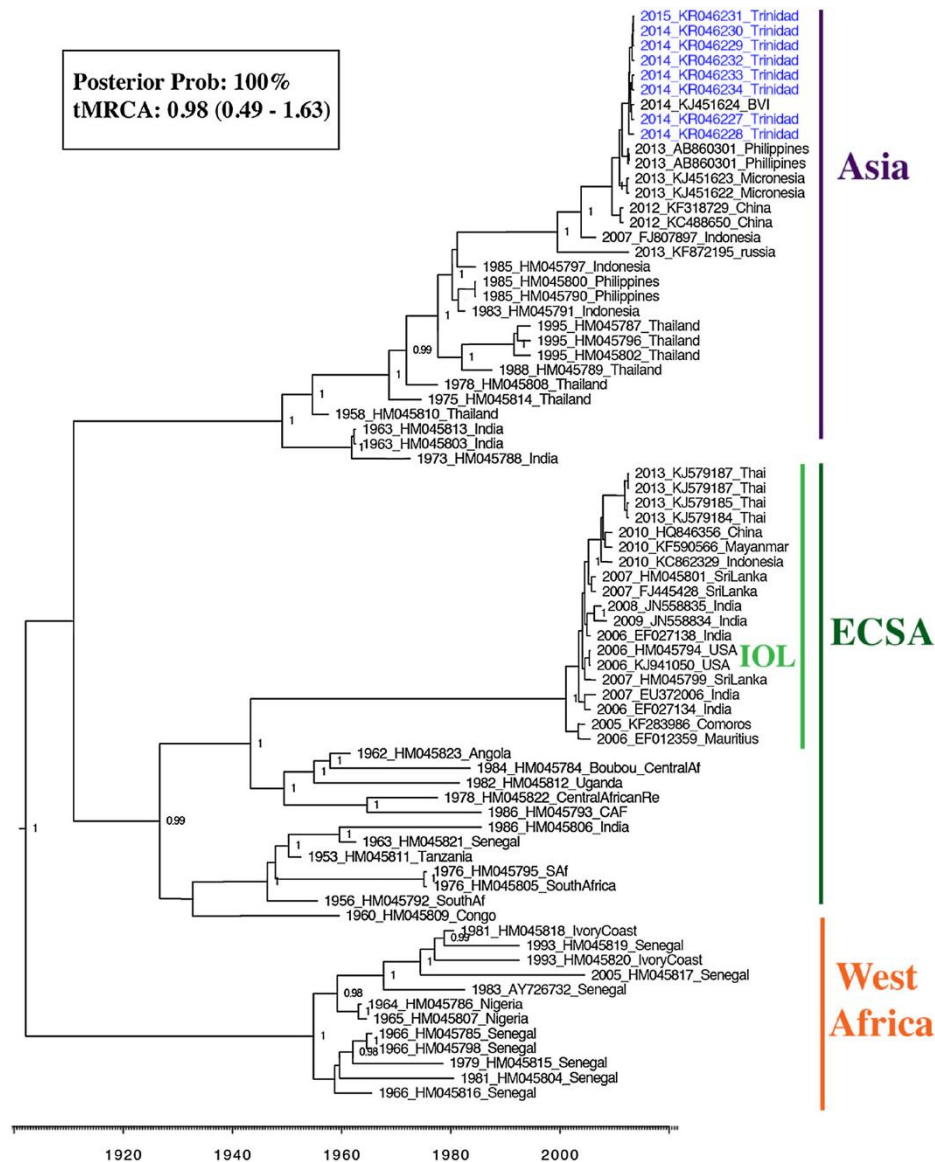


Figure 20. Arbre phylogénétique représentant les relations phylogénétiques de 74 séquences du CHIKV isolées lors d'épidémies. Les données de séquences sont basées sur la région codante des souches virales. Le clade IOL (*Indian Ocean Lineage*) forme un sous-groupe monophylétique au sein du génotype ECSA (Wahid et al., 2017).

De plus, certaines souches de ce clade présentent une mutation adaptative (E1-A226V) qui confère au virus de meilleures capacités répliquatives au sein du vecteur *Ae. albopictus* (Tsetsarkin et al., 2007; Vazeille et al., 2007). Le moustique *Ae. albopictus*, jusqu'alors considéré comme un vecteur secondaire du CHIKV, devient un vecteur principal au même titre que le vecteur classique, *Ae. aegypti*. Cette microévolution du génome viral a probablement participé à l'ampleur et la propagation des épidémies, en permettant la circulation optimale du virus dans les zones où le moustique *Ae. aegypti* est absent ou peu abondant, comme sur l'île de La Réunion où *Ae. albopictus* est l'espèce majoritaire. Pendant plus de quatre ans, des épidémies majeures liées au génotype ECSA ont lieu de façon quasi continue en Afrique, dans les îles de l'océan Indien, mais aussi dans certaines régions d'Asie du Sud (Powers & Logue, 2007; H. Zeller et al., 2016). À la fin de l'année 2005, le génotype ECSA est introduit en Inde où plus de 1,3 million de personnes infectées réparties dans 13 états sont recensées en une année (Arankalle et al., 2007). D'autres pays d'Asie du Sud incluant le Sri Lanka, la Malaisie, la Thaïlande, la Chine et le Cambodge détectent des épidémies de chikungunya liées au génotype ECSA (H. Zeller et al., 2016). Quant au génotype asiatique du CHIKV, il continue de circuler en Asie du Sud notamment en Indonésie et aux Philippines (Maha, Susilarini, Hariastuti, & Subangkit, 2015; Sy et al., 2016). À l'instar du génotype ECSA, le génotype asiatique étend sa répartition géographique lorsqu'en 2011, il est pour la première fois détecté dans la région du Pacifique en Nouvelle-Calédonie (Dupont-Rouzeyrol et al., 2012). Par la suite, le génotype asiatique sera responsable de la majorité des épidémies de chikungunya dans les îles du Pacifique où près de la moitié des pays/territoires sont touchés (Nhan & Musso, 2015). Face à la recrudescence du chikungunya dans le monde, l'émergence du virus dans la région tropicale du continent américain semblait inévitable. En novembre 2013, les premiers cas de transmission locale du CHIKV sont détectés dans la Caraïbe sur l'île de Saint-Martin (Cassadou et al., 2014). La souche émergente appartient au génotype asiatique (Leparc-Goffart, Nougairede, Cassadou, Prat, & de Lamballerie, 2014). Très vite, le virus se répand aux îles voisines et sur le continent américain. Entre 2013 et 2014, l'organisation panaméricaine de la santé déclare plus de 1,2 million de cas suspects et confirmés, incluant des formes sévères et des décès (PAHO).

Dans l'hémisphère nord, l'Europe n'est pas épargnée. Des importations du CHIKV par des voyageurs en provenance d'Inde, de République centrafricaine ou du Cameroun ont été à l'origine de cas de transmission locale en Italie (2007 et 2017) et en France (2010, 2014 et 2017) (voir section 1.4 du chapitre 1). Le moustique *Ae. albopictus* présent dans ces régions fut identifié comme vecteur responsable des cas de transmission autochtone en Europe

(Grandadam et al., 2011; Rezza et al., 2007). L'ensemble des souches identifiées en Europe appartiennent au génotype ECSA. Les souches de 2007 en Italie et 2014/2017 en France portent la mutation adaptative E1-A226V spécifique d'*Ae. albopictus*, tandis que celles de 2010 en France et 2017 en Italie ne portent pas cette mutation (ECDC, 2020b). La circulation du génotype ECSA en Europe soulève de nombreuses inquiétudes quant au potentiel adaptatif du virus vis-à-vis des populations locales d'*Ae. albopictus*. De façon surprenante, aucune souche appartenant au génotype asiatique n'a été jusqu'à présent détectée parmi les cas autochtones européens. Pourtant en 2014, la quasi-totalité (soit 87%) des cas importés confirmés du CHIKV en France provenait des départements français d'Amérique où le génotype asiatique du virus circulait (Septfons A, 2015). Des études comparant la transmission des génotypes ECSA et Asiatique du CHIKV ont montré que le moustique *Ae. albopictus* du sud de la France était compétent pour les deux génotypes à 28 °C. Néanmoins, une meilleure transmission du génotype africain était observée dans les premiers jours post-infection (Figure 21). De plus, la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* du sud de la France vis-à-vis du génotype asiatique était significativement plus basse à 20 °C qu'à 28 °C (Vega-Rua et al., 2015). Le climat tempéré, avec des températures plus basses que celles des régions tropicales, aurait peut-être été un facteur limitant de la propagation du génotype asiatique en France.

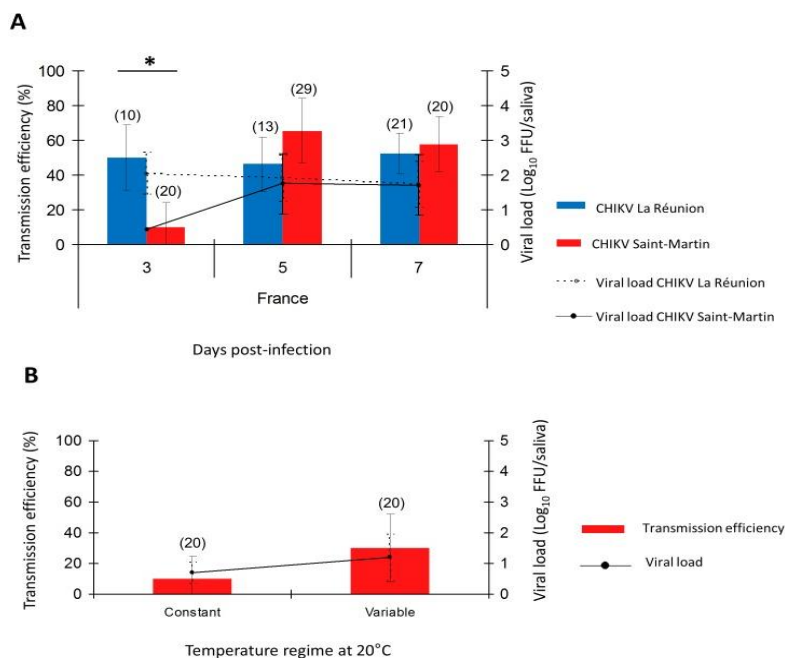


Figure 21. Efficacité de transmission du CHIKV par *Ae. albopictus* du sud de la France. Des moustiques *Ae. albopictus* du sud de la France ont été infectés avec les souches CHIKV_La Réunion (génotype africain ECSA) et CHIKV_Saint-Martin (génotype asiatique) puis incubés

à 28 °C (A). En parallèle, des moustiques infectés avec la souche CHIKV_Saint-Martin ont été placés à 20 °C (température constante ou fluctuante autour d'une moyenne de 20 °C) (B). Les efficacités de transmission présentées en (B) correspondent aux données obtenues au 7^e jour post-infection, car contrairement aux moustiques incubés à 28 °C (A), aucune salive infectieuse n'a été détectée avant cette période (Vega-Rua et al., 2015).

En 10 ans, le CHIKV a émergé sur les 5 continents (Figure 22). Aujourd'hui encore le virus circule dans certains pays tels que le Soudan (2018), le Yémen (2019) et plus récemment, le Cambodge et le Tchad (2020) (OMS, 2020). L'absence d'un vaccin homologué et de traitements spécifiques, ainsi que l'expansion des vecteurs rendent le risque d'émergence du CHIKV constant. Des événements répétés d'introduction à partir de zones où le virus circule représentent une menace perpétuelle, notamment dans les régions encore peu affectées comme l'Europe où la majeure partie de la population n'a jamais été exposée au virus.

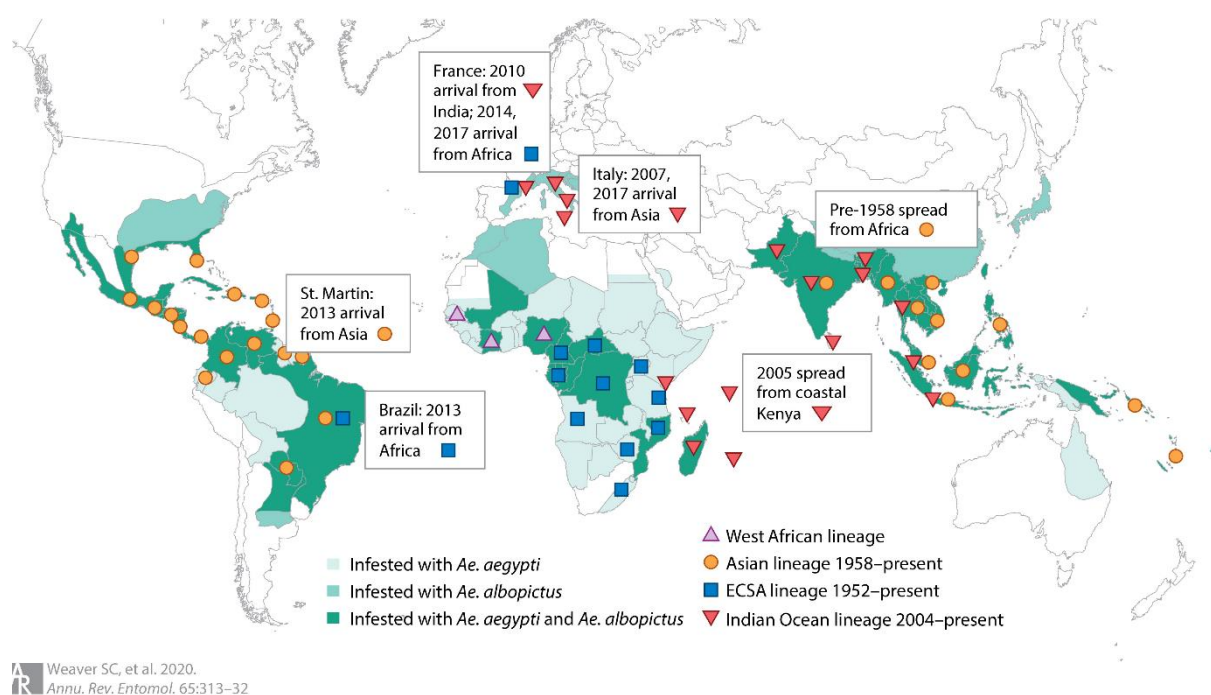


Figure 22. Carte de la répartition géographique des cas de transmission locale du CHIKV et de ses vecteurs majeurs, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Chaque génotype est représenté par un symbole différent : le génotype Ouest-africain est indiqué par des triangles violets ; le génotype asiatique est indiqué par des cercles oranges ; le génotype ECSA est indiqué par des carrés bleus et le sous-génotype *Indian Ocean Lineage* (IOL) est indiqué par des triangles inversés rouges. L'aire de répartition d'*Ae. aegypti* est indiquée en vert clair et celle d'*Ae. albopictus* en vert. Les zones où les deux espèces de moustiques sont présentes sont indiquées en vert foncé (Weaver, Chen, & Diallo, 2020).

2.6. Les cycles de transmission du virus du chikungunya

Le CHIKV est maintenu au sein de deux cycles principaux : le cycle selvatique, entretenu par des transmissions enzootiques et le cycle urbain, entretenu par des transmissions interhumaines (Figure 23). Le virus est essentiellement transmis par les moustiques du genre *Aedes*. En Afrique, les génotypes ancestraux, Ouest-africain et ECSA, circulent en zone forestière au sein de cycles selvatiques faisant intervenir des moustiques zoophages et des animaux sauvages. Les espèces de moustiques impliquées dans ces cycles varient en fonction de la localisation et des conditions écologiques, mais incluent principalement les moustiques des espèces : *Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. africanus*, *Ae. neoafricanus*, *Ae. dalzieli* et *Ae. vittatus* (Diallo, Thonnon, Traore-Lamizana, & Fontenille, 1999; Jupp & McIntosh, 1990; Powers, Brault, Tesh, & Weaver, 2000). Les primates non humains notamment, les singes (*Chlorocebus sabaues*, *Erythrocebus patas*, *Papio papio*, *Cercopithecus aethiops*) et les galagos (*Galago senegalensis*) ont été reconnus comme étant les principaux hôtes amplificateurs du CHIKV au sein des cycles selvatiques (Althouse et al., 2018; Weaver et al., 2020). Néanmoins, plusieurs autres espèces animales comme les chauves-souris, les écureuils, certains oiseaux et rongeurs pourraient également contribuer au maintien enzootique du CHIKV (Bres, Camicas, Cornet, Robin, & Taufflieb, 1969; Calisher, Childs, Field, Holmes, & Schountz, 2006; Diallo et al., 1999). Les épizooties du CHIKV, détectées par la surveillance des espèces vectrices forestières, se présentent de manière cyclique, espacées par des périodes de silence de 3-4 ans correspondant au renouvellement des populations des primates sauvages (nouveau-nés non immunisés contre le virus) (Diallo et al., 1999). Épisodiquement, des souches virales issues des cycles selvatiques, émergent « accidentellement » chez l'Homme causant des cas sporadiques ou de petites épidémies localisées (Powers & Logue, 2007). Ces cas, principalement observés en zone rurale décrivent un cycle intermédiaire entre le cycle selvatique et le cycle urbain, nommé cycle rural (Figure 23). À ce jour, des cycles de transmission selvatique n'ont été identifiés qu'en Afrique et seraient les foyers d'origine du CHIKV. En Asie, malgré la détection en Malaisie et aux Philippines de primates non humains séropositifs, l'existence d'une circulation enzootique du CHIKV reste à être démontrée (Inoue et al., 2003; Marchette, Rudnick, Garcia, & MacVean, 1978). En effet, ces primates séropositifs pourraient avoir été exposés à des souches virales circulant en cycle urbain. Si tel est le cas, on peut alors s'interroger sur le potentiel d'une installation d'un cycle selvatique en Asie, comme cela a été observé pour le YFV en Amérique. En Asie, en Océanie, en Europe et en Amérique, le CHIKV circule uniquement au sein de cycles urbains impliquant l'Homme en tant qu'hôte amplificateur

et les moustiques anthropophiles *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* en tant que vecteurs. En l'absence du cycle selvatique, le maintien du cycle urbain du CHIKV repose sur l'introduction continue du virus au sein de nouvelles populations naïves.

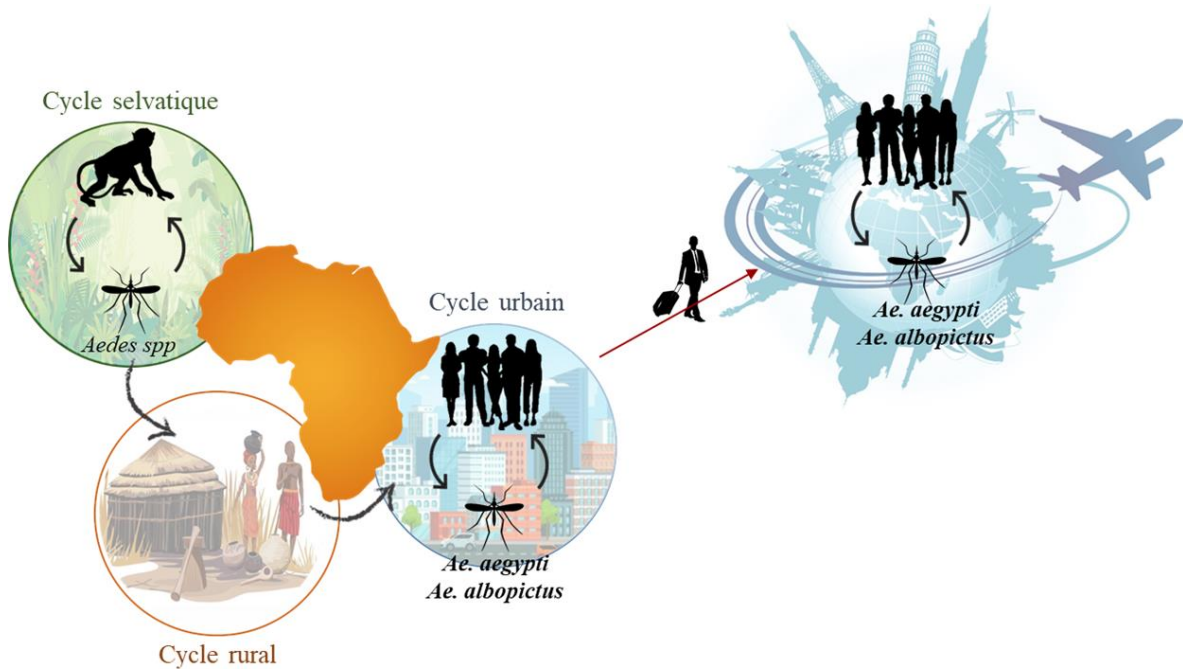


Figure 23. Cycles de transmission du CHIKV. Le CHIKV circule initialement en Afrique au sein de cycles selvatiques entre des moustiques forestiers et des primates non humains. L'initiation du cycle urbain (épidémique ou endémique) se fait par l'intermédiaire du cycle rural où les personnes habitant ou travaillant à proximité des zones forestières se font infecter par des moustiques anthropo-zoophages. Le déplacement de ces personnes des zones rurales aux villes plus densément peuplées, où les vecteurs péri-domestiques *Ae. aegypti* et/ou *Ae. albopictus* sont présents, permet le déclenchement de cycles de transmissions interhumaines. Les voyages internationaux facilitent ensuite la dissémination mondiale du virus.

Chapitre 3

Aedes albopictus : une espèce invasive d'importance médicale majeure



Crédit: A. Faraji

«À l'exception de l'Antarctique, toutes les autres parties du monde hébergent des moustiques, aussi bien dans le cercle arctique que dans des oasis au milieu des déserts.» (Delaunay, 2009)

Les moustiques sont dotés d'une capacité exceptionnelle d'adaptation et revêtent une importance particulière au sein de l'écosystème en tant que pollinisateurs et proies de nombreuses espèces dans la chaîne alimentaire.

Cette partie de la synthèse bibliographique, est entièrement dédiée au moustique *Ae. albopictus*, vecteur du CHIKV en Europe. Au travers des quatre sections qui compose ce chapitre, nous étudierons les divers aspects de la biologie et de l'écologie de ce moustique et nous intéresserons, tout particulièrement, à son rôle en tant que vecteur d'arbovirus.

3. Chapitre 3 : *Aedes albopictus* : une espèce invasive d'importance médicale majeure

3.1. Classification taxonomique

Au sein du règne animal, les moustiques sont des arthropodes appartenant à la classe des insectes et à l'ordre des diptères. Classés en plusieurs sous-familles et genres, les moustiques forment la famille des *Culicidae*. Ils se caractérisent par des antennes longues et fines, des ailes ornées d'écailles et un appareil buccal de type piqueur-suceur. La famille des *Culicidae* comprend deux sous-familles : les *Anophelinae* et les *Culicinae*. La sous-famille des *Anophelinae* inclut notamment le genre *Anopheles*, et celle des *Culicinae* est composée, entre autres, des genres *Aedes* et *Culex*. À ce jour, plus de 3 500 espèces de moustiques réparties en une centaine de genres sont répertoriées dans le monde (Duvallet et al., 2017). Le moustique *Ae. albopictus* appartient à la sous-famille des *Culicinae*, au genre *Aedes* et au sous-genre *Stegomyia* dans lequel on retrouve également le moustique *Ae. aegypti*.

Embranchement	: <i>Arthropoda</i>	(= Pattes articulées)
Classe	: <i>Insecta</i>	(= Corps segmenté en trois parties)
Sous-Classe	: <i>Pterygota</i>	(= avec des ailes)
Ordre	: <i>Diptera</i>	(= avec deux ailes)
Sous-Ordre	: <i>Nematocera</i>	(= avec des antennes rondes et longues)
Famille	: <i>Culicidae</i>	(= moustiques)
Sous-Famille	: <i>Culicinae</i>	
Genre	: <i>Aedes</i>	
Sous-Genre	: <i>Stegomyia</i>	
Espèce	: <i>Aedes albopictus</i> (Skuse, 1894) ; <i>Ae. aegypti</i> (Linnaeus, 1762)	

Figure 24. Position taxonomique simplifiée d'*Ae. albopictus* (adapté de (Carnevale & Robert, 2017)).

3.2. Biologie du moustique *Ae. albopictus*

3.2.1. Cycle de développement

Les moustiques possèdent un cycle de vie complexe caractérisé par une métamorphose complète déterminé par quatre stades de développement distincts : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte (Figure 25). Les trois premiers stades sont aquatiques tandis que le stade imaginal (adulte) est aérien. La femelle *Ae. albopictus* gravide pond ses œufs sur un support humide de préférence sombre et rugueux ; il peut s'agir de supports artificiels anthropiques (comme les parois de soucoupes de pots de fleurs, de gouttières mal vidées, de pneus ou autres récipients abandonnés) ou de supports naturels (comme les creux de rocher ou les phytotelmes). En l'absence d'eau, les œufs dits « quiescents » peuvent résister à la dessiccation et rester viables pendant plusieurs mois (Diniz, de Albuquerque, Oliva, de Melo-Santos, & Ayres, 2017). Cette caractéristique joue un rôle prépondérant dans la dispersion passive du moustique *via* le transport de récipients asséchés comme les pneus usagés. De plus, en zones tempérées, les œufs d'*Ae. albopictus* sont capables, à l'approche de l'hiver (baisse des températures et diminution de la photopériode), d'entrer en diapause¹ (Diniz et al., 2017; Medlock, Avenell, Barrass, & Leach, 2006). Cette adaptation métabolique confère au moustique *Ae. albopictus* une résistance aux températures hivernales et permet le maintien des populations jusqu'au printemps suivant. Lorsque les conditions sont réunies et que le support de la ponte se retrouve immergé (pluie, arrosage, etc.), les œufs au contact de l'eau éclosent en libérant des larves néonates. Le développement larvaire se divise en quatre stades successifs (L1, L2, L3 et L4) entrecoupés de mues permettant l'augmentation de la taille des larves (Figure 25 et 26). Les larves sont mobiles et se nourrissent de petites particules organiques, de bactéries et d'algues microscopiques. En fin de croissance, la larve de stade 4 se transforme en nymphe (Figure 25 et 26). La nymphe reste aquatique et est capable de nager, mais ne s'alimente plus. Durant le développement nymphal (également appelé nymphose), le moustique subit de profondes transformations morphologiques et physiologiques, permettant le passage d'un mode de vie aquatique à un mode de vie aérien. L'émergence de l'adulte entièrement formé survient lorsque la pression interne provoque la rupture de la coque nymphale. Les bords de la fente s'écartent laissant se

¹ Diapause : État physiologique de dormance métabolique, génétiquement programmée, correspondant à une phase d'arrêt du développement pendant les périodes de conditions environnementales défavorables.

dégager un adulte ailé apte à prendre son envol. La durée du cycle de développement de l'éclosion de l'œuf à l'émergence de l'adulte dépend de facteurs tels que la température et la disponibilité des ressources nutritives ; elle varie en moyenne entre 7 et 10 jours. En régions tempérées, lorsque les températures sont basses, le cycle de développement est plus long et peut s'étendre sur plusieurs semaines. Les moustiques adultes mâles et femelles se nourrissent de sucres végétaux (sève d'arbres, nectar de fleurs, exsudat de fruits, etc.). Lors de l'accouplement, la femelle moustique stocke les spermatozoïdes du mâle dans ses spermathèques (3 pour *Ae. albopictus*). En effet, même si les femelles peuvent s'accoupler avec plusieurs mâles, elles seront le plus souvent inséminées par un seul d'entre eux. La libération régulière de spermatozoïdes à partir des spermathèques permet la fécondation des œufs de la femelle tout au long de sa vie. À ce moment, la prise d'un repas sanguin par la femelle, est une étape essentielle assurant un apport protéique indispensable à la maturation des œufs (Yoeli & Mer, 1938). C'est par leur comportement hématophage que les femelles moustiques jouent le rôle de vecteur d'agents pathogènes. Lorsque ses œufs arrivent à maturité, la femelle se met à la recherche d'un site de ponte. La femelle *Ae. albopictus* peut fractionner sa ponte et distribuer ses œufs dans plusieurs gîtes afin de maximiser les chances de survie des œufs. Après avoir pondu, la femelle repart en quête d'une nouvelle source de sang afin de réaliser la maturation d'un autre lot d'œufs. La séquence alternant repas sanguin et ponte, est répétée tout au long de la vie de la femelle et est appelée cycle gonotrophique. La durée de ce cycle dépend fortement des conditions environnementales et est un facteur majeur déterminant l'efficacité de la femelle en tant que vecteur (Waldock et al., 2013). En moyenne, une femelle réalise 5 à 8 cycles gonotrophiques au cours de sa vie. L'espérance de vie des femelles est souvent plus longue que celle des mâles. En insectarium, à des températures comprises entre 20°C et 30°C, la longévité d'*Ae. albopictus* est en moyenne de 30 jours pour les femelles et de 18 jours les mâles.

Les informations générales de cette section sont tirées des ouvrages suivants : « The biology of mosquitoes » de Clements (1992) et « Entomologie médicale et vétérinaire » de Duvallet et., al (2017).

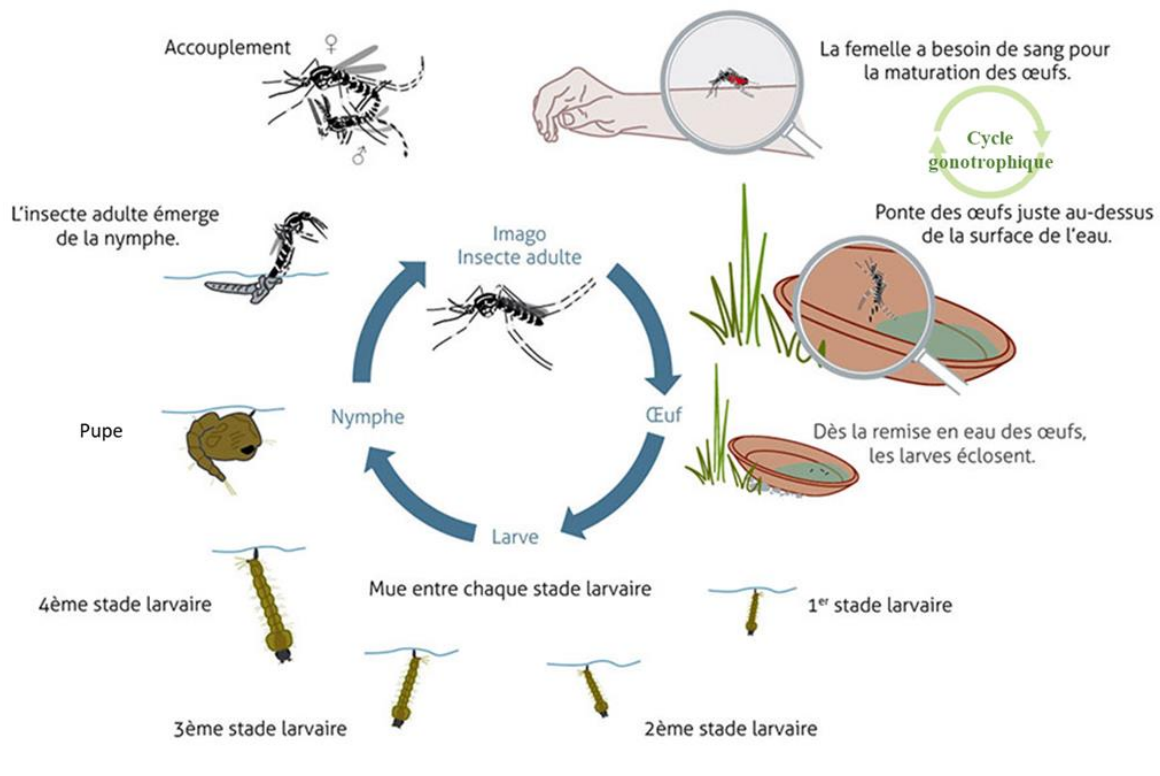


Figure 25. Cycle de développement du moustique *Ae. albopictus*. (Adapté de I. Schleip, Biogents)



Figure 26. Photographies des stades pré-imaginaux du moustique *Ae. albopictus*. (A) Œufs d'*Ae. albopictus* (environ 0,5 mm de longueur). Les femelles pondent en général 40 à 80 œufs par oviposition. (B) Larves d'*Ae. albopictus*. (C) Nymphe d'*Ae. albopictus*.

3.2.2. Description morphologique

Au stade adulte, le corps du moustique se constitue de trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen. Les moustiques sont munis de trois paires de pattes (caractéristiques de la classe

des insectes) et d'une paire d'ailes membraneuse (caractéristique de l'ordre des diptères) fixées au thorax (Figure 27). Au niveau de la tête, se trouvent les principaux organes sensoriels : les yeux, les antennes et les pièces buccales. Les antennes des mâles se distinguent de celles des femelles par la présence de soies longues donnant aux antennes des mâles un aspect velu. Les pièces buccales diffèrent aussi entre les deux sexes ; elles sont de type piqueur-suceur chez la femelle et de type suceur chez le mâle. En effet, afin de pouvoir percer la peau de leurs hôtes, les femelles possèdent un proboscis plus long et rigide que celui des mâles qui se nourrissent uniquement de nectars végétaux. Un dimorphisme sexuel s'observe également sur la partie distale de l'abdomen qui est en biseau chez la femelle et en forme de « w » chez le mâle. L'abdomen est composé de 10 segments liés latéralement par des membranes souples permettant entre autres la respiration par les spiracles et la distorsion de l'abdomen de la femelle lors de la prise d'un repas sanguin. L'anatomie interne de l'abdomen se compose de l'appareil digestif qui occupe la majeure partie de la cavité générale du moustique et des organes reproducteurs et excréteurs. La paire de glandes salivaires est située au niveau du thorax (Figure 27). La majeure partie du corps des moustiques est recouverte d'écailles qui constituent un caractère d'identification des espèces. Le moustique *Ae. albopictus* est facilement reconnaissable par sa couleur noire et la présence d'une ligne médiane d'écailles blanches sur la partie dorsale de son thorax (Figure 28). D'autres motifs distinctifs ayant une apparence « tigrée » sont présents sur plusieurs segments du corps d'*Ae. albopictus*, ce qui lui a valu son nom commun de moustique tigre. La taille d'*Ae. albopictus* varie entre 3,5 et 8 mm (Skuse, 1899). Les mâles sont généralement plus petits que les femelles.

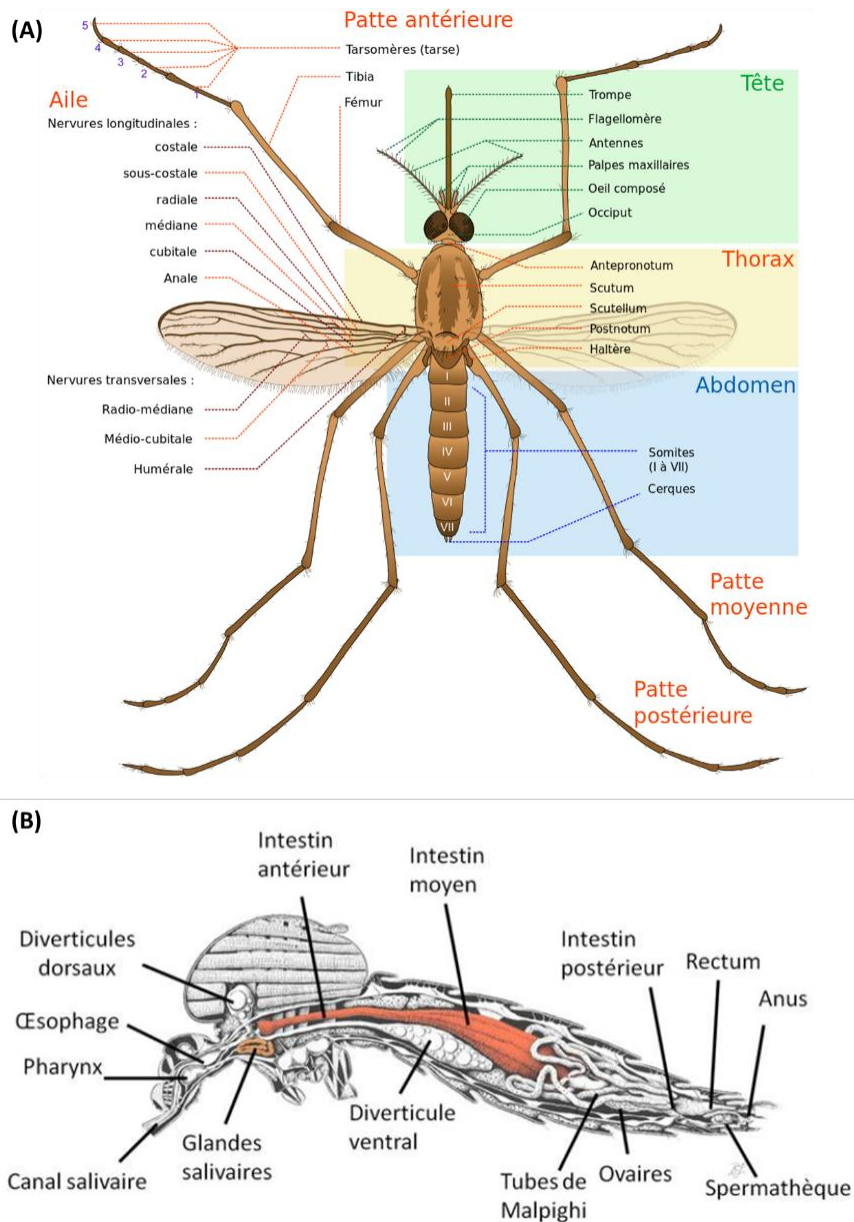


Figure 27. Anatomie d'une femelle de moustique. Vue externe (A) et interne (B) ((Jobling, 1987); Colorisé à l'Institut Pasteur).



Figure 28. Photographie du moustique *Ae. albopictus*. De la gauche vers la droite, les images correspondent à (i) une femelle *Ae. albopictus*, (ii) une femelle *Ae. albopictus* prenant un repas de sang et (iii) un mâle *Ae. albopictus*.

3.2.3. Traits de vie du moustique *Ae. albopictus*

Moustique forestier à l'origine, *Ae. albopictus* s'est progressivement adapté aux contraintes écologiques et à l'anthropisation de l'environnement en subissant un processus de « domestication ». Aujourd'hui, la capacité d'*Ae. albopictus* à se reproduire au sein de gîtes naturels et artificiels lui permet de coloniser une multitude d'habitats allant des lisières forestières aux zones rurales et urbaines (Bonizzoni, Gasperi, Chen, & James, 2013). *Ae. albopictus* est une espèce opportuniste pouvant piquer une large variété d'hôtes vertébrés incluant l'Homme, les oiseaux, les reptiles, les amphibiens, etc. (Delatte et al., 2010; Richards, Ponnusamy, Unnasch, Hassan, & Apperson, 2006). Ce trophisme généraliste, diversifie les niches écologiques occupables par *Ae. albopictus*, augmente l'éventail d'agents pathogènes auxquels il peut être exposé et en fait un potentiel « vecteur pont » capable d'assurer le transfert d'agents pathogènes des animaux (sauvages ou domestiques) à l'Homme. En revanche, cette même caractéristique réduit la capacité vectorielle d'*Ae. albopictus* en comparaison à d'autres moustiques comme *Ae. aegypti* qui ne se nourrit presque qu'exclusivement sur l'Homme (88% de repas sanguin d'origine humaine chez *Ae. aegypti* versus 49% chez *Ae. albopictus*) (Richards et al., 2006; Sivan, Shriram, Sunish, & Vidhya, 2015). En effet, lorsqu'un moustique prélève un agent infectieux sur un humain puis pique un animal non réceptif, le cycle de transmission est interrompu. Il s'avère néanmoins que lorsque le choix est possible, *Ae. albopictus* se gorge préférentiellement sur l'Homme (Delatte et al., 2010; Kamgang, Nchoutpouen, Simard, & Paupy, 2012).

La femelle pique de jour avec deux pics d'agressivité, à l'aube et au crépuscule. Bien que les femelles d'*Ae. albopictus* soient parfois retrouvées en intérieur, elles sont généralement considérées comme étant exophages (prise du repas sanguin en extérieur) et exophiles (repos après le repas de sang à l'extérieur des habitations humaines dans des abris naturels) (Delatte et al., 2010; Paupy, Delatte, Bagny, Corbel, & Fontenille, 2009). *Ae. albopictus* est une espèce multivoltine avec environ 5-17 générations par année (Gatt, Deeming, & Schaffner, 2009). La distance de vol maximale du moustique est de l'ordre de la centaine de mètres (200-800 m) (Honorio et al., 2003). À l'instar d'autres groupes d'insectes, *Ae. albopictus* héberge une variété de microorganismes (bactéries, champignons, virus, etc.) avec lesquels il entretient des relations symbiotiques (Guegan et al., 2018). Les populations d'*Ae. albopictus* sont naturellement infectées par deux souches de la bactérie *Wolbachia pipientis*, *wAlbA* et *wAlbB* (Zouache et al., 2009). Ces bactéries jouent un rôle important dans la biologie d'*Ae. albopictus*, en particulier

dans l'incompatibilité cytoplasmique² et la compétence vectorielle (Dobson, Marsland, & Rattanadechakul, 2001; Mousson et al., 2012). Des études sur des moustiques capturés dans la nature montrent la présence chez *Ae. albopictus* d'autres bactéries membres des genres *Asaia*, *Acinetobacter*, *Bacillus* et *Pantoea* (Minard et al., 2013; Valiente Moro, Tran, Raharimalala, Ravelonandro, & Mavingui, 2013; Zouache et al., 2011). Au sein d'une même espèce de moustique, chaque population peut évoluer et s'adapter aux contraintes environnementales de son milieu. L'aptitude à modifier certains traits de vie est une caractéristique majeure du potentiel invasif d'une espèce. Les populations d'*Ae. albopictus* de régions tempérées ont développé la capacité de résister aux températures froides en produisant des œufs pouvant entrer en diapause durant la saison hivernale (Hawley, 1988; Nawrocki & Hawley, 1987). En région tempérée, *Ae. albopictus* présente donc une activité saisonnière (de mai à novembre en France) tandis que les populations tropicales, ne passant pas par une phase de diapause, sont actives tout au long de l'année. Toutefois, des études de surveillance menées en Italie ont montré des signes d'acclimatation au froid des moustiques adultes avec des femelles restant actives durant l'hiver (Romi, Severini, & Toma, 2006). *Ae. albopictus* partage des niches écologiques avec plusieurs espèces de moustiques avec lesquelles il entretient des interactions compétitives. Ces interactions compétitives sont fortement influencées par le contexte environnemental et peuvent mener à l'exclusion de l'une des espèces ou à leur cohabitation (Lounibos et al., 2010; Paupy et al., 2009). Dans de nombreux contextes, *Ae. albopictus* tendrait à avoir un avantage compétitif vis-à-vis d'un certain nombre d'autres espèces de moustiques, incluant *Ae. aegypti* (Braks, Honório, Lounibos, Lourenço-de-Oliveira, & Juliano, 2004), *Ae. japonicus* (Armistead, Arias, Nishimura, & Lounibos, 2008) et *Cx. pipiens* (Costanzo, Mormann, & Juliano, 2005). L'aménagement du territoire et particulièrement, l'urbanisation sont des facteurs importants pouvant augmenter la supériorité compétitive d'*Ae. albopictus* vis-à-vis d'autres populations de moustiques en fournissant des habitats artificiels propices à son développement, et facilitant

² Incompatibilité cytoplasmique (IC) : Stérilité produite par des croisements entre insectes de la même espèce ayant des statuts infectieux différents d'endosymbiontes tels que les bactéries du genre *Wolbachia*. L'IC peut-être uni- ou bi-directionnelle. L'IC unidirectionnelle est généralement exprimée lorsqu'un mâle infecté s'accouple avec une femelle non infectée tandis que l'IC bidirectionnelle se produit généralement lors d'accouplements entre individus hébergeant des souches de *Wolbachia* différentes (cas d'*Ae. albopictus* naturellement infecté par les souches de *Wolbachia*, *wAlbA* et *wAlbB*) (Zabalou et al., 2004).

ainsi l'implantation du moustique dans de nouvelles zones au détriment d'espèces locales (Leisnham & Juliano, 2012).

3.3. Origine et distribution géographique

Originnaire d'Asie du Sud-Est, le moustique *Ae. albopictus* est une espèce invasive qui, au cours des trois dernières décennies, s'est largement propagée hors de ses territoires d'origine (Bonizzoni et al., 2013). Le succès de l'invasion d'*Ae. albopictus* est principalement lié à la grande plasticité écologique et physiologique de l'espèce, lui permettant une adaptation rapide à de nouveaux environnements, mais aussi à des facteurs anthropiques comme l'intensification des échanges internationaux (Duvallet et al., 2017). La faible diversité génétique entre les différentes populations du moustique est en cohérence avec une expansion induite par les activités humaines (Bonizzoni et al., 2013). La dispersion du moustique sur de nouveaux continents se fait *via* le transport involontaire (transport aérien, routier et maritime) des œufs dont les propriétés leur permettent de voyager sur de longues distances dans des récipients asséchés (pontes dans des pneus usagés, des plantes, notamment les « *lucky bamboo* », etc.). Aujourd'hui, *Ae. albopictus* est présent sur les cinq continents (Benedict, Levine, Hawley, & Lounibos, 2007; Bonizzoni et al., 2013) (Figure 29). Il est le moustique qui s'est le plus largement répandu au cours des dernières décennies et est classé parmi les 100 espèces animales exotiques les plus invasives (*Invasive Species Specialist Group* ; (ISSG)). L'espèce *Ae. albopictus* est décrite pour la première fois en 1894 en Inde par l'entomologiste britannique Frederick A. Askew Skuse (Skuse, 1899). Jusqu'au début du XX^e siècle sa répartition se limitait à l'Asie du Sud-Est et aux îles de l'océan Indien et du Pacifique Ouest (Gratz, 2004). À la fin des années 1970, *Ae. albopictus* débute sa phase d'expansion vers de nouveaux continents. Il est signalé pour la première fois sur le continent américain en 1983 dans l'État du Tennessee (États-Unis) (Paul Reiter & Darsie JR, 1984). La source d'introduction serait liée au commerce de pneus en provenance d'Asie du Nord où les populations du moustique sont adaptées au climat tempéré (Moore & Mitchell, 1997; P. Reiter, 1998). Les années suivantes, le moustique envahit de nouveaux états aux États-Unis et est rapporté dans plusieurs pays d'Amérique Centrale, d'Amérique du Sud et de la Caraïbe (Bonizzoni et al., 2013) en commençant par le Brésil en 1986 (Forattini, 1986) et le Mexique en 1988 (Ortega-Morales et al., 2018). En Afrique, des larves d'*Ae. albopictus* ont été identifiées pour la première fois en 1989 dans la ville portuaire du Cap en Afrique du Sud ; l'introduction du moustique y fut rapidement

contrôlée (Cornel & Hunt, 1991). Deux ans après, le moustique est repéré au Nigeria et s'étend aux régions voisines (Bonizzoni et al., 2013; Savage, Ezike, Nwankwo, Spiegel, & Miller, 1992). En Europe, la présence d'*Ae. albopictus* est rapportée dès 1979, dans plusieurs localités d'Albanie (Adhami & Reiter, 1998). L'espèce aurait probablement été introduite à partir de la Chine au milieu des années 1970 et se serait dispersée dans le pays *via* le transport de pneus infestés. Il s'agissait là de la première implantation du moustique en dehors de son aire de répartition d'origine (Adhami & Reiter, 1998). Les conditions géopolitiques de l'époque, avec des échanges restreints entre l'Albanie communiste et le reste de l'Europe, ont permis de circonscrire la propagation du moustique. Cependant, sa dissémination ailleurs dans le monde constitue autant de sources potentielles d'introduction. En 1990, l'Italie est le premier pays européen après l'Albanie à signaler la présence du moustique *Ae. albopictus* sur son territoire (Sabatini et al., 1990). Rapidement, le moustique s'implante et s'étend progressivement à de nouvelles régions d'Italie, suggérant que les populations introduites étaient probablement déjà adaptées au climat tempéré (Romi, 1995, 2001). Entre 1988 et 1995, l'Italie procédait à des échanges commerciaux de pneus avec les États-Unis, le Japon et Taïwan (P. Reiter, 1998). Des investigations ont démontré qu'au moins une des sources du moustique était une cargaison de pneus usagés importée de Géorgie (États-Unis) (Dalla Pozza, Romi, & Severini, 1994). La forte proximité génétique entre des populations italiennes et américaines d'*Ae. albopictus*, soutient l'hypothèse d'une origine américaine des populations italiennes. Cette étude montre également que les populations provenant de régions tempérées (États-Unis, Italie et Japon) forment un cluster génétique distinct de celui d'une population provenant d'une région tropicale (Indonésie), suggérant une base génétique des capacités d'adaptation au climat tempéré (Urbanelli, Bellini, Carrieri, Sallicandro, & Celli, 2000). Successivement, la présence d'*Ae. albopictus* est signalée dans d'autres pays européens : en France en 1999 (Schaffner & Karch, 2000), en Belgique en 2000 (Schaffner, Van Bortel, & Coosemans, 2004), en Suisse en 2003 (Flacio et al., 2004), en Espagne en 2004 (Aranda, Eritja, & Roiz, 2006), aux Pays-Bas en 2005 (E.-J. Scholte et al., 2007), en Allemagne en 2007 (Pluskota, Storch, Braunbeck, Beck, & Becker, 2008) et dans plusieurs pays des Balkans (E. Scholte & Schaffner, 2007). Aujourd'hui, *Ae. albopictus* est implanté sur toute la partie nord du bassin méditerranéen (Figure 30) et l'Italie est le pays le plus lourdement infesté (Medlock et al., 2012). L'introduction du moustique n'aboutit pas toujours à son implantation ; de nombreux facteurs comme l'origine de la population et les mesures de contrôle sanitaire mises en place localement définissent la capacité d'une population importée à s'implanter. En France, les premières introductions du

moustique, en provenance probable des États-Unis ou du Japon, ont vite été contrôlées par la mise en place de programmes d'éradication (E. Scholte & Schaffner, 2007). Suite à des introductions répétées sur le territoire français, c'est finalement en 2004 qu'*Ae. albopictus* s'implante définitivement dans le sud-est de la France à la frontière italienne (Delaunay, Jeannin, Schaffner, & Marty, 2009). Le moustique entame alors une colonisation progressive du pays jusqu'à envahir aujourd'hui plus de la moitié du territoire. Désormais, l'espèce est implantée dans 64 départements (sur les 96 départements de l'hexagone) y compris au nord, en Île-de-France et dans le département de l'Aisne (Ministère des Solidarités et de la Santé, (2021b)) (Figure 31). D'année en année, *Ae. albopictus* élargit sa répartition, avec une migration vers le nord repoussant les limites initiales liées au climat froid (M. U. Kraemer et al., 2015). La distribution géographique du moustique doit sans cesse être révisée. Les scénarios de propagation du moustique suggèrent qu'*Ae. albopictus* continuera son expansion en particulier sous l'effet des prédictions de changements climatiques (Benedict et al., 2007; ECDC, 2009; Fischer, Thomas, Neteler, Tjaden, & Beierkuhnlein, 2014; M. U. G. Kraemer et al., 2019). Les conditions climatiques en Europe risquent de devenir de plus en plus favorables à *Ae. albopictus* avec une augmentation du risque d'implantation dans le nord de l'Europe et une légère diminution de ce risque dans le Sud (Caminade et al., 2012).

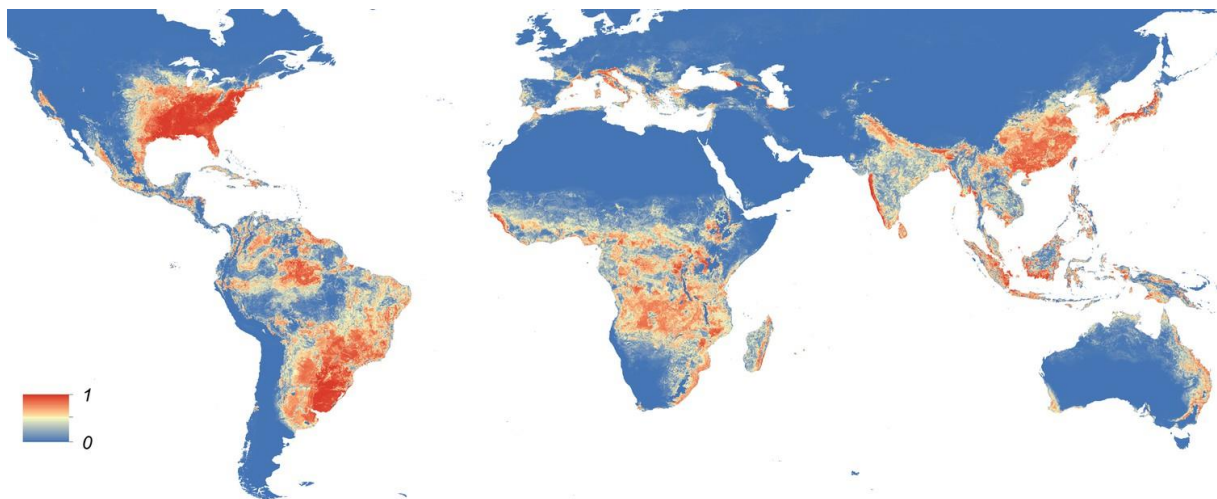


Figure 29. Distribution mondiale prédictive du moustique *Ae. albopictus*. La probabilité de présence du moustique est indiquée par un gradient de couleur allant du bleu (faible probabilité de présence) au rouge (forte probabilité de présence). Ces prévisions reposent sur des données mondiales de détection de l'espèce combinées à des informations de variables environnementales comme la température. Cette carte datant de 2015, montre qu'*Ae. albopictus*

peut se retrouver à la fois dans les régions tropicales et tempérées du globe (M. U. Kraemer et al., 2015).

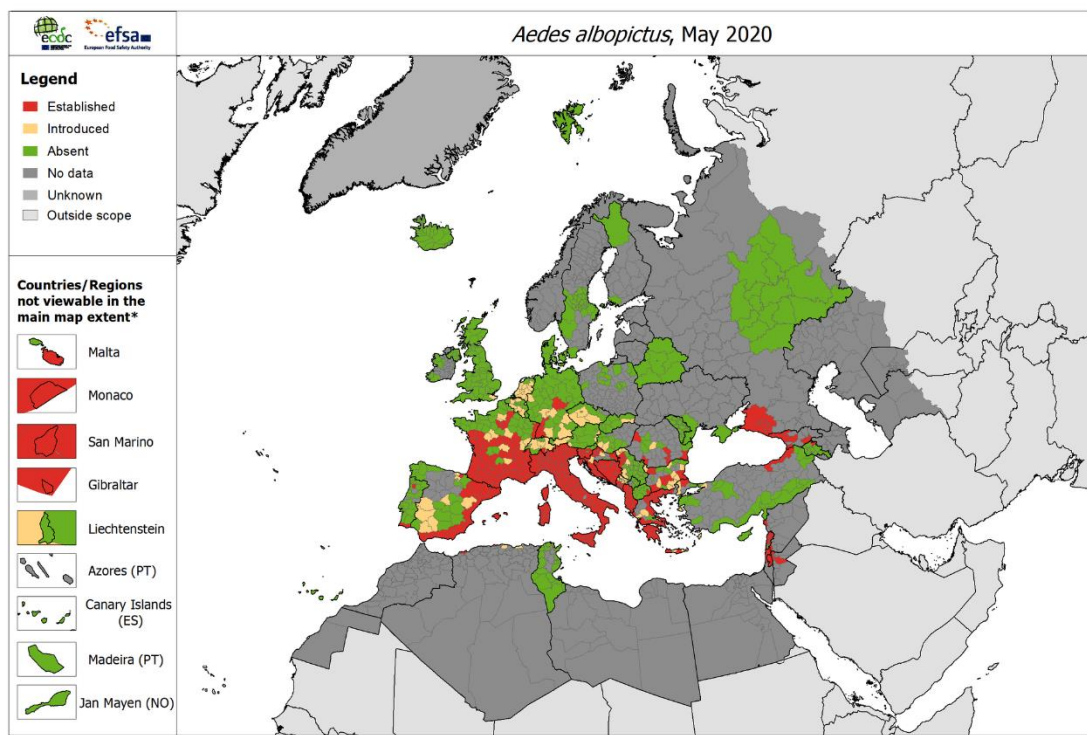


Figure 30. Carte de répartition du moustique *Ae. albopictus* en Europe. Les zones où le moustique est implanté sont indiquées par la couleur rouge, celles où il a été introduit et détecté par intermittence sont en jaune et enfin les zones où le moustique n'a jamais été détecté sont en vert (ECDC, 2020a). Les critères du statut du moustique sont définis par l'ECDC comme : Etablis (*established*) : preuves de reproduction et d'hivernage de l'espèce observées dans au moins une municipalité de l'unité administrative ; Introduit (*introduced*) : l'espèce a été détectée (mais sans établissement confirmé) au sein de l'unité administrative ; Absent : des enquêtes de terrain ont été menées, mais l'espèce n'a pas été détectée au sein de l'unité administrative.

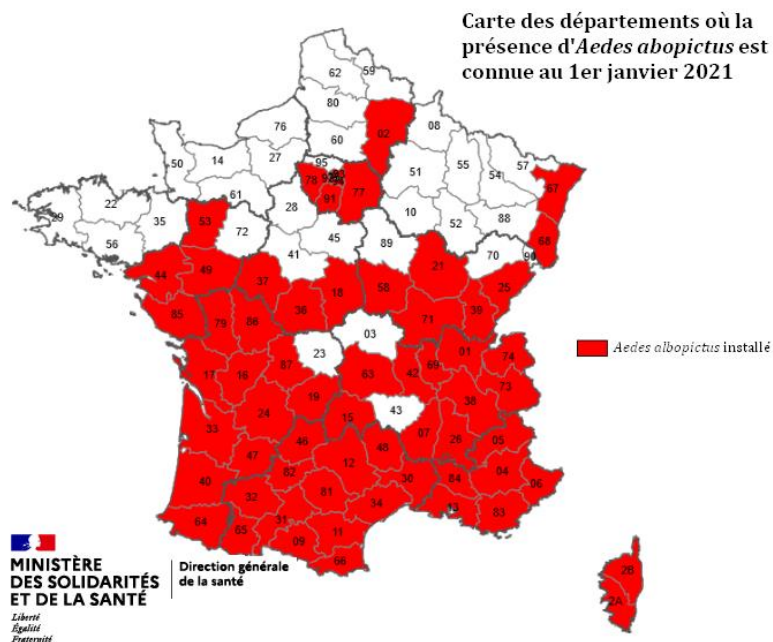


Figure 31. Carte de répartition du moustique *Ae. albopictus* en France (Ministère des Solidarités et de la Santé, (2021b)).

3.4. Importance médicale et mesures sanitaires

Une fois implanté, *Ae. albopictus* peut être la source de nuisances liées notamment aux réactions allergiques provoquées par les piqûres, mais c'est néanmoins son potentiel de vecteur d'agents pathogènes humains qui inquiète le plus les autorités sanitaires. En entomologie médicale et vétérinaire, le terme vecteur désigne tout arthropode hématophage capable d'assurer la transmission biologique active d'un agent infectieux d'un vertébré à un autre (Didier Fontenille, Lagneau, Lecollinet, & Robin, 2009). *Ae. albopictus* est le vecteur avéré de plusieurs arbovirus (DENV, ZIKV et CHIKV) et de filaires (*Dirofilaria spp.*) (Cancrini et al., 2003; Medlock et al., 2015). Il a été reconnu comme unique ou principal vecteur lors d'épidémies de dengue au Japon (1942/1944), aux Seychelles (1977), à La Réunion (1977 et 2004), en Chine (1978), aux Maldives (1981), à Hawaï (2001) et plus récemment, au Gabon (2007 et 2010) et à l'île Maurice (2009) (Kobayashi, Nihei, & Kurihara, 2002; Lambrechts, Scott, & Gubler, 2010; Lew, Tsai, & Wang, 2018; Paupy et al., 2010; Ramchurn, Moheput, & Goorah, 2009; P. Reiter, Fontenille, & Paupy, 2006; F. Wu et al., 2011). Toutefois, son rôle en tant que vecteur du DENV reste secondaire si le vecteur principal *Ae. aegypti* est abondant (Paupy et al., 2009). L'implication d'*Ae. albopictus* dans la transmission du CHIKV a également été longtemps minimisée par rapport à celle d'*Ae. aegypti*. Cependant, depuis l'importante épidémie de

chikungunya en 2005-06 dans les îles de l'océan Indien, avec *Ae. albopictus* comme seul ou principal vecteur, le potentiel vectoriel du moustique pour le CHIKV n'est plus à démontrer (de Lamballerie et al., 2008; Vazeille et al., 2007). En 2007 puis en 2010, *Ae. albopictus* est responsable d'une épidémie de chikungunya au Gabon ; son implication dans d'autres épidémies d'Afrique centrale, où *Ae. albopictus* a progressivement supplanté *Ae. aegypti*, est fortement suspectée (de Lamballerie et al., 2008; Leroy et al., 2009; Paupy et al., 2010). En Europe, où *Ae. aegypti* est absent, *Ae. albopictus* a été à l'origine de cas de transmission du CHIKV, du DENV et du ZIKV (ECDC, 2019, 2020b, 2020c). La capacité d'*Ae. albopictus* à coloniser des habitats urbains et forestiers ainsi que son trophisme généraliste suggère que le moustique pourrait servir de vecteur « pont » susceptible de transférer des agents pathogènes des animaux, incluant les réservoirs sauvages d'arbovirus, à l'Homme (Pereira-Dos-Santos, Roiz, Lourenco-de-Oliveira, & Paupy, 2020; Pereira Dos Santos et al., 2018). Ces interactions entre *Ae. albopictus* et la faune sauvage pourraient être à l'origine de l'émergence de nouveaux agents pathogènes ou de nouvelles souches d'agents pathogènes déjà présents chez l'Homme. En laboratoire, les études de compétence vectorielle montrent qu'*Ae. albopictus* est capable de transmettre au moins 26 arbovirus appartenant à cinq familles virales différentes ; cela inclut le WNV, le JEV, le RVFV et le YFV (Amraoui, Vazeille, & Failloux, 2016; Bonizzoni et al., 2013; Brustolin et al., 2017; Mitchell, Miller, & Gubler, 1987; Sardelis, Turell, O'Guinn, Andre, & Roberts, 2002; Weng, Lien, Wang, Wu, & Chin, 1997). Un certain nombre de ces virus ont été détectés chez des moustiques *Ae. albopictus* capturés dans la nature (Paupy et al., 2009). Il est à noter cependant que la détection de ces virus de même que les études de compétence vectorielle ne démontrent pas à elles seules le statut de vecteur du moustique en conditions naturelles. Ces données doivent être complétées par des données de terrain liées à des épidémies et à la bioécologie de l'arthropode suspecté (p. ex. la fréquence des contacts entre l'arthropode et l'hôte vertébré) (Duvallet et al., 2017). À ce jour, le rôle de vecteur d'arbovirus d'*Ae. albopictus* a été reconnu uniquement pour le DENV, le CHIKV et le ZIKV (Grard et al., 2014; Paupy et al., 2009).

Une fois établi, il est très difficile voire impossible d'éradiquer *Ae. albopictus*. La mise en place de dispositifs de surveillance et de contrôle entomologiques est indispensable afin de limiter l'impact sanitaire du moustique. La lutte antivectorielle vise à limiter le risque de transmission d'arbovirus en réduisant les densités de populations de moustiques. Les moyens de lutte contre *Ae. albopictus* reposent en premier lieu sur la destruction ou la protection des points d'eau pouvant servir de gîtes larvaires. Cette méthode fait appel à une mobilisation collective (p. ex.

suppression des collections d'eau stagnante chez soi) et nécessite l'élaboration, en amont, de plans d'urbanisation limitant les risques de formation des gîtes. En complément, des composés chimiques larvicides (Téméphos, pyriproxifène...) peuvent être utilisés afin de réduire plus efficacement les populations larvaires. Toutefois, en raison d'une écotoxicité importante, plusieurs molécules sont désormais interdites en France (Lapied et al., 2011). L'agent bactérien *Bacillus thuringiensis serovariety israelensis* (Bti), induisant la mort des larves de moustiques par la libération d'une toxine, est actuellement le larvicide le plus largement utilisé dans de nombreux pays (Lacey, 2007; Lapied et al., 2011). L'efficacité de ce traitement sur la réduction de densité d'*Ae. albopictus* ainsi que sur la transmission d'arbovirus a clairement été démontrée (Ahmad Zaki, Che Dom, & Ahmed Alhothily, 2020; Tan et al., 2012). Lorsque la lutte larvicide échoue, dans un contexte de risque sanitaire, une lutte adulticide peut être déployée au moyen de pulvérisations d'insecticides (Famille des pyréthrinoïdes, principalement la deltaméthrine en France) (Lapied et al., 2011). Les insecticides permettent une élimination rapide et massive des moustiques, toutefois l'apparition de résistance chez certaines populations d'*Ae. albopictus*, réduisent l'efficacité de ces traitements (Lapied et al., 2011; Pichler et al., 2018; Ponlawat, Scott, & Harrington, 2005; L. B. Smith, Kasai, & Scott, 2016). Des stratégies de lutte alternatives visant à supprimer ou remplacer (par des populations réfractaires à la transmission d'arbovirus) les populations sauvages incluent : l'utilisation de prédateurs (p. ex. poissons, copépodes, insectes larvivores), de champignons entomopathogènes, de bactéries endosymbiotiques exogènes (blocage de la transmission d'arbovirus et perturbation des capacités reproductives par incompatibilité cytoplasmique) et de moustiques stérilisés ou génétiquement modifiés (transgénèse et paratransgénèse) (Bellini, Medici, Puggioli, Balestrino, & Carrieri, 2013; M. S. Blagrove, Arias-Goeta, Di Genua, Failloux, & Sinkins, 2013; M. S. Blagrove, Arias-Goeta, Failloux, & Sinkins, 2012; Dieng, Boots, Tuno, Tsuda, & Takagi, 2002; J. Y. Lee et al., 2019; McGraw & O'Neill, 2013; Shaalan & Canyon, 2009; Terenius, Marinotti, Sieglaff, & James, 2008). Certaines de ces techniques n'en sont encore qu'à leurs débuts, en particulier avec *Ae. albopictus*, mais représentent déjà des alternatives prometteuses. En France, la mission de veille et de contrôle du moustique *Ae. albopictus* est confiée par le ministère de la Santé, à l'Agence nationale pour la démoustication et la gestion des espaces naturels démoustiqués (Delaunay et al., 2009). Le dispositif de surveillance s'organise autour de trois grands axes : (i) l'identification des zones de présence du moustique, (ii) la détection précoce des cas humains de maladies liées aux agents pathogènes qu'il transmet et (iii) la sensibilisation des personnes résidant en zones infestées (suppression des gîtes larvaires et moyens de

protection individuelle). Lors du signalement d'un cas humain de maladie vectorielle, une enquête entomologique est menée et des opérations de lutte antivectorielle sont réalisées autour du domicile du malade. Afin de réduire l'impact écologique et le risque d'apparition de résistances aux traitements, il n'existe pas en France d'actions systématiques de démoustication hors contexte épidémique (Ministère des Solidarités et de la Santé,(2021a)).

Chapitre 4

Systeme vectoriel et facteurs environnementaux



Ce chapitre, vise à replacer les acteurs du système vectoriel dans leur contexte environnemental. Il se compose de deux sections. Les facteurs environnementaux affectant la transmission vectorielle sont décrits dans la première section, avec une attention particulière portée aux facteurs climatiques, qui dans le contexte actuel de changement climatique, suscitent beaucoup de débats. La deuxième section est une revue bibliographique de l'effet de la température sur la transmission des arbovirus par les moustiques.

4. Chapitre 4 : Système vectoriel et facteurs environnementaux

4.1. Épidémiologie analytique des maladies à transmission vectorielle

L'épidémiologie analytique est l'étude des facteurs influençant la survenue des maladies au sein d'une population. Elle vise à établir des relations de causalité entre l'exposition à certains facteurs et l'apparition ultérieure de maladies ou évènements de santé. La question posée ici est « pourquoi ? ». En entomologie médicale, la réponse à cette question est souvent particulièrement complexe du fait de la dimension vectorielle des maladies concernées par la discipline. La triade vectorielle est constituée de trois acteurs biologiques : l'agent infectieux, son (ses) vecteur(s) et son (ses) hôte(s) vertébré(s). Cette triade s'inscrit dans un contexte environnemental, dont la prise en compte définit le système vectoriel (Duvallet et al., 2017) (Figure 32). Le succès d'un système, c'est-à-dire la transmission de l'agent pathogène, résulte de la rencontre et la compatibilité entre les différents acteurs de la triade dans un environnement donné (Duvallet et al., 2017). Chaque acteur de la triade vectorielle est représenté par des populations dont les propriétés biologiques et la diversité génétique leur permettent d'évoluer et de s'adapter aux éléments biotiques et abiotiques de leur environnement. Les mécanismes de résistance aux insecticides des moustiques sont un bon exemple du caractère flexible et évolutif du système vectoriel ; le vecteur s'adapte à l'environnement hostile imposé par l'Homme ce qui permet le maintien du cycle de transmission (Dusfour et al., 2019).

Les facteurs environnementaux sont multiples et impactent le système vectoriel selon des modalités tout aussi diverses, en créant un environnement plus ou moins favorable à la transmission vectorielle. Ils modifient le risque de transmission en affectant les paramètres clés de la capacité vectorielle (vue à la section 1.3.3.2 du chapitre 1) tels que la disponibilité de l'hôte et la densité, la survie, le comportement de pique et la compétence vectorielle des vecteurs.

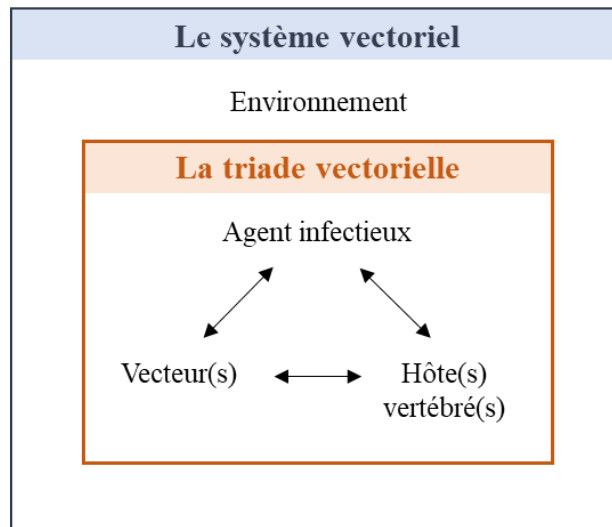


Figure 32. Triade vectorielle et système vectoriel. Le système vectoriel englobe la triade vectorielle et son environnement (reproduit de (Duvallet et al., 2017) p.55). Le bon fonctionnement du système requiert : un vecteur en contact fréquent avec l’hôte vertébré et en densité suffisante, une compatibilité entre l’agent pathogène et le vecteur permettant la transmission optimale du pathogène dans des délais compatibles avec la durée de vie du vecteur (PIE courte), des hôtes vertébrés sensibles à l’infection (virémie forte) et en densité suffisante (aussi bien la fraction infectée que la fraction réceptive) et enfin, des conditions environnementales propices à la survie/développement des acteurs de la triade vectorielle. L’ensemble de ces paramètres est réuni dans le concept de capacité vectorielle, vu dans le premier chapitre.

4.1.1. Les facteurs biotiques

Les facteurs biotiques regroupent l’ensemble des influences entre organismes vivants au sein d’un écosystème. Il peut s’agir de prédation, de compétition intra- et inter-spécifique, de parasitisme (parasites entomopathogènes), de la disponibilité et de la qualité des ressources alimentaires, etc. Le régime alimentaire est un facteur important pouvant affecter de nombreux traits de vie du moustique (longévité, fréquence des piqûres, sensibilité aux infections, etc.) et ainsi influencer leur capacité à transmettre des agents pathogènes (Carvajal-Lago, Ruiz-Lopez, Figuerola, & Martinez-de la Puente, 2021). Une étude récente a montré que des moustiques *Anopheles coluzzi* abreuvés de nectar de papaye vivaient plus longtemps et avaient de meilleurs taux d’accouplement que ceux abreuvés de nectar de banane (Nignan et al., 2020). De plus, des moustiques *Cx. pipiens* nourris avec des solutions faibles en sucre (2% et 10%) étaient plus susceptibles de transmettre le WNV que ceux nourris avec des concentrations plus élevées de

sucres (40%) (Vaidyanathan et al., 2008). La présence de prédateurs détermine l'abondance et la distribution des moustiques (Shalan & Canyon, 2009; Zuharah & Lester, 2010). Cependant, l'efficacité de ces prédateurs peut elle-même être modulée par un certain nombre de facteurs, notamment les activités humaines (Schrama et al., 2020).

Les facteurs anthropiques. L'épidémiologie actuelle des maladies vectorielles est fortement liée aux changements économiques, sociétaux et démographiques qu'a connus le monde au cours du dernier siècle (E. Gould, Pettersson, Higgs, Charrel, & de Lamballerie, 2017; Gubler, 2002; Kilpatrick & Randolph, 2012). La modernisation des transports et l'intensification des échanges internationaux (voyages et commerce) ont offert aux agents pathogènes des moyens rapides de dissémination leur permettant d'être introduits dans de nouvelles régions *via* le déplacement de personnes ou d'animaux infectés (Hufnagel, Brockmann, & Geisel, 2004). L'introduction et l'établissement des agents pathogènes à transmission vectorielle se déroulent dans un contexte préalable de siècles de vague de dispersions des vecteurs, également facilités par les transports et les échanges intercontinentaux (M. U. G. Kraemer et al., 2019). En parallèle, l'évolution des pratiques agricoles (intensification, utilisation d'engrais et de pesticides, etc.) et la déforestation en réponse au développement industriel, à l'urbanisation et à la croissance démographique ont, en altérant les écosystèmes, créé des conditions propices à la domestication et la pullulation des moustiques (Darriet, 2014; E. Gould et al., 2017; Kibuthu, Njenga, Mbugua, & Muturi, 2016). Par conséquent, les populations vivant en contact étroit avec des populations de moustiques de plus en plus denses ont créé les conditions idéales pour une augmentation de l'incidence des maladies associées aux moustiques (Gubler, 1996). Par ailleurs, de nombreux facteurs tels que la mauvaise gestion des déchets (décharges sauvages), les systèmes d'irrigation inadéquats, l'inefficacité des campagnes de lutte antivectorielle, la densification des populations, les difficultés à faire adhérer les populations à risque aux méthodes de prévention, le manque de fiabilité des systèmes de santé ainsi que l'absence de traitements spécifiques et de vaccins ont également contribué à la modification de l'épidémiologie des maladies vectorielles. Au final, l'effet combiné des changements écologiques, démographiques et sociétaux s'est illustré par une expansion progressive d'arbovirus tel que le DENV, le CHIKV et le ZIKV au travers de flambées épidémiques à l'échelle mondiale (E. Gould et al., 2017).

4.1.2. Les facteurs abiotiques

Les facteurs abiotiques correspondent à l'ensemble des paramètres physico-chimiques d'un écosystème : c'est l'action du non-vivant sur le vivant. Ils regroupent une variété de facteurs incluant entre autres des facteurs chimiques, topographiques et climatiques. En ce qui concerne les maladies à transmission vectorielle, les facteurs climatiques sont les plus étudiés.

Les facteurs climatiques. En raison du caractère saisonnier de nombreuses maladies à transmission vectorielle, une dépendance étroite entre la survenue de ces maladies et le climat a très vite été admise (Altizer et al., 2006; Grassly & Fraser, 2006; Lord, 2004). La pluviosité, la photopériode, la température et l'humidité sont des variables climatiques importantes qui affectent de manière directe ou indirecte divers aspects de la biologie des vecteurs, notamment leur développement, survie, longévité, distribution, saisonnalité, mais aussi la réplication et la transmissibilité des pathogènes (Costanzo, Schelble, Jerz, & Keenan, 2015; Young, 2018). La pluviosité intervient dans la formation et la persistance des gîtes larvaires et par conséquent, conditionne les densités de moustiques (Fouque & Reeder, 2019; Ho, Chan, & Chan, 1971). Elle peut également augmenter la densité de la végétation, avec une influence sur les gîtes de repos du moustique. Des études ont mis en évidence une corrélation positive entre les précipitations et l'incidence du chikungunya en Inde (Shil, Kothawale, & Sudeep, 2018) et celle de la dengue aux Philippines (Su, 2008). L'humidité est un facteur connu pour favoriser la survie des moustiques et par conséquent, la probabilité qu'ils servent de vecteurs (Schmidt, Comeau, Monaghan, Williamson, & Ernst, 2018). Au Vietnam, il a été démontré que les épidémies de dengue étaient étroitement liées aux hausses de précipitation et d'humidité. Cette étude montre que le risque épidémique de la dengue augmente de 1% pour chaque augmentation de 50 mm de pluie et 1% d'humidité (Xuan le, Van Hau, Thu do, & Toan do, 2014). La photopériode est un autre paramètre qui affecte profondément les traits de vie des moustiques (Costanzo et al., 2015). Chez *Ae. albopictus*, la diminution de la photopériode en automne induit la production, par les femelles, d'œufs en diapause (Armbruster, 2016). Ce mécanisme d'adaptation phénotypique aux conditions environnementales permet de définir les saisons à risque pour la transmission des agents pathogènes en lien avec la période d'activité des vecteurs. Plus cette période est courte, plus le risque d'installation d'épidémies de grande ampleur est faible. Bien qu'incapable de produire des œufs en diapause, le moustique *Ae. aegypti* réagit également aux changements de photopériode. Des femelles *Ae. aegypti* soumises à des réductions de photopériode ont survécu plus longtemps et piquaient plus fréquemment (repas sanguin) que des femelles exposées à des traitements de photopériode plus longue (Costanzo et

al., 2015). La température est le plus important des facteurs abiotiques, affectant de manière significative les vecteurs et les agents pathogènes qu'ils transmettent (Chan & Johansson, 2012; Samuel, Adelman, & Myles, 2016). L'effet de la température sur la transmission des arbovirus transmis par les moustiques est passé en revue dans un article de synthèse bibliographique présenté en section 4.2 de ce chapitre.

L'effet combiné des paramètres climatiques sur la transmission vectorielle lors d'évènements climatiques peut également être observé. Le phénomène El Niño est un évènement climatique irrégulier (tous les 2 à 7 ans) associé à des changements dans les circulations atmosphériques et océaniques du Pacifique équatorial (Timmermann et al., 2018). Ce phénomène, durant entre 6 et 18 mois, affecte le régime des vents, la température de la mer et les précipitations dans certaines régions du globe (Météo France), avec des conséquences sur l'incidence de plusieurs maladies vectorielles d'importance médicale majeure (Anyamba et al., 2019). Entre 2010 et 2011, en Colombie, où le phénomène El Niño se traduit par de fortes précipitations et une augmentation des températures, les cas recensés de dengue étaient très nettement supérieurs (Quintero-Herrera et al., 2015). Le risque épizootique/épidémique d'autres agents pathogènes à transmission vectorielle a également été lié au phénomène El Niño ; cela inclut notamment le RVFV (Anyamba et al., 2009) et le ZIKV (Caminade et al., 2017). Dans le cas du RVFV, ces liens ont permis d'établir des prédictions spatiales et temporelles précises de l'activité du virus, offrant une période d'alerte de 2 à 6 semaines et facilitant ainsi la mise en place de mesures sanitaires (Anyamba et al., 2009).

Des évènements climatiques extrêmes ont également été impliqués dans les variations d'incidence de maladies infectieuses. Une étude menée dans le Sud-Est de la Chine montre que les périodes cycloniques sont propices à l'augmentation du risque épidémique de la dengue, tandis que celui du paludisme est plus susceptible de diminuer, ce qui suggère des effets divergents des évènements climatiques extrêmes sur l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle qui diffèrent dans la bio-écologie du vecteur (Zheng, Han, Jiang, Ma, & Zhang, 2017).

En raison des effets importants des paramètres climatiques sur la distribution et l'incidence des maladies à transmission vectorielle, l'impact du changement climatique sur ces maladies a été l'objet d'intenses débats. Les experts annoncent des changements durables du climat de la Terre avec des modifications des régimes pluviométriques et un réchauffement climatique ayant pour principale conséquence la fonte des glaciers et l'élévation du niveau de la mer (Pachauri et al.,

2014). Nombre de publications projettent, en lien avec le changement climatique, une augmentation du risque de transmission des maladies vectorielles, notamment dans les régions du globe jusqu'ici épargnées (Fischer et al., 2013; Githeko, Lindsay, Confalonieri, & Patz, 2000; E. A. Gould & Higgs, 2009; Hales, de Wet, Maindonald, & Woodward, 2002; McMichael, Woodruff, & Hales, 2006; Semenza & Suk, 2018). Toutefois, plusieurs études soulignent également l'incertitude de ces prévisions du fait de la complexité des interactions entre les agents pathogènes, leurs hôte(s), leurs vecteur(s) et l'environnement (P. Reiter, 2008; Sutherst, 2004; Tabachnick, 2016).

Les facteurs chimiques. Les caractéristiques chimiques de l'eau des gîtes larvaires sont des contraintes importantes, qui influencent le choix du site de ponte et agissent sur le développement, la survie et finalement, la distribution et l'abondance des espèces de moustiques (Hershey, 2010; Hery et al., 2021; Matthews, Younger, & Vosshall, 2019). Dans des parcs urbains à São Paulo au Brésil, le type d'habitat larvaire et le pH de l'eau des gîtes étaient les meilleurs prédicteurs de l'incidence et de l'abondance d'*Ae. albopictus*. Pour *Ae. aegypti*, le pH et la salinité étaient les meilleurs prédicteurs de l'abondance, tandis que l'oxygène dissous et le type d'habitat larvaire étaient de meilleurs prédicteurs de la présence du moustique (Medeiros-Sousa et al., 2020). D'autres facteurs comme la concentration en éléments minéraux, notamment les métaux lourds comme le fer, le zinc et le cuivre sont également importants, en particulier dans les zones polluées par les activités humaines (Jeanrenaud, Brooke, & Oliver, 2020).

Les facteurs topographiques. L'altitude est un facteur topographique qui peut être utilisé comme indicateur du risque de transmission vectorielle. L'élévation d'altitude est associée à plusieurs facteurs écologiques critiques pour le développement des moustiques, en particulier la température. Au-dessus de 1 600 m, la présence d'*Ae. aegypti* semble possible sur moins de 1% de la superficie totale de 16 pays d'Amérique. Dans ces 16 pays, seul 1,1% des cas historiques de dengue ont été signalés à plus de 2 000 m d'altitude, suggérant que le risque épidémique serait réduit en altitude (Watts et al., 2017).

Au bout du compte, tous les facteurs environnementaux s'entremêlent et interagissent avec les acteurs de la triade vectorielle afin de façonner le potentiel d'émergence du système vectoriel. Des périodes de sécheresse, en théorie, non favorables à l'amplification des moustiques, peuvent induire des changements dans les pratiques de stockage de l'eau (création de gîtes

larvaires domestiques) et ainsi, contrebalancer les effets du climat sur le risque épidémique (Trewin, Kay, Darbro, & Hurst, 2013). Inversement, les activités humaines impactent le climat avec notamment une augmentation de la production des gaz à effet de serre qui entraîne un réchauffement climatique et par voie de conséquence, affecte l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle (Githeko et al., 2000).

4.2. Température et transmission d'arbovirus par les moustiques

Contexte. La prévision et la gestion des effets du climat sur les cycles épidémiologiques des maladies à transmission vectorielle nécessitent la compréhension de divers mécanismes complexes allant du niveau moléculaire et cellulaire au niveau populationnel. L'utilisation de la température comme paramètre clé dans de nombreux modèles mathématiques de prédiction du risque de transmission vectorielle témoigne de l'importance de la température dans la répartition, la saisonnalité et l'intensité des épidémies (M. S. C. Blagrove et al., 2020; Huber, Childs, Caldwell, & Mordecai, 2018; Mordecai et al., 2019; Mordecai et al., 2017; Tesla, Demakovsky, Mordecai, et al., 2018). Cependant, la base moléculaire de la dépendance des cycles de transmission des arbovirus à la température reste encore assez abstraite. La revue présentée ci-dessous a été publiée en septembre 2020 dans le journal *Frontiers in Microbiology*. Elle s'intitule « *The role of temperature in shaping mosquito-borne viruses transmission* » et vise à réunir les connaissances actuelles concernant l'effet de la température sur les cycles de transmission des arbovirus transmis par les moustiques, avec un accent mis sur les interactions moléculaires.



The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission

Rachel Bellone^{1,2} and Anna-Bella Failloux^{1*}

¹ Department of Virology, Arboviruses and Insect Vectors, Institut Pasteur, Paris, France, ² Sorbonne Université, Collège Doctoral, Paris, France

Mosquito-borne diseases having the greatest impact on human health are typically prevalent in the tropical belt of the world. However, these diseases are conquering temperate regions, raising the question of the role of temperature on their dynamics and expansion. Temperature is one of the most significant abiotic factors affecting, in many ways, insect vectors and the pathogens they transmit. Here, we debate the veracity of this claim by synthesizing current knowledge on the effects of temperature on arboviruses and their vectors, as well as the outcome of their interactions.

OPEN ACCESS

Edited by:

Akio Adachi,
Kansai Medical University, Japan

Reviewed by:

Nicholas Johnson,
Animal and Plant Health Agency,
United Kingdom
Yan-Jang S. Huang,
Kansas State University, United States
Devin Kirk,
Stanford University, United States

*Correspondence:

Anna-Bella Failloux
anna-bella.failloux@pasteur.fr

Specialty section:

This article was submitted to
Virology,
a section of the journal
Frontiers in Microbiology

Received: 18 July 2020

Accepted: 07 September 2020

Published: 25 September 2020

Citation:

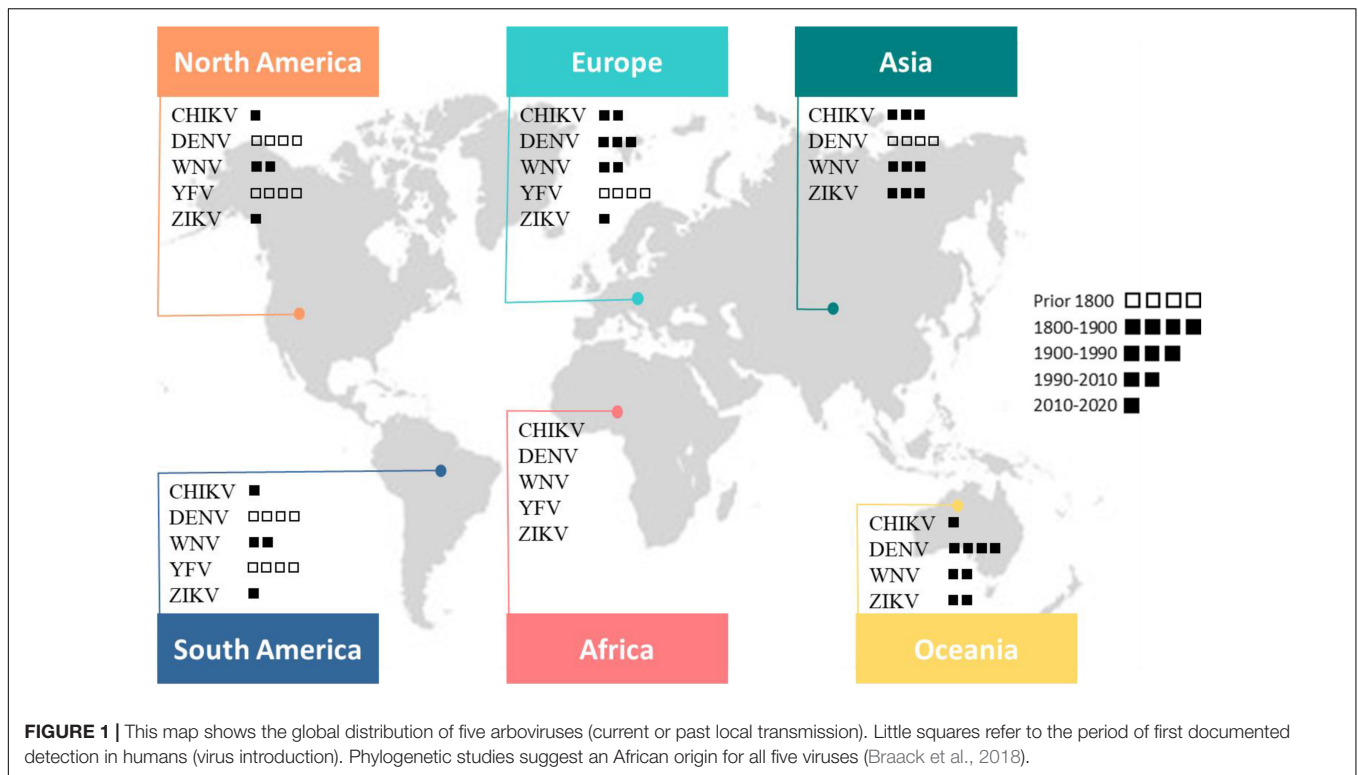
Bellone R and Failloux A-B (2020)
The Role of Temperature in Shaping
Mosquito-Borne Viruses
Transmission.
Front. Microbiol. 11:584846.
doi: 10.3389/fmicb.2020.584846

Keywords: temperature, arboviruses, vector-borne diseases, mosquitoes, vectorial capacity

INTRODUCTION

Viral pathogens with high epidemic potential have been historically a major concern for global economies and health. Over the past decades, efforts put into vaccination programs, alongside the development of effective antiviral treatments, have led to major medical advances. However, in a constantly changing world, viral diseases remain a major challenge; infectious agents continuously evolve and find opportunities to emerge (Malik Peiris and Parrish, 2011). Over time, vector-borne diseases (VBDs) have become increasingly important, reaching nearly 30% of emerging infectious disease events (Jones et al., 2008). More precisely, in the past 30 years, mosquito-borne viruses (MBVs) have dramatically expanded their distribution range within increasingly frequent and large epidemics (Gubler, 1996, 2002b; Mayer et al., 2017). MBVs such as Zika virus (ZIKV; *Flaviviridae*, *Flavivirus*), dengue virus (DENV; *Flaviviridae*, *Flavivirus*), yellow fever virus (YFV; *Flaviviridae*, *Flavivirus*), West Nile virus (WNV; *Flaviviridae*, *Flavivirus*), and chikungunya virus (CHIKV; *Togaviridae*, *Alphavirus*) have been responsible for millions of human cases with significant morbidity and mortality over the last decade (Gould et al., 2017; **Figure 1**).

In 2016, ZIKV was designated as a public health emergency of international concern by the World Health Organization (WHO). Indeed, 50 years after its first isolation from a human case in East Africa (Simpson, 1964; Gubler et al., 2017), ZIKV largely spread in the Pacific islands and the Americas accompanied by unusual notifications of microcephaly in newborns. The sudden and rapid spread of ZIKV received widespread media coverage, yet the upsurge or expansion of historical flaviviruses (YFV and DENV) is also of major importance and raises questions about our ability to eliminate arboviruses. DENV is one of the most widespread MBV with nearly half of the world's population (128 countries) at risk of infection (Brady et al., 2012; Messina et al., 2014); it affects annually 50–100 million people (Bhatt et al., 2013) at a cost of US\$ 8–9 billion (Shepard et al., 2016). While classic dengue fever occurs practically everywhere in the distribution range of its principal vector, *Aedes aegypti*, dengue hemorrhagic fever is more widespread in



South-East Asia and tropical America. In the absence of vaccines without restriction use and specific antiviral treatments, the dengue situation is worsening with a notable rise in mortality rates (Ong et al., 2007). In addition, YFV originated from Africa, caused devastating urban epidemics from the 18th to the early 20th century in the Americas (Monath and Vasconcelos, 2015). The development of vaccines in the 1930s as well as mosquito control programs led to an elimination of urban yellow fever. While YFV infections are now mainly acquired in the forest cycle, the number of urban human cases is increasing, evidencing a significant epidemiological change of yellow fever in South America (Vasconcelos and Monath, 2016). Another important member of the *Flavivirus* genus, WNV, transmitted by *Culex* species mosquitoes, gradually became the most widely distributed MBV (Chancey et al., 2015). In the late 1990s, the epidemiology and clinical spectrum of WNV remarkably changed. Notably, in 1999, from a small focus in New York City, WNV spread throughout the United States (US) accompanied by the detection of encephalitis cases. In the following years, the virus spread throughout the continent and in 2002, the United States recorded the largest outbreak of West Nile meningo-encephalitis ever documented in the world (Sejvar, 2003). The WNV outbreak in the United States (1999–2010) is a reminder that the importation and establishment of vector-borne pathogens outside their original distribution range represents a serious threat to the world¹. Following the WNV episode, the American continent was again hit by another MBV in 2013; this time, it was an *Alphavirus*, the CHIKV. After decades of sporadic outbreaks in Africa and

¹<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>

Asia, CHIKV finally emerged as a global pathogen causing large scale epidemics in Africa, Asia, America and to a lesser extent, in Europe (Zouache and Failloux, 2015; Silva and Dermody, 2017). CHIKV caused the first local *Aedes albopictus*-vectored virus transmission in Europe, with hundreds of cases in Italy and France (Grandadam et al., 2011; Calba et al., 2017; Rezza, 2018), less than 20 years after the first detection of *Ae. albopictus* in Italy (Sabatini et al., 1990). Later, *Ae. albopictus* was responsible for local cases of DENV and ZIKV in Croatia, France, and Spain (Gjenero-Margan et al., 2011; Aranda et al., 2018; Brady and Hay, 2019). The changing epidemiology of arboviral diseases results from a complex set of factors (Gubler, 2002a; Gould et al., 2017), combining both intrinsic and extrinsic interactions (Lambrechts et al., 2009; Zouache et al., 2014; Gloria-Soria et al., 2017).

In addition to human activities and globalization as key contributors in vector and pathogen spread, climate change exerts determinant effects on VBDs (Reeves et al., 1994; Gould and Higgs, 2009; Mills et al., 2010; IPCC, 2014). Because arthropods are poikilothermic ectotherms (i.e., body internal temperature is not constant and depends on temperature of surrounding environment), they are highly vulnerable to temperature changes, as are the pathogens they host. Environmental temperature is then, one of the most important abiotic factors influencing mosquito ecology, behavior, physiology and ultimately, virus transmission (Samuel et al., 2016; Reinhold et al., 2018). This review compiles the current knowledge on the effects of temperature on mosquito and virus biology with the goal of understanding how collectively these effects have an impact on virus-mosquito interactions and viral transmission.

MAIN FEATURES OF MOSQUITO-BORNE DISEASES

Clinical Aspects

Most mosquito-borne viral infections are asymptomatic or non-specific mild infections (Endy et al., 2011). Symptomatic infections are often identified as a systemic febrile illness with non-specific symptoms, thus making mosquito-borne diseases (MBDs) very difficult to diagnose (Pezzi et al., 2019). Headache, weakness and rashes are common manifestations. Muscle and joint aches are also very frequent, especially with *Alphavirus* infections, for which these symptoms can persist for months or even years. In most cases, MBDs febrile illness ends with a full recovery. In only a few cases, illness may evolve to more severe forms, which principally include hepatonephritis, hemorrhagic fever, and encephalitis (Young, 2018). Currently, there are only two marketed vaccines [against YFV and Japanese encephalitis virus (JEV)] and treatments are not specific. It is worth mentioning that asymptomatic cases are epidemiologically important, although clinically unapparent. In absence of symptoms, people can still transmit the virus either because they have sufficient viremia to participate to the natural transmission cycle (Duong et al., 2015) or because of other transmission routes such as blood transfusion or organ transplantation (Chastel, 2011).

Complex Transmission Cycles

Mosquito-borne viruses circulate primarily within enzootic cycles between zoophilic mosquitoes and wild animals. Spillovers of enzootic viruses from a sylvatic cycle occur when anthropo-zoophilic mosquitoes serve as bridge vectors for transmission of the virus from animals to humans. It is then, an opportunity for the virus to enter epidemic cycles where mosquitoes are vectors and humans are either (i) dead-end host, because infection does not lead to a viremia high enough to infect mosquitoes [e.g., West Nile virus (WNV), Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) or JEV] or (ii) reservoir and amplification host, when infection in humans leads to high viremia, ensuring an inter-human transmission (e.g., DENV, ZIKV, CHIKV, and YFV) (Young, 2018; Valentine et al., 2019). In the first scheme, epidemics rely on regular virus spillover from enzootic cycles while in the second scheme, epidemic cycles are self-sustaining, having lost the requirement of enzootic cycles to cause outbreaks (Weaver and Reisen, 2010). Some transmission cycles may be relatively simple with a main vector and a main host species (e.g., DENV, CHIKV, and ZIKV), while some others are more complex, involving several host and vector species [e.g., Rift Valley Fever Virus (RVFV), JEV, WNV] (Young, 2018).

VIRUS CYCLE IN THE VECTOR AND EFFECTS OF TEMPERATURE

Mosquito-borne viruses are arthropod-borne viruses (arboviruses), a group of viruses typically transmitted from infected to susceptible vertebrate hosts by hematophagous

arthropods (vectors). Most arboviruses causing human diseases belong to three main families: *Flaviviridae* (genus *Flavivirus*), *Togaviridae* (genus *Alphavirus*) and *Phenuiviridae* (genus *Phlebovirus*). These viruses share different types of genomes, structural organization and replication strategies (Holmes, 2003; Duffy et al., 2008; Bradwell et al., 2013), but have in common, single stranded RNAs as carriers of their genetic information.

Characteristics of RNA Genomes

Because of their chemical structures, RNAs appears as an unreliable support for transmission of genetic information in comparison to DNA (Lindahl, 1996; Lazcano et al., 1988; Krokan et al., 2002). A striking attribute of RNA viruses is their high mutation rate. During RNA replication, the mutational rate is in the range of 10^{-6} to 10^{-4} substitutions per nucleotide, corresponding roughly to 0.01 to 1 mutation per 10 kb of genome (Domingo and Holland, 1997; Lauring et al., 2013). This high mutation rate greatly contrasts with that of prokaryotic or eukaryotic genomes (Drake et al., 1998; Drake, 1999; Nachman and Crowell, 2000), as well as with that of DNA viruses (range of 10^{-8} to 10^{-6}) (Sanjuan et al., 2010). The high fidelity of DNA replication is not merely insured by the accuracy of DNA polymerases but also by the combined action of proofreading enzymes and mismatch repair system (Sanjuan and Domingo-Calap, 2016). The absence of such correction activity during RNA replication results in a more error-prone replication mode (Steinhauer et al., 1992). Consequently, RNA viruses circulate as dynamic mutant clouds of closely related genome sequences referred to as a quasispecies (Domingo et al., 2008). In the multi-component viral system, replicative infectious particles coexist with defective genomes, including defective interfering genomes (DIs) that are degenerated and non-replicative forms of viral genomes. DIs depend on the co-infection with the self-infectious virus for replication and play a significant role in triggering immune responses, modulating disease outcome and influencing virus replication and evolution (Rezelj et al., 2018). High mutation rates and short generation times are largely responsible for the extremely high genetic variability of RNA virus populations (Moya et al., 2000). Other source of variation in RNA viruses include recombination and reassortment (Domingo and Holland, 1997). Overall, RNA virus populations behave as huge reservoirs of mutants that permit rapid adaptation to environmental changes. In the mutant cloud, sequences are subject to constant genetic changes, competition and selection for the most suitable combination of viral genomes (Andino and Domingo, 2015; Domingo and Perales, 2019). RNA viruses can then exploit multiple adaptive solutions to overcome selective pressures such as immune responses, antiviral therapies or fluctuating environments.

Dual Host Cycling and Virus Adaptation

Despite inherent potential for mutation and subsequent adaptation, arboviruses exhibit lower mutational rates than non-vector RNA viruses (by a factor of 10) (Jenkins et al., 2002; Vasilakis et al., 2009). This evolutionary stasis is generally attributed to the alternated transmission between

hosts belonging to two disparate phyla, each of which presenting different demands for viral replication. According to the trade-off hypothesis, the virus is constrained to a compromised fitness for an optimal replication in both vector and vertebrate hosts (Coffey et al., 2008; Ciota and Kramer, 2010), although this explanation is not always well supported by other studies (Novella et al., 1999; Ciota et al., 2009; Deardorff et al., 2011).

Transmission occurs when the virus ingested by the vector replicates successfully in midgut epithelial cells, peripheral tissues/organs and salivary glands, prior to its expectoration through the insect bite (Figure 2). During this journey

in the vector, viral populations undergo successive genetic bottlenecks that greatly modify initial population structures (Forrester et al., 2014). A study performed with DENV-2 showed that more than 90% of single nucleotide variants (SNVs) were lost upon transmission from infected patients to *Ae. aegypti* mosquitoes, as well as from mosquito midgut to salivary glands; new variants were generated at each step of infection in vector, thereby maintaining the level of viral diversity (Coffey et al., 2013; Sim et al., 2015). Bottlenecks encountered by viruses differ according to mosquito species and probably, mosquito-virus combinations (Grubaugh et al., 2016). Viruses are thus exposed to the specific selective pressures

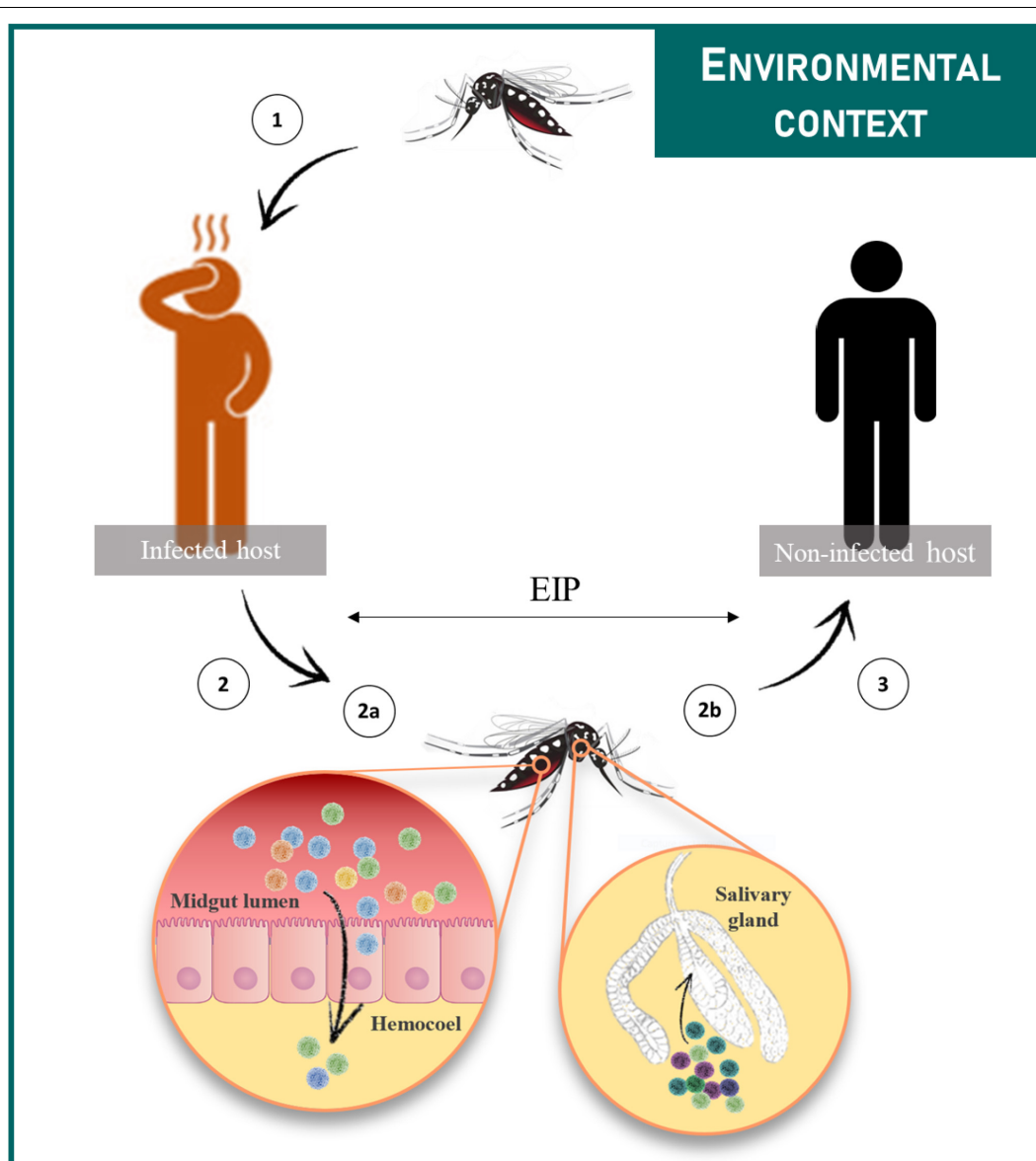


FIGURE 2 | Female mosquitoes acquire the virus during a blood meal on a viremic host (1). Then the virus infects the midgut epithelium from which it escapes and disseminates to peripheral tissues/organs (2a). The virus reaches the salivary glands (2b) in which it replicates prior to be released in saliva during a blood meal (3). The time between the ingestion of the virus and its presence in saliva is referred to as the EIP. Transmission cycles are influenced by multiple extrinsic environmental factors.

of their hosts. These selective pressures, including virus entry (appropriate receptors), microbiota and immune responses, directly shape virus evolutionary patterns and ultimately, their potential to emerge (Ruckert and Ebel, 2018). For instance, the adaptive amino acid change from alanine to valine at the position 226 of the E1 glycoprotein (E1-A226V) of the East/Central/South African (ECSA) CHIKV arose from an unusual transmission by *Ae. albopictus* instead of the classical vector *Ae. aegypti*. This specific mutation led to an enhanced transmission of CHIKV by *Ae. albopictus* (Tsetsarkin et al., 2007; Vazeille et al., 2007) causing 266 000 human cases during the 2005–2006 epidemic on La Réunion island (Schuffenecker et al., 2006). However, the benefit of the E1-A226V mutation in *Ae. albopictus* may vary according to the environmental temperature (Zouache et al., 2014). As vectors are exposed to a multitude of environmental variables, which can modify their intrinsic properties, consequences on viral populations are expected; viral populations may explore possibilities of adaptation and thus follow evolutionary processes associated

with molecular and phenotypic changes (Ciota and Kramer, 2010; Coffey et al., 2013).

Effects of Temperature on Viral Populations

In their vertebrate host, arboviruses replicate at temperatures ranging from 37°C up to 44°C (Kinney et al., 2006), then switch to their ectotherm vectors where temperatures vary depending on the ambient temperature (as low as ~15°C; **Table 1**). The fact that arboviruses tolerate such drastic temperature changes raises a number of questions: the effects of temperature on quasispecies structures and dynamics, the selection of temperature-adapted variants and impacts on virus transmission, expansion and pathogenesis. Temperature is known to induce molecular changes that impact lipids, nucleic acids and protein structures and functions (Pain, 1987). Temperature is thus very likely to modify properties of virions and their interactions with cellular components during replication. Studies on enzyme

TABLE 1 | Effect of temperature on vector competence.

Virus strains	Mosquito Species	Mosquito populations	Temperatures	Results	References
DENV					
DENV-2 (New Guinea C)	<i>Ae. albopictus</i>	China (Foshan)	18, 23, 28, and 32°C	EIP was shorter at the highest temperature	Liu et al., 2017
DENV-2 (New Guinea C)	<i>Ae. albopictus</i>	China (Shanghai)	18, 21, 26, 31, and 36°C	EIP gradually decreased when temperature increased. Infection rates increased along with temperature until 31°C	Xiao et al., 2014
DENV-2 (Kenya, 2012)	<i>Ae. aegypti</i>	Kenya (Kilifi and Nairobi)	26 and 30°C	Infection rates were higher at 30°C	Chepkorir et al., 2014
DENV-2 (434S and 6H)	<i>Ae. aegypti</i>	Vietnam (Hanoi and Ho Chi Minh)	25, 27, and 32°C	The mosquito population from Ho Chi Minh City was more susceptible to infection at lower temperature than the mosquito population from Hanoi. For both virus strains, highest infection rates were obtained at 25°C for the mosquito population from Ho Chi Minh City	Gloria-Soria et al., 2017
ZIKV					
Asian lineage (PRVABC59)	<i>Ae. aegypti</i>	United States (California)	18, 21, 26, and 30°C	EIP decreased as temperature increased. At 18°C, a 15% transmission efficiency was reached at day 31 post infection (pi), while a 100% transmission was observed at 21 days pi at 30°C	Winokur et al., 2020
Asian lineage (FB-GWUH-2016)	<i>Ae. japonicus</i>	Germany	21, 24, and 27°C	Infection rates increased with temperature and virus transmission was detected exclusively at 27°C	Jansen et al., 2018
WNV					
WN-FL03p2–3	<i>Cx. quinquefasciatus</i>	United States (Florida)	25, 28, and 30°C	Infection rates increased as temperature increased	Richards et al., 2007
NY99_crow 397-99	<i>Cx. pipiens</i>	United States (New-York)	18, 20, 26, and 30°C	Infection rates increased as temperature increased	Dohm et al., 2002
NY99-3356 and WN02-1956	<i>Cx. pipiens</i>	United States (Pennsylvania)	15, 18, 22, and 32°C	EIP was significantly shorter and transmission rates higher at 32°C	Kilpatrick et al., 2008
WNV lineage 2 (Greece 2010)	<i>Cx. pipiens</i>	Netherlands (Amsterdam and Best)	18, 23, and 28°C	Biotype <i>pipiens</i> and hybrids showed significant increased transmission rates at higher temperatures. Biotype <i>molestus</i> transmission rate did not increase with temperature	Vogels et al., 2016
CHIKV					
ECSA; (Mauritius, 2006) Asian; (Caribbean, 2014)	<i>Ae. albopictus</i>	Australia	18 and 28°C	EIP was shorter at 28°C. At 18°C, mosquitoes infected with the Asian genotype showed no evidence of virus in saliva even at the latest analysis time point (7 days post infection)	Wimalasiri-Yapa et al., 2019
ECSA (CNR_24/2014)	<i>Ae. albopictus</i>	Germany, Italy	18, 21, and 24°C	Transmission rates were higher at lower temperatures	Heitmann et al., 2018
ECSA (Lamu001)	<i>Ae. aegypti</i>	Kenya (Western and Coastal regions)	26 and 32°C	Western mosquitoes exhibited higher infection rates at 32°C than at 26°C. In contrast, coastal mosquitoes did not show any statistical difference in infection rates whatever the temperature	Mbaika et al., 2016

functional attributes most sensitive to temperature indicate that ligand binding affinity and catalytic rate are key targets during temperature adaptation; ligand affinity decreases during cold adaptation to allow more rapid catalysis (Fields et al., 2015). Whereas, thermodynamic models suggest that at low temperatures, enhanced cell binding may compensate for lower replication kinetic rates such that some transmission can still occur (Gale, 2019). Some DENV serotypes undergo a temperature dependent conformational change from a “smooth” form at lower temperatures to a “bumpy” form at temperatures approaching 37°C (Rey, 2013; Zhang et al., 2015). In addition, alphaviruses were found to enter mammalian cells *via* a temperature-dependent alternative mechanism. At temperatures that inhibit virus receptor-mediated endocytosis (classical entry for arboviruses), viral genomes were internalized directly at the plasma membrane (Vancini et al., 2013). Furthermore, silent mutations (i.e., mutations without amino acid sequence changes) are believed to play important roles in adaptation of RNA virus to elevated temperature (Kashiwagi et al., 2014). Temperature could influence the incidence and severity risk of arboviruses outbreaks by altering arboviruses evolution, selection and transmission.

MOSQUITO BIOLOGY, PHYSIOLOGY, BEHAVIOR AND EFFECTS OF TEMPERATURE

Mosquitoes are the principal vector of arboviruses, although other arthropod taxa such as ticks, sandflies and biting midges are also implicated in medically important arboviruses transmission (Alkan et al., 2013; Kazimirova et al., 2017; Sick et al., 2019). Mosquitoes have a complex life cycle characterized by complete metamorphosis and four distinct life stages: egg, larva, pupa and adult. The first three stages occur in water whereas adults are active flying insects, with females being hematophagous. The period between blood feeding and eggs laying corresponds to the gonotrophic cycle; females undergo successive gonotrophic cycles during their entire life.

Effects of Temperature on Mosquito Distribution and Life History Traits

Environmental temperature is an overriding factor defining the geographic distribution range limits of many organisms, in particular ectotherms. Mosquitoes can only survive and reproduce in suitable environments that depend on the ecological characteristics of the mosquito species. Many studies have used temperature to map global or regional suitability and distribution of mosquito species (Nawrocki and Hawley, 1987; Brady et al., 2013, 2014; Samy et al., 2016; Ding et al., 2018). With their model, Kraemer et al. (2015) estimated *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* distributions to be now extensive in all continents, including North America and Europe. For both species, the most important predictor of distribution was temperature (Kraemer et al., 2015). Sensitivity of mosquitoes to temperature reflects the effects of temperature on the main mosquito physiological processes.

First, temperature has a significant effect on eggs viability and hatching time, with optimal temperatures for hatching depending on mosquito species (Hawley et al., 1989; Hanson and Craig, 1994; Impoinvil et al., 2007; Mohammed and Chadee, 2011). Eggs of the temperate mosquito, *Ae. albopictus*, tolerate lower temperatures than eggs of tropical *Ae. aegypti* (Hanson and Craig, 1994); this contributes significantly to the larger geographical distribution of *Ae. albopictus* encompassing both tropical and temperate regions (Kraemer et al., 2015). Besides, eggs of *Ae. albopictus* from temperate regions have lower lethal temperatures than eggs of the same species from tropical regions (Hanson and Craig, 1995), emphasizing thermal acclimation. Along with photoperiod, cold temperatures trigger the production of diapausing eggs in *Ae. albopictus*. Diapause is a genetically programmed mechanism crucial for mosquitoes to overwinter (Thomas et al., 2012); it is a hormonally controlled developmental arrest that is triggered by unfavorable environmental conditions and lifted with the return of favorable conditions (Denlinger and Armbruster, 2014).

Secondly, larvae and pupae are strictly aquatic stages and thus submitted to temperature variations of breeding sites. In addition to other factors such as nutrient availability, competition for food, presence of predators/parasites, pollution with organic matter and chemicals, temperature is critical for the survival, development and emergence time of immature stages (Tun-Lin et al., 2000; Bayoh and Lindsay, 2004; Delatte et al., 2009; Dodson et al., 2012). Notably, survival of immature stages was compromised below 16°C and above 38°C for *Ae. aegypti* with an optimal survival rate at 26°C (Carrington et al., 2013). It is commonly found that as temperature increases, immature stages development time decreases (Shelton, 1973; Loetti et al., 2011; Dodson et al., 2012; Grech et al., 2015), up to a critical thermal threshold for survival (Delatte et al., 2009; Loetti et al., 2011). Development time of *Ae. aegypti* (from egg to adult) was inversely proportional to temperature, ranging from 7.2 days at 35°C to 39.7 days at 15°C (Tun-Lin et al., 2000). In addition, temperature stress during immature stages have carry-over effects on adult life traits such as fecundity, survival (Ezeakacha and Yee, 2019) and body size, with cooler temperatures producing larger mosquitoes (Mohammed and Chadee, 2011; Dodson et al., 2012). Correlations between body size and other physiological features such as blood feeding behavior have been largely discussed (Xue et al., 1995; Scott et al., 2000; Farjana and Tuno, 2013). Small mosquitoes presented exacerbated host-seeking behavior with multiple attempts to blood feed, enhancing contact frequency with hosts (Farjana and Tuno, 2013) while conflicting results were obtained elsewhere (Xue et al., 1995).

Regardless of temperature stress encountered during immature stages, temperature also has a direct impact on mosquito adult stage. In *Culex* species, female longevity significantly increased when adult holding temperature decreased (Ciota et al., 2014). Similarly, *Ae. albopictus* adult survival was inversely correlated with temperature, presenting the highest survival rate at 15°C and the lowest at 35°C (Delatte et al., 2009). Mosquito flight activity is important for many life history traits such as reproduction, nutrition and host-seeking. *Ae. aegypti* is able to fly in a temperature range of 15 to 32°C with an optimum

at 21°C (Rowley and Graham, 1968). The gonotrophic cycle length is an indicator of mosquito abundance and a proxy of contact frequencies between hosts and vectors. The shorter the gonotrophic cycle, the more often females will come in contact with their hosts and the more generations will be produced, resulting in higher mosquito densities and greater population genetic diversity (increased potential to adapt to contrasting environments). In *Ae. aegypti*, the duration of the gonotrophic cycle decreases when temperature increases. Temperature also influences the time for the first blood meal; females kept at higher temperatures have their first blood meal within 48 h of emergence. Finally, temperature had a significant effect on the number of eggs laid that peaks at nearly 80 eggs per female when reared at 26°C (Carrington et al., 2013).

It is noteworthy to mention that results obtained under constant temperatures can vary from those under fluctuating temperatures that better mimic field conditions. Temperature effects on life history traits like adult reproduction, larval survival and development time depend on the combination of mean temperature and magnitude of fluctuations (Lambrechts et al., 2011; Carrington et al., 2013; Liu-Helmersson et al., 2014).

Effects of Temperature on Microbiota

Mosquitoes harbor very complex, abundant and dynamic microbial communities that are found at high concentrations in the different intestinal portions (Dillon and Dillon, 2004; Engel and Moran, 2013). These micro-organisms are comprised of protozoans, fungi, bacteria and viruses (Guegan et al., 2018b; Strand, 2018). The combination of the host and its associated microbiota is referred to as the holobiont. This concept, where macro-organisms and their microbiota are seen as a cooperative unit, highlights the strong symbiotic interactions within the holobiont. Most of the literature focuses on bacterial communities, which were shown to play a major role in insect biology (contribution to nutrition, protection against pathogens, modulation of immune responses) (Engel and Moran, 2013; Guegan et al., 2018a; Sicard et al., 2019). While mosquitoes naturally host multiple bacteria [genera *Acinetobacter*, *Asaia*, *Delftia*, *Pseudomonas*, *Wolbachia*, *Bacillus* (Zouache et al., 2011)], their role in priming the mosquito immune responses is largely debated; the mosquito's microbiota elicits basal immune responses which act against pathogens and reduce density of the midgut microbial load itself (Ramirez et al., 2012). Temperature is a substantial factor shaping microbial communities of organisms, especially in insects (Prado et al., 2010; Lokmer and Mathias Wegner, 2015; Kikuchi et al., 2016; Moghadam et al., 2018). It was shown in flies that developmental temperature is a decisive factor influencing bacterial community structures with consequences on the flies' thermal tolerance (Moghadam et al., 2018). Similarly, in mosquitoes, temperature may affect midgut microbial diversity and structure. Compositional changes in *Ae. albopictus* midgut microbiota were found to be induced by a temperature decrease (Guegan et al., 2018a). Furthermore, higher temperatures were shown to reduce *Wolbachia* abundance in *Culex pipiens/restuans* mosquitoes, which in turn, was correlated with a higher susceptibility to WNV in subsequent mosquito generations and higher prevalence of the virus (Novakova et al., 2017).

Effects of Temperature on Mosquito Gene Expression and Immunity

Regulation of gene expression is a common mechanism that organisms use to adapt their phenotypes and maintain fitness in response to stressors such as temperature (Piglucchi, 1996; Morris and Rogers, 2014). *Ae. aegypti* adult mosquitoes held at 20°C had a very different transcriptomics profile from those held at 28°C, whereas at a higher temperature (36°C), mosquitoes showed no significant transcriptional differences from the standard holding temperature of 28°C (Gonçalves Ferreira et al., 2020). Genes, whose expression were altered at 20°C, are involved in various aspects of mosquito biology: blood-meal digestion, ROS metabolism and mosquito innate immunity (Gonçalves Ferreira et al., 2020). Mosquito immunity constitutes a powerful protection in symbiotic, entomopathogenic and mosquito-borne pathogen infections. To defend against pathogens, mosquitoes activate several immune-signaling pathways: Toll, JAK-STAT, Imd/JNK and RNAi (RNA interference) pathways (Fragkoudis et al., 2009; Kumar et al., 2018). Temperature has complex effects on mosquito immune functions (Murdock et al., 2012). In *Ae. aegypti*, a differential expression of immune-specific and detoxification genes was found in fourth instar larvae exposed to temperature stress (32°C). Thermal stress undergone during larval development had also remnant effects on adults' genes expression levels (Muturi et al., 2011). RNAi is the most significant antiviral immune response in mosquitoes (Blair, 2011). The triggering of the RNAi pathways can be destabilized when mosquitoes are reared at cooler temperatures (18°C) (Adelman et al., 2013). Impairment of immune barriers may profoundly affect mosquito interactions with symbionts, entomopathogenic organisms and mosquito-borne pathogens but also interactions of these latter together. Studies have correlated the alteration of the immune system by thermal stress with changed susceptibility to CHIKV, YFV, and Sindbis virus (SINV) (Muturi et al., 2011; Adelman et al., 2013). The subtle balance between effects of temperatures on mosquito antiviral immune responses and virus replication likely conditions the outcome of virus transmission.

Collectively, by affecting mosquito biology, physiology and behavior, temperature plays a key role in mosquito dynamics (El Moustaid and Johnson, 2019). Changes in mosquito geographical distribution, survival, development time, gonotrophic cycle, microbiota or immune responses can have critical impacts on their role as vector of pathogens (Waldock et al., 2013a; da Cruz Ferreira et al., 2017).

TEMPERATURE AND ITS POTENTIAL TO INFLUENCE ARBOVIRUSES TRANSMISSION

Major Concepts in Medical Entomology

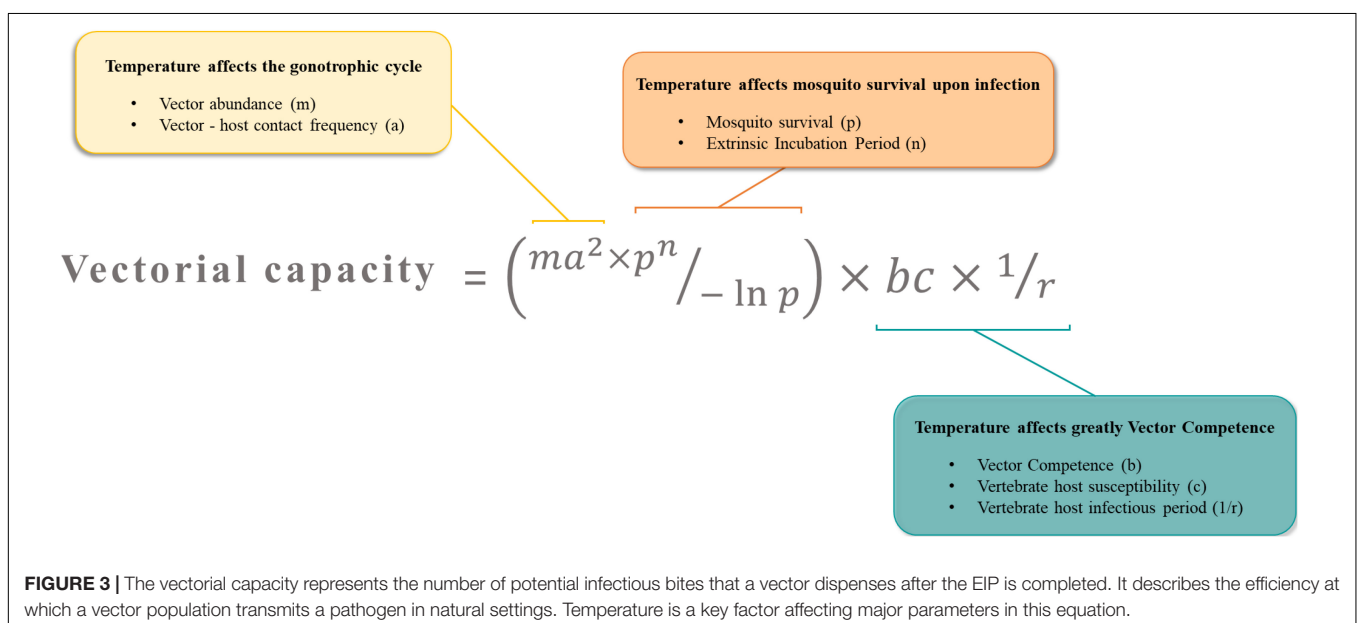
Arboviruses emergence is driven by the need of their arthropod vectors to uptake blood from vertebrate hosts. During a blood meal on a viremic host, female mosquitoes ingest the virus along with the blood. To transmit the virus to following hosts, the

mosquito has to be competent for the virus (**Figure 2**). A key concept in medical entomology, vector competence is defined as the ability of an arthropod vector to uptake and transmit afterward a given pathogen (Hardy et al., 1983). In mosquitoes, it is generally determined by the crossing of four major barriers: (Malik Peiris and Parrish, 2011) the midgut infection barrier, (Jones et al., 2008) the midgut escape barrier, (Gubler, 1996) the salivary gland infection barrier and (Gubler, 2002b) the salivary gland escape barrier (Franz et al., 2015). Basically, the virus infects and replicates in the midgut epithelium before crossing the midgut basal lamina and disseminates to peripheral tissues/organs. Ultimately, the virus reaches the salivary glands in which it replicates prior to be released in the saliva (**Figure 2**). Competent females develop persistent infections, thus transmitting the virus for the rest of their lives at each blood meal on susceptible hosts *via* the injection of infectious saliva. Vector competence is controlled by both intrinsic (i.e., microbiota, mosquito and virus genetic) (Hardy et al., 1983; Lambrechts et al., 2009; Jupatanakul et al., 2014; Hegde et al., 2015; Houe et al., 2019) and extrinsic (i.e., temperature) factors (Zouache et al., 2014; Ciota et al., 2018). The concept of vector competence is integrated in a broader one that is vectorial capacity which is an epidemiological measure of the transmissibility of an infectious agent by a particular vector species/population in the field (Macdonald, 1957). The mathematical equation used to evaluate the vectorial capacity (**Figure 3**) includes the following parameters: vector-host ratio (m), mosquito biting rate on human (a), daily survival rate (p), infectiousness of the mosquito to the vertebrate host (b), susceptibility of the vertebrate host to the virus (c), extrinsic incubation period (n) and vertebrate host infectious period ($1/r$) (Fontenille and Powell, 2020). Factors influencing the vectorial capacity have been largely discussed (Kramer and Ciota, 2015); the most determining variables are mosquito survival rate and extrinsic incubation period (EIP). The EIP equals the time required between the ingestion of a virus

and the ability of the vector to transmit it. When this period increases, the vectorial capacity decreases. All else being equal, a virus that takes 3 days to be transmitted versus one that takes 10 days within the same vector will have a much higher epidemic potential. Indeed, the shorter the EIP, the more likely the virus is transmitted before the vector dies.

Effects of Temperature on Vectorial Capacity

Temperature can affect important parameters of the vectorial capacity (**Figure 3**). First, the mosquito density, which relies on temperature-sensitive life-history traits like reproduction, gonotrophic cycles and developmental time, determines contact rates between hosts and vectors. For example, in a location where mosquitoes are at high densities, contacts between mosquitoes and hosts are increased, and so is pathogen transmission risk (Honorio et al., 2009). Second, the biting rate includes mosquito trophic preferences and requires an active host-seeking behavior which includes temperature-sensitive parameters (flight activity, gonotrophic cycle). Highly anthropophilic and active mosquitoes are more prone to transmit human pathogens and ensure their propagation. Third, mosquito survival, often negatively correlated with temperature, increases the time during which infected females serve as vectors (Christofferson and Mores, 2016). Older females are often considered as more epidemiologically dangerous, as they are more likely to have been infected and to subsequently, transmit the virus during their lifetime. Lastly, vector competence and EIP result from a complex combination of many intrinsic factors such as virus dynamics, virus and vector genetic, vector physiological traits, microbiota and immunity. Vector competence and EIP depends strongly and unimodally on temperature. Thermal optima and limits of transmission vary across vector-pathogen systems (Mordecai et al., 2019). By affecting major components



of vectorial capacity, temperature may tip the scales toward either an increase or a decrease of arbovirus transmission potential.

Principal Temperature-Dependent Factors Influencing MBV Transmission

First described as temperature dependent by Davis in 1932 (Davis, 1932), EIP is often used as an index of vector competence. Higher temperatures are associated with reduced EIP and enhanced vector competence in many virus-vector pairings (Chamberlain and Sudia, 1955; Richards et al., 2007; Xiao et al., 2014; Liu et al., 2017; Wimalasiri-Yapa et al., 2019; Winokur et al., 2020). Virus replication rates generally increase with temperature, and since dissemination and transmission correlate with viral load (Kramer and Ciota, 2015), lower temperature is generally less advantageous for arbovirus transmission. However, some exceptions sprinkle the literature; *Cx. tarsalis* mosquitoes, for example, were less competent for Western Equine Encephalitis Virus (WEEV) at 32°C than at lower temperatures (18 and 25°C) (Kramer et al., 1983). Likewise, higher infection and transmission rates were detected at lower temperature in *Ae. aegypti* infected with DENV (Heitmann et al., 2018) and in *Ae. albopictus* infected with CHIKV (Heitmann et al., 2018), respectively. These conflicting evidences are likely to result from disparate effects of temperature on virus replication and vector immune responses in each virus-vector combination.

Thermal exposure undergone during larval development has remnant effects on mosquito susceptibility to virus infection (Turell, 1993; Alto and Bettinardi, 2013). Immature stages of *Ae. albopictus* reared at lower temperatures gave adults with decreased viral dissemination when orally infected with DENV-1 (Alto and Bettinardi, 2013). Surprisingly, conflicting results were found with CHIKV and DENV-2, where susceptibility to infection increased at lower rearing temperature (Westbrook et al., 2010; Evans et al., 2018). The same trend was observed for VEEV and RVFV in *Ae. taeniorhynchus* (Turell, 1993). Interestingly, larval rearing temperature did not show any effect on *Culex* mosquito susceptibility to RVFV or WNV (Brubaker and Turell, 1998; Dodson et al., 2012). These inconsistencies may reflect different interactions between virus and vectors and may suggest the presence of interfering factors sensitive to temperature.

Several life-history traits such as adult body size vary according to rearing temperature of immature stages. Large females absorb twice the volume of blood than smaller females (Briegel, 1990), thus potentially increasing viral load ingested by larger females. *Ae. albopictus* immature stages exposed to cooler temperatures grew into larger adults with increased CHIKV susceptibility (Westbrook et al., 2010). However, smaller-sized *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* were significantly more likely to become infected and to disseminate DENV-2 than larger individuals (Alto et al., 2008). Indeed, smaller mosquitoes might have higher ratios of infective dose/body weight and thus acquire higher concentrations of virus per body weight. Moreover, temperature can interfere with other stressors of the larval environment. At a low temperature, high larval density led to high infection rates of adults with SINV while the reverse

was observed at high temperature (Muturi et al., 2012). In addition, cooler rearing temperature of immature stages resulted in enhanced *trans*-stadial transmission (from larvae to adult) of Saint Louis encephalitis virus (SLEV) in *Aedes epactius* (Hardy et al., 1980); the number of newly emerged adults harboring the virus was significantly higher in mosquitoes reared during immature stages at 18°C than those reared at 27°C. Virus vertical transmission from females to their offspring is considered as a mechanism of persistence by which viruses are maintained in nature during unfavorable periods for horizontal transmission. Although debated, this phenomenon could have a significant impact on the subsistence and emergence of arboviruses outbreaks (Lequime and Lambrechts, 2014; Agarwal et al., 2017).

In nature, mosquitoes are submitted to daily and seasonal fluctuations of temperature. Understanding how temperature variations affect arbovirus transmission dynamics is critical to anticipate and limit the geographic and seasonal spread of MBVs. In that sense, mathematical models are pivotal tools in demonstrating the key role of temperature in VBD transmission (Huber et al., 2018; Tesla et al., 2018; Mordecai et al., 2019). More precisely, Mordecai et al. (2017) predicted in their mechanistic model that most tropical and subtropical regions are suitable for CHIKV, ZIKV, and DENV transmission during most months of the year while transmission in temperate regions is limited to only few months in summer, reducing the probability of major epidemics in those regions (Mordecai et al., 2017). In addition, thermodynamics models show that in tropical areas (mean temperature close to 29°C), small diurnal temperature range (DTR), increases DENV transmission potential while under large DTR, it decreases. Whereas in cold temperate or extremely hot climates, DENV transmission potential increases as DTR increases (Lambrechts et al., 2011; Carrington et al., 2013; Liu-Helmersson et al., 2014). Using climate change projections based on predicted temperature and DTR, mapped models showed an increasing trend over time for DENV epidemic potential in temperate regions (Liu-Helmersson et al., 2014).

The effect of climate change, especially global warming, on infectious diseases transmission has been the topic of intense debate. A large body of literature assumes that climate change will considerably modify VBDs epidemiological patterns (Reeves et al., 1994; Gould and Higgs, 2009; Mills et al., 2010; IPCC, 2014; Ryan et al., 2019). However, due to the complex interactions involved in transmission cycles and the unpredictable nature of both vectors and virus evolution, predicting the effects of climatic and environmental changes on VBDs emergence is extremely challenging (Tabachnick, 2010). Local adaptation to temperature of parasites and vectors may modulate the effects of climate change on VBDs dynamics and distribution (Sternberg and Thomas, 2014). Moreover, since mosquitoes are mobile and may move from habitats to stay in an optimal environment, they are not fully exposed to large temperature variations (Kramer, 2016). Microclimates encountered in urban areas (subways, houses...) have often higher and more stable temperatures than outdoor environments. This fosters vector survival and allows transmission cycle to persist despite adverse meteorological conditions (Haider et al., 2017). Thus, urbanization modifies

climate within cities forming warmer spots; roads (with concrete and asphalt substrates) and air pollutants store the heat during daytime and release it at night, causing a rise in temperature compared to vegetated areas outside cities (Reisen, 2010). Obviously, other environmental factors including humidity, droughts, precipitation and flood act in concert with temperature to shape MBDs emergence and dynamics (Waldock et al., 2013b).

DISCUSSION

Typically, prevalent in the tropical belt, MBDs are now spreading, reaching even temperate regions. Over the last few decades, major pathogen-carrying vectors, like *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, have significantly expanded their global distributions. MBDs burden is expected to continue to increase, especially under anticipated climate change scenarios. This situation raises many concerns about how temperature could change the current dynamics and expansion of MBDs. In this paper, we review current knowledge on the intricate interactions that reside between temperature, viruses and their vectors, in order to understand how collectively these effects may shape transmission dynamics. Temperature is one of the most significant abiotic factors affecting, in many ways, both the vectors and the pathogens they transmit. With great variance depending on vector species, populations and viral strains, temperature influences vector survival, vector population growth, distribution and genetic structure, host contact and feeding, virus susceptibility, EIP, virus structure and replication (Agarwal et al., 2017). While it is clear that factors such as high mosquito density, biting and survival rates promote transmission, it is more challenging to connect transmission to specific genetic (virus, mosquito holobiont...) and environmental variables (temperature, humidity, pollution...). Obviously, there are some combinations of factors that promote transmission while others hinder it; emergence happens when promoting factors outweigh hindering factors. There is an evident gap of information about how temperature influences virus evolution and phenotypes. In addition, deciphering how mosquito microbiota and immune functions implicated in viral transmission respond to temperature has a great importance.

In its overall effects, temperature may have a profound impact on natural ecosystems of rural and sylvatic cycles. New serotypes or currently unknown viruses could emerge from wildlife and affect humans following ecosystem alterations

related to temperature changes; forest cycles are breeding grounds of unknown viruses representing a bottomless source of pathogens threatening human health (Fontenille and Powell, 2020). Neglected arboviruses are expected to become increasingly important, with temperature as a determinant factor of emergence (Lorenz et al., 2017). Beside temperature, many anthropophilic factors play crucial roles in the current success of MBDs (Kilpatrick and Randolph, 2012; Gould et al., 2017; Young, 2018). Human behavior, movement and land use in relation to climate change (population migration, water storage, unplanned urbanization...) are also subjects to explore. Notably, vector control strategies should include a temperature component in testing insecticide efficacy used in public health (Glunt et al., 2018).

Owing to the complex interactions between all partners of the vectorial system, more studies on the role of temperature on viral transmission are required. A better understanding of how transmission cycles interact with changing environments will help to better respond to future arbovirus outbreaks.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

RB and A-BF wrote the manuscript. Both authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

FUNDING

This study was supported by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under grant agreement no. 731060 (Infravec2, Research Infrastructures for the Control of Vector-Borne Diseases; <http://infravec2.eu/>), the Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (Grant No. ANR-10-LABX-62-IBEID), and the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Program under ZIKAlliance grant agreement no. 734548.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Marie Vazeille, Catherine Dauga, Adrien Blisnick, and Pei-Shi Yen for discussions, and Peter Sahlins for editing. We also thank Prof. François Rougeon for invaluable discussions on virus genetics.

REFERENCES

- Adelman, Z. N., Anderson, M. A., Wiley, M. R., Murreddu, M. G., Samuel, G. H., Morazzani, E. M., et al. (2013). Cooler temperatures destabilize RNA interference and increase susceptibility of disease vector mosquitoes to viral infection. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2239. doi: 10.1371/journal.pntd.0002239
- Agarwal, A., Parida, M., and Dash, P. K. (2017). Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Rev. Med. Virol.* doi: 10.1002/rmv.1941 [Epub ahead of print].
- Alkan, C., Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alten, B., Gould, E. A., and Charrel, R. N. (2013). Sandfly-borne phleboviruses of Eurasia and Africa: epidemiology, genetic diversity, geographic range, control measures. *Antiviral Res.* 100, 54–74. doi: 10.1016/j.antiviral.2013.07.005
- Alto, B. W., and Bettinardi, D. (2013). Temperature and dengue virus infection in mosquitoes: independent effects on the immature and adult stages. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 88, 497–505. doi: 10.4269/ajtmh.12-0421
- Alto, B. W., Reiskind, M. H., and Lounibos, L. P. (2008). Size alters susceptibility of vectors to dengue virus infection and dissemination. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 79, 688–695. doi: 10.4269/ajtmh.2008.79.688
- Andino, R., and Domingo, E. (2015). Viral quasispecies. *Virology* 479–480, 46–51. doi: 10.1016/j.virol.2015.03.022
- Aranda, C., Martinez, M. J., Montalvo, T., Eritja, R., Navero-Castillejos, J., Herreros, E., et al. (2018). Arbovirus surveillance: first dengue virus detection

- in local *Aedes albopictus* mosquitoes in Europe, Catalonia, Spain, 2015. *Euro Surveill.* 23:1700837. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.47.1700837
- Bayoh, M. N., and Lindsay, S. W. (2004). Temperature-related duration of aquatic stages of the Afrotropical malaria vector mosquito *Anopheles gambiae* in the laboratory. *Med. Vet. Entomol.* 18, 174–179. doi: 10.1111/j.0269-283x.2004.00495.x
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., et al. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496, 504–507. doi: 10.1038/nature12060
- Blair, C. D. (2011). Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling Arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol.* 6, 265–277. doi: 10.2217/fmb.11.11
- Braack, L., Gouveia de Almeida, A. P., Cornel, A. J., Swanepoel, R., and de Jager, C. (2018). Mosquito-borne arboviruses of African origin: review of key viruses and vectors. *Parasit. Vectors* 11:29. doi: 10.1186/s13071-017-2559-9
- Bradwell, K., Combe, M., Domingo-Calap, P., and Sanjuan, R. (2013). Correlation between mutation rate and genome size in riboviruses: mutation rate of bacteriophage Qbeta. *Genetics* 195, 243–251. doi: 10.1534/genetics.113.154963
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., et al. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1760. doi: 10.1371/journal.pntd.0001760
- Brady, O. J., Golding, N., Pigott, D. M., Kraemer, M. U., Messina, J. P., Reiner, R. C. Jr., et al. (2014). Global temperature constraints on *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* persistence and competence for dengue virus transmission. *Parasit. Vectors* 7:338. doi: 10.1186/1756-3305-7-338
- Brady, O. J., and Hay, S. I. (2019). The first local cases of Zika virus in Europe. *Lancet* 394, 1991–1992. doi: 10.1016/s0140-6736(19)32790-4
- Brady, O. J., Johansson, M. A., Guerra, C. A., Bhatt, S., Golding, N., Pigott, D. M., et al. (2013). Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasit. Vectors* 6:351. doi: 10.1186/1756-3305-6-351
- Briegleb, H. (1990). Fecundity, metabolism, and body size in Anopheles (Diptera: Culicidae), vectors of malaria. *J. Med. Entomol.* 27, 839–850. doi: 10.1093/jmedent/27.5.839
- Brubaker, J. F., and Turell, M. J. (1998). Effect of environmental temperature on the susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to Rift Valley fever virus. *J. Med. Entomol.* 35, 918–921. doi: 10.1093/jmedent/35.6.918
- Calba, C., Guerbois-Galla, M., Franke, F., Jeannin, C., Auzet-Caillaud, M., Grard, G., et al. (2017). Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Euro Surveill.* 22:17-00647. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00647
- Carrington, L. B., Armijos, M. V., Lambrechts, L., Barker, C. M., and Scott, T. W. (2013). Effects of fluctuating daily temperatures at critical thermal extremes on *Aedes aegypti* life-history traits. *PLoS One* 8:e58824. doi: 10.1371/journal.pone.0058824
- Chamberlain, R. W., and Sudia, W. D. (1955). The effects of temperature upon the extrinsic incubation of eastern equine encephalitis in mosquitoes. *Am. J. Hyg.* 62, 295–305. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a119780
- Chancey, C., Grinev, A., Volkova, E., and Rios, M. (2015). The global ecology and epidemiology of West Nile virus. *Biomed Res. Int.* 2015:376230. doi: 10.1155/2015/376230
- Chastel, C. (2011). [Asymptomatic infections in man: a Trojan horse for the introduction and spread of mosquito-borne arboviruses in non-endemic areas?]. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* 104, 213–219. doi: 10.1007/s13149-011-0165-1
- Chepkorir, E., Lutumiah, J., Mutisya, J., Mulwa, F., Limbaso, K., Orindi, B., et al. (2014). Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Kilifi and Nairobi for dengue 2 virus and the influence of temperature. *Parasit. Vectors* 7:435. doi: 10.1186/1756-3305-7-435
- Christofferson, R. C., and Mores, C. N. (2016). Potential for extrinsic incubation temperature to alter interplay between transmission potential and mortality of dengue-infected *Aedes aegypti*. *Environ. Health Insights* 10, 119–123. doi: 10.4137/EHI.S38345
- Ciota, A. T., Chin, P. A., Ehrbar, D. J., Micieli, M. V., Fonseca, D. M., and Kramer, L. D. (2018). Differential effects of temperature and mosquito genetics determine transmissibility of arboviruses by *Aedes aegypti* in Argentina. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 99, 417–424. doi: 10.4269/ajtmh.18-0097
- Ciota, A. T., Jia, Y., Payne, A. F., Jerzak, G., Davis, L. J., Young, D. S., et al. (2009). Experimental passage of St. Louis encephalitis virus *in vivo* in mosquitoes and chickens reveals evolutionarily significant virus characteristics. *PLoS One* 4:e7876. doi: 10.1371/journal.pone.0007876
- Ciota, A. T., and Kramer, L. D. (2010). Insights into Arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. *Viruses* 2, 2594–2617. doi: 10.3390/v2122594
- Ciota, A. T., Matarachero, A. C., Kilpatrick, A. M., and Kramer, L. D. (2014). The effect of temperature on life history traits of *Culex* mosquitoes. *J. Med. Entomol.* 51, 55–62. doi: 10.1603/ME13003
- Coffey, L. L., Forrester, N., Tsatsarkin, K., Vasilakis, N., and Weaver, S. C. (2013). Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol.* 8, 155–176. doi: 10.2217/fmb.12.139
- Coffey, L. L., Vasilakis, N., Brault, A. C., Powers, A. M., Tripet, F., and Weaver, S. C. (2008). Arbovirus evolution *in vivo* is constrained by host alternation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 105, 6970–6975. doi: 10.1073/pnas.0712130105
- da Cruz Ferreira, D. A., Degener, C. M., de Almeida Marques-Toledo, C., Bendati, M. M., Fetzer, L. O., Teixeira, C. P., et al. (2017). Meteorological variables and mosquito monitoring are good predictors for infestation trends of *Aedes aegypti*, the vector of dengue, chikungunya and Zika. *Parasit. Vectors* 10:78.
- Davis, N. C. (1932). The effect of various temperatures in modifying the extrinsic incubation period of the yellow fever virus in *Aedes aegypti*. *Am. J. Epidemiol.* 16, 163–176. doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a117853
- Deardorff, E. R., Fitzpatrick, K. A., Jerzak, G. V., Shi, P. Y., Kramer, L. D., and Ebel, G. D. (2011). West Nile virus experimental evolution *in vivo* and the trade-off hypothesis. *PLoS Pathog.* 7:e1002335. doi: 10.1371/journal.ppat.1002335
- Delatte, H., Gimonneau, G., Tribouire, A., and 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. *J. Med. Entomol.* 46, 33–41. doi: 10.1603/033.046.0105
- Denlinger, D. L., and Armbruster, P. A. (2014). Mosquito diapause. *Annu. Rev. Entomol.* 59, 73–93. doi: 10.1146/annurev-ento-011613-162023
- Dillon, R. J., and Dillon, V. M. (2004). The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* 49, 71–92.
- Ding, F., Fu, J., Jiang, D., Hao, M., and Lin, G. (2018). Mapping the spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Acta Trop.* 178, 155–162. doi: 10.1016/j.actatropica.2017.11.020
- Dodson, B. L., Kramer, L. D., and Rasgon, J. L. (2012). Effects of larval rearing temperature on immature development and West Nile virus vector competence of *Culex tarsalis*. *Parasit. Vectors* 5:199. doi: 10.1186/1756-3305-5-199
- Dohm, D. J., O'Guinn, M. L., and Turell, M. J. (2002). Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *J. Med. Entomol.* 39, 221–225. doi: 10.1603/0022-2585-39.1.221
- Domingo, E., Escarmis, C., Menéndez-Arias, L., Perales, C., Herrera, M., Novella, I. S., et al. (2008). CHAPTER 4 - viral quasispecies: dynamics, interactions, and pathogenesis. *Orig. Evol. Viruses* 4, 87–118. doi: 10.1016/b978-0-12-374153-0.00004-7
- Domingo, E., and Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51, 151–178. doi: 10.1146/annurev.micro.51.1.151
- Domingo, E., and Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genet.* 15:e1008271. doi: 10.1371/journal.pgen.1008271
- Drake, J. W. (1999). The distribution of rates of spontaneous mutation over viruses, prokaryotes, and eukaryotes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 870, 100–107. doi: 10.1111/j.1749-6632.1999.tb08870.x
- Drake, J. W., Charlesworth, B., Charlesworth, D., and Crow, J. F. (1998). Rates of spontaneous mutation. *Genetics* 148, 1667–1686.
- Duffy, S., Shackelton, L. A., and Holmes, E. C. (2008). Rates of evolutionary change in viruses: patterns and determinants. *Nat. Rev. Genet.* 9, 267–276. doi: 10.1038/nrg2323
- Duong, V., Lambrechts, L., Paul, R. E., Ly, S., Lay, R. S., Long, K. C., et al. (2015). Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 14688–14693. doi: 10.1073/pnas.1508114112
- El Moustaid, F., and Johnson, L. R. (2019). Modeling temperature effects on population density of the dengue mosquito *Aedes aegypti*. *Insects* 10:393. doi: 10.3390/insects10110393

- Endy, T. P., Anderson, K. B., Nisalak, A., Yoon, I. K., Green, S., Rothman, A. L., et al. (2011). Determinants of inapparent and symptomatic dengue infection in a prospective study of primary school children in Kamphaeng Phet, Thailand. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 5:e975. doi: 10.1371/journal.pntd.0000975
- Engel, P., and Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* 37, 699–735. doi: 10.1111/1574-6976.12025
- Evans, M. V., Shiau, J. C., Solano, N., Brindley, M. A., Drake, J. M., and Murdock, C. C. (2018). Carry-over effects of urban larval environments on the transmission potential of dengue-2 virus. *Parasit. Vectors* 11:426.
- Ezeakacha, N. F., and Yee, D. A. (2019). The role of temperature in affecting carry-over effects and larval competition in the globally invasive mosquito *Aedes albopictus*. *Parasit. Vectors* 12:123.
- Farjana, T., and Tuno, N. (2013). Multiple blood feeding and host-seeking behavior in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 50, 838–846. doi: 10.1603/me12146
- Fields, P. A., Dong, Y., Meng, X., and Somero, G. N. (2015). Adaptations of protein structure and function to temperature: there is more than one way to 'skin a cat'. *J. Exp. Biol.* 218(Pt 12), 1801–1811. doi: 10.1242/jeb.114298
- Fontenille, D., and Powell, J. R. (2020). From anonymous to public enemy: how does a mosquito become a feared Arbovirus vector? *Pathogens* 9:265. doi: 10.3390/pathogens9040265
- Forrester, N. L., Coffey, L. L., and Weaver, S. C. (2014). Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses* 6, 3991–4004. doi: 10.3390/v6103991
- Fragkoudis, R., Attarzadeh-Yazdi, G., Nash, A. A., Fazakerley, J. K., and Kohl, A. (2009). Advances in dissecting mosquito innate immune responses to Arbovirus infection. *J. Gen. Virol.* 90(Pt 9), 2061–2072. doi: 10.1099/vir.0.013201-0
- Franz, A. W., Kantor, A. M., Passarelli, A. L., and Clem, R. J. (2015). Tissue barriers to Arbovirus infection in mosquitoes. *Viruses* 7, 3741–3767. doi: 10.3390/v7072795
- Gale, P. (2019). Towards a thermodynamic mechanistic model for the effect of temperature on arthropod vector competence for transmission of arboviruses. *Microb. Risk Anal.* 12, 27–43. doi: 10.1016/j.mran.2019.03.001
- Gjenero-Margan, I., Aleraj, B., Krajcar, D., Lesnikar, V., Klobucar, A., Pem-Novosel, I., et al. (2011). Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill.* 16:19805.
- Gloria-Soria, A., Armstrong, P. M., Powell, J. R., and Turner, P. E. (2017). Infection rate of *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue virus depends on the interaction between temperature and mosquito genotype. *Proc. Biol. Sci.* 284:20171506. doi: 10.1098/rspb.2017.1506
- Glunt, K. D., Oliver, S. V., Hunt, R. H., and Paaijmans, K. P. (2018). The impact of temperature on insecticide toxicity against the malaria vectors *Anopheles arabiensis* and *Anopheles funestus*. *Malar. J.* 17:131.
- Gonçalves Ferreira, P., Tesla, B., Alves Horário, E., Alves Nahum, L., Brindley, M., Antônio de Oliveira Mendes, T., et al. (2020). Temperature dramatically shapes mosquito gene expression with consequences for mosquito-Zika virus interactions. *Front. Microbiol.* 11:901. doi: 10.3389/fmicb.2020.00901
- Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., and de Lamballerie, X. (2017). Emerging arboviruses: why today? *One Health* 4, 1–13. doi: 10.1016/j.onehlt.2017.06.001
- Gould, E. A., and Higgs, S. (2009). Impact of climate change and other factors on emerging Arbovirus diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 103, 109–121. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.07.025
- Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S., Thiberge, J. M., Soares, Y., Failloux, A. B., et al. (2011). Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 910–913.
- Grech, M. G., Sartor, P. D., Almiron, W. R., and Luduena-Almeida, F. F. (2015). Effect of temperature on life history traits during immature development of *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Cordoba city, Argentina. *Acta Trop.* 146, 1–6. doi: 10.1016/j.actatropica.2015.02.010
- Grubaugh, N. D., Weger-Lucarelli, J., Murrieta, R. A., Fauver, J. R., Garcia-Luna, S. M., Prasad, A. N., et al. (2016). Genetic drift during systemic Arbovirus infection of mosquito vectors leads to decreased relative fitness during host switching. *Cell Host Microbe* 19, 481–492.
- Gubler, D. J. (1996). The global resurgence of Arboviral diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 90, 449–451. doi: 10.1016/s0035-9203(96)90286-2
- Gubler, D. J. (2002a). Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends Microbiol.* 10, 100–103. doi: 10.1016/s0966-842x(01)02288-0
- Gubler, D. J. (2002b). The global emergence/resurgence of Arboviral diseases as public health problems. *Arch. Med. Res.* 33, 330–342. doi: 10.1016/s0188-4409(02)00378-8
- Gubler, D. J., Vasilakis, N., and Musso, D. (2017). History and emergence of Zika virus. *J. Infect. Dis.* 216(Suppl_10), S860–S867.
- Guegan, M., Minard, G., Tran, F. H., Tran Van, V., Dubost, A., and Valiente Moro, C. (2018a). Short-term impacts of anthropogenic stressors on *Aedes albopictus* mosquito vector microbiota. *FEMS Microbiol. Ecol.* 94:fy188.
- Guegan, M., Zouache, K., Demichel, C., Minard, G., Tran Van, V., Potier, P., et al. (2018b). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome* 6:49.
- Haider, N., Kirkeby, C., Kristensen, B., Kjaer, L. J., Sorensen, J. H., and Bodker, R. (2017). Microclimatic temperatures increase the potential for vector-borne disease transmission in the Scandinavian climate. *Sci. Rep.* 7:8175.
- Hanson, S. M., and Craig, G. B. Jr. (1994). Cold acclimation, diapause, and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 31, 192–201. doi: 10.1093/jmedent/31.2.192
- Hanson, S. M., and Craig, G. B. Jr. (1995). Relationship between cold hardiness and supercooling point in *Aedes albopictus* eggs. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 11, 35–38.
- Hardy, J. L., Houk, E. J., Kramer, L. D., and Reeves, W. C. (1983). Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu. Rev. Entomol.* 28, 229–262. doi: 10.1146/annurev.en.28.010183.001305
- Hardy, J. L., Rosen, L., Kramer, L. D., Presser, S. B., Shroyer, D. A., and Turell, M. J. (1980). Effect of rearing temperature on transovarial transmission of St. Louis encephalitis virus in mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 29, 963–968. doi: 10.4269/ajtmh.1980.29.963
- Hawley, W. A., Pumpuni, C. B., Brady, R. H., and Craig, G. B. Jr. (1989). Overwintering survival of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) eggs in Indiana. *J. Med. Entomol.* 26, 122–129. doi: 10.1093/jmedent/26.2.122
- Hegde, S., Rasgon, J. L., and Hughes, G. L. (2015). The microbiome modulates Arbovirus transmission in mosquitoes. *Curr. Opin. Virol.* 15, 97–102. doi: 10.1016/j.coviro.2015.08.011
- Heitmann, A., Jansen, S., Luhken, R., Helms, M., Pluskota, B., Becker, N., et al. (2018). Experimental risk assessment for chikungunya virus transmission based on vector competence, distribution and temperature suitability in Europe, 2018. *Euro Surveill.* 23:1800033.
- Holmes, E. C. (2003). Error thresholds and the constraints to RNA virus evolution. *Trends Microbiol.* 11, 543–546. doi: 10.1016/j.tim.2003.10.006
- Honorio, N. A., Nogueira, R. M., Codeco, C. T., Carvalho, M. S., Cruz, O. G., Magalhaes Mde, A., et al. (2009). Spatial evaluation and modeling of dengue seroprevalence and vector density in Rio de Janeiro, Brazil. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e545. doi: 10.1371/journal.pntd.0000545
- Houe, V., Bonizzoni, M., and Failloux, A. B. (2019). Endogenous non-retroviral elements in genomes of *Aedes* mosquitoes and vector competence. *Emerg. Microbes Infect.* 8, 542–555. doi: 10.1080/22221751.2019.1599302
- Huber, J. H., Childs, M. L., Caldwell, J. M., and Mordecai, E. A. (2018). Seasonal temperature variation influences climate suitability for dengue, chikungunya, and Zika transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12:e0006451. doi: 10.1371/journal.pntd.0006451
- Impoinvil, D. E., Cardenas, G. A., Gihture, J. I., Mbogo, C. M., and Beier, J. C. (2007). Constant temperature and time period effects on *Anopheles gambiae* egg hatching. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 23, 124–130. doi: 10.2987/8756-971x(2007)23[124:ctatpe]2.0.co;2
- IPCC (2014). *Climate Change 2014: Synthesis Report. Contribution of Working Groups I, II and III to the Fifth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*. Geneva: IPCC.
- Jansen, S., Heitmann, A., Luhken, R., Jost, H., Helms, M., Vapalahti, O., et al. (2018). Experimental transmission of Zika virus by *Aedes japonicus japonicus* from southwestern Germany. *Emerg. Microbes Infect.* 7:192.
- Jenkins, G. M., Rambaut, A., Pybus, O. G., and Holmes, E. C. (2002). Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J. Mol. Evol.* 54, 156–165. doi: 10.1007/s00239-001-0064-3
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., et al. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451, 990–993.

- Jupatanakul, N., Sim, S., and Dimopoulos, G. (2014). The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses* 6, 4294–4313. doi: 10.3390/v6114294
- Kashiwagi, A., Sugawara, R., Sano Tsushima, F., Kumagai, T., and Yomo, T. (2014). Contribution of silent mutations to thermal adaptation of RNA bacteriophage Qbeta. *J. Virol.* 88, 11459–11468. doi: 10.1128/jvi.01127-14
- Kazimirova, M., Thangamani, S., Bartikova, P., Hermance, M., Holikova, V., Stibraniova, I., et al. (2017). Tick-borne viruses and biological processes at the tick-host-virus interface. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:339. doi: 10.3389/fcimb.2017.00339
- Kikuchi, Y., Tada, A., Musolin, D. L., Hari, N., Hosokawa, T., Fujisaki, K., et al. (2016). Collapse of insect gut symbiosis under simulated climate change. *mBio* 7:e01578-16.
- Kilpatrick, A. M., Meola, M. A., Moudy, R. M., and Kramer, L. D. (2008). Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog.* 4:e1000092. doi: 10.1371/journal.ppat.1000092
- Kilpatrick, A. M., and Randolph, S. E. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet* 380, 1946–1955. doi: 10.1016/s0140-6736(12)61151-9
- Kinney, R. M., Huang, C. Y., Whiteman, M. C., Bowen, R. A., Langevin, S. A., Miller, B. R., et al. (2006). Avian virulence and thermostable replication of the North American strain of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* 87(Pt 12), 3611–3622. doi: 10.1099/vir.0.82299-0
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., et al. (2015). The global distribution of the Arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *eLife* 4:e08347.
- Kramer, L. D. (2016). Complexity of virus-vector interactions. *Curr. Opin. Virol.* 21, 81–86. doi: 10.1016/j.coviro.2016.08.008
- Kramer, L. D., and Ciota, A. T. (2015). Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr. Opin. Virol.* 15, 112–118. doi: 10.1016/j.coviro.2015.10.003
- Kramer, L. D., Hardy, J. L., and Presser, S. B. (1983). Effect of temperature of extrinsic incubation on the vector competence of *Culex tarsalis* for western equine encephalomyelitis virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 32, 1130–1139. doi: 10.4269/ajtmh.1983.32.1130
- Krokan, H. E., Drablos, F., and Slupphaug, G. (2002). Uracil in DNA—occurrence, consequences and repair. *Oncogene* 21, 8935–8948. doi: 10.1038/sj.onc.1205996
- Kumar, A., Srivastava, P., Sirisena, P., Dubey, S. K., Kumar, R., Shrinet, J., et al. (2018). Mosquito innate immunity. *Insects* 9:95. doi: 10.3390/insects9030095
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R. G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., Jarman, R. G., et al. (2009). Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol. Biol.* 9:160. doi: 10.1186/1471-2148-9-160
- Lambrechts, L., Paaijmans, K. P., Fansiri, T., Carrington, L. B., Kramer, L. D., Thomas, M. B., et al. (2011). Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7460–7465. doi: 10.1073/pnas.1101377108
- Lauring, A. S., Frydman, J., and Andino, R. (2013). The role of mutational robustness in RNA virus evolution. *Nat. Rev. Microbiol.* 11, 327–336. doi: 10.1038/nrmicro3003
- Lazcano, A., Guerrero, R., Margulis, L., and Oro, J. (1988). The evolutionary transition from RNA to DNA in early cells. *J. Mol. Evol.* 27, 283–290. doi: 10.1007/bf02101189
- Lequime, S., and Lambrechts, L. (2014). Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infect. Genet. Evol.* 28, 681–690. doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.025
- Lindahl, T. (1996). The Croonian Lecture, 1996: endogenous damage to DNA. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 351, 1529–1538. doi: 10.1098/rstb.1996.0139
- Liu, Z., Zhang, Z., Lai, Z., Zhou, T., Jia, Z., Gu, J., et al. (2017). Temperature increase enhances *Aedes albopictus* competence to transmit dengue virus. *Front. Microbiol.* 8:2337. doi: 10.3389/fmicb.2017.02337
- Liu-Helmersson, J., Stenlund, H., Wilder-Smith, A., and Rocklöv, J. (2014). Vectorial capacity of *Aedes aegypti*: effects of temperature and implications for global dengue epidemic potential. *PLoS One* 9:e89783. doi: 10.1371/journal.pone.0089783
- Loetti, V., Schweigmann, N. J., and Burrioni, N. E. (2011). Temperature effects on the immature development time of *Culex eduardoi* Casal & Garcia (Diptera: Culicidae). *Neotrop. Entomol.* 40, 138–142. doi: 10.1590/s1519-566x2011000100021
- Lokmer, A., and Mathias Wegner, K. (2015). Hemolymph microbiome of Pacific oysters in response to temperature, temperature stress and infection. *ISME J.* 9, 670–682. doi: 10.1038/ismej.2014.160
- Lorenz, C., Azevedo, T. S., Virginio, F., Aguiar, B. S., Chiaravallotti-Neto, F., and Suesdek, L. (2017). Impact of environmental factors on neglected emerging Arboviral diseases. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:e0005959. doi: 10.1371/journal.pntd.0005959
- Macdonald, G. (1957). *The Epidemiology and Control of Malaria*. Oxford: Oxford University Press.
- Malik-Peris, J. S., and Parrish, C. R. (2011). Emerging viruses. *Curr. Opin. Virol.* 1, 617–619.
- Mayer, S. V., Tesh, R. B., and Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: a global prospective on dengue, chikungunya and Zika fevers. *Acta Trop.* 166, 155–163. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.11.020
- Mbaika, S., Lutomiah, J., Chepkorir, E., Mulwa, F., Khayeka-Wandabwa, C., Tigoi, C., et al. (2016). Vector competence of *Aedes aegypti* in transmitting Chikungunya virus: effects and implications of extrinsic incubation temperature on dissemination and infection rates. *Virol. J.* 13:114.
- Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., et al. (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 22, 138–146. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.011
- Mills, J. N., Gage, K. L., and Khan, A. S. (2010). Potential influence of climate change on vector-borne and zoonotic diseases: a review and proposed research plan. *Environ. Health Perspect.* 118, 1507–1514. doi: 10.1289/ehp.0901389
- Moghadam, N. N., Thorshauge, P. M., Kristensen, T. N., de Jonge, N., Bahrndorff, S., Kjeldal, H., et al. (2018). Strong responses of *Drosophila melanogaster* microbiota to developmental temperature. *Fly* 12, 1–12. doi: 10.1080/19336934.2017.1394558
- Mohammed, A., and Chadee, D. D. (2011). Effects of different temperature regimens on the development of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) mosquitoes. *Acta Trop.* 119, 38–43. doi: 10.1016/j.actatropica.2011.04.004
- Monath, T. P., and Vasconcelos, P. F. (2015). Yellow fever. *J. Clin. Virol.* 64, 160–173.
- Mordecai, E. A., Caldwell, J. M., Grossman, M. K., Lippi, C. A., Johnson, L. R., Neira, M., et al. (2019). Thermal biology of mosquito-borne disease. *Ecol. Lett.* 22, 1690–1708.
- Mordecai, E. A., Cohen, J. M., Evans, M. V., Gudapati, P., Johnson, L. R., Lippi, C. A., et al. (2017). Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 11:e0005568. doi: 10.1371/journal.pntd.0005568
- Morris, M., and Rogers, S. M. (2014). Integrating phenotypic plasticity within an ecological genomics framework: recent insights from the genomics, evolution, ecology, and fitness of plasticity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 781, 73–105. doi: 10.1007/978-94-007-7347-9_5
- Moya, A., Elena, S. F., Bracho, A., Miralles, R., and Barrio, E. (2000). The evolution of RNA viruses: a population genetics view. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6967–6973.
- Murdock, C. C., Paaijmans, K. P., Cox-Foster, D., Read, A. F., and Thomas, M. B. (2012). Rethinking vector immunology: the role of environmental temperature in shaping resistance. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 869–876. doi: 10.1038/nrmicro2900
- Muturi, E. J., Blackshear, M. Jr., and Montgomery, A. (2012). Temperature and density-dependent effects of larval environment on *Aedes aegypti* competence for an alphavirus. *J. Vector Ecol.* 37, 154–161. doi: 10.1111/j.1948-7134.2012.00212.x
- Muturi, E. J., Kim, C. H., Alto, B. W., Berenbaum, M. R., and Schuler, M. A. (2011). Larval environmental stress alters *Aedes aegypti* competence for Sindbis virus. *Trop. Med. Int. Health* 16, 955–964. doi: 10.1111/j.1365-3156.2011.02796.x
- Nachman, M. W., and Crowell, S. L. (2000). Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics* 156, 297–304.
- Nawrocki, S. J., and Hawley, W. A. (1987). Estimation of the northern limits of distribution of *Aedes albopictus* in North America. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 3, 314–317.

- Novakova, E., Woodhams, D. C., Rodriguez-Ruano, S. M., Brucker, R. M., Leff, J. W., Maharaj, A., et al. (2017). Mosquito microbiome dynamics, a background for prevalence and seasonality of west Nile virus. *Front. Microbiol.* 8:526. doi: 10.3389/fmicb.2017.00526
- Novella, I. S., Hershey, C. L., Escarmis, C., Domingo, E., and Holland, J. J. (1999). Lack of evolutionary stasis during alternating replication of an Arbovirus in insect and mammalian cells. *J. Mol. Biol.* 287, 459–465. doi: 10.1006/jmbi.1999.2635
- Ong, A., Sandar, M., Chen, M. I., and Sin, L. Y. (2007). Fatal dengue hemorrhagic fever in adults during a dengue epidemic in Singapore. *Int. J. Infect. Dis.* 11, 263–267. doi: 10.1016/j.ijid.2006.02.012
- Pain, R. H. (1987). Temperature and macromolecular structure and function. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 41, 21–33.
- Pezzi, L., Reusken, C. B., Weaver, S. C., Drexler, J. F., Busch, M., LaBeaud, A. D., et al. (2019). GloPID-R report on Chikungunya, O'nyong-nyong and Mayaro virus, part I: biological diagnostics. *Antiviral Res.* 166, 66–81. doi: 10.1016/j.antiviral.2019.03.009
- Pigliucci, M. (1996). How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends Ecol. Evol.* 11, 168–173. doi: 10.1016/0169-5347(96)10008-2
- Prado, S. S., Hung, K. Y., Daugherty, M. P., and Almeida, R. P. (2010). Indirect effects of temperature on stink bug fitness, via maintenance of gut-associated symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1261–1266. doi: 10.1128/aem.02034-09
- Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Torres Cosme, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., et al. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 6:e1561. doi: 10.1371/journal.pntd.0001561
- Reeves, W. C., Hardy, J. L., Reisen, W. K., and Milby, M. M. (1994). Potential effect of global warming on mosquito-borne arboviruses. *J. Med. Entomol.* 31, 323–332. doi: 10.1093/jmedent/31.3.323
- Reinhold, J. M., Lazzari, C. R., and Lahondere, C. (2018). Effects of the environmental temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes: a review. *Insects* 9:158. doi: 10.3390/insects9040158
- Reisen, W. K. (2010). Landscape epidemiology of vector-borne diseases. *Annu. Rev. Entomol.* 55, 461–483. doi: 10.1146/annurev-ento-112408-085419
- Rey, F. A. (2013). Dengue virus: two hosts, two structures. *Nature* 497, 443–444. doi: 10.1038/497443a
- Rezeli, V. V., Levi, L. I., and Vignuzzi, M. (2018). The defective component of viral populations. *Curr. Opin. Virol.* 33, 74–80. doi: 10.1016/j.coviro.2018.07.014
- Rezza, G. (2018). Chikungunya is back in Italy: 2007–2017. *J. Travel Med.* 25:tay004.
- Richards, S. L., Mores, C. N., Lord, C. C., and Tabachnick, W. J. (2007). Impact of extrinsic incubation temperature and virus exposure on vector competence of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 629–636. doi: 10.1089/vbz.2007.0101
- Rowley, W. A., and Graham, C. L. (1968). The effect of temperature and relative humidity on the flight performance of female *Aedes aegypti*. *J. Insect Physiol.* 14, 1251–1257. doi: 10.1016/0022-1910(68)90018-8
- Ruckert, C., and Ebel, G. D. (2018). How do virus-mosquito interactions lead to viral emergence? *Trends Parasitol.* 34, 310–321. doi: 10.1016/j.pt.2017.12.004
- Ryan, S. J., Carlson, C. J., Mordecai, E. A., and Johnson, L. R. (2019). Global expansion and redistribution of *Aedes*-borne virus transmission risk with climate change. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13:e0007213. doi: 10.1371/journal.pntd.0007213
- Sabatini, A., Raineri, V., Trovato, G., and Coluzzi, M. (1990). [*Aedes albopictus* in Italy and possible diffusion of the species into the Mediterranean area]. *Parassitologia* 32, 301–304.
- Samuel, G. H., Adelman, Z. N., and Myles, K. M. (2016). Temperature-dependent effects on the replication and transmission of arthropod-borne viruses in their insect hosts. *Curr. Opin. Insect Sci.* 16, 108–113. doi: 10.1016/j.cois.2016.06.005
- Samy, A. M., Elaagip, A. H., Kenawy, M. A., Ayres, C. F., Peterson, A. T., and Soliman, D. E. (2016). Climate change influences on the global potential distribution of the mosquito *Culex quinquefasciatus*, vector of West Nile virus and lymphatic filariasis. *PLoS One* 11:e0163863. doi: 10.1371/journal.pone.0163863
- Sanjuan, R., and Domingo-Calap, P. (2016). Mechanisms of viral mutation. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 4433–4448. doi: 10.1007/s00018-016-2299-6
- Sanjuan, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., and Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *J. Virol.* 84, 9733–9748.
- Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., et al. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 3:e263. doi: 10.1371/journal.pmed.0030263
- Scott, T. W., Amerasinghe, P. H., Morrison, A. C., Lorenz, L. H., Clark, G. G., Strickman, D., et al. (2000). Longitudinal studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in Thailand and Puerto Rico: blood feeding frequency. *J. Med. Entomol.* 37, 89–101. doi: 10.1603/0022-2585-37.1.89
- Sejvar, J. J. (2003). West Nile virus: an historical overview. *Ochsner J.* 5, 6–10.
- Shelton, R. M. (1973). The effect of temperatures on development of eight mosquito species. *Mosq. News* 33, 1–12.
- Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., and Stanaway, J. D. (2016). The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect. Dis.* 16, 935–941. doi: 10.1016/s1473-3099(16)00146-8
- Sicard, M., Bonneau, M., and Weill, M. (2019). Wolbachia prevalence, diversity, and ability to induce cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Curr. Opin. Insect Sci.* 34, 12–20. doi: 10.1016/j.cois.2019.02.005
- Sick, F., Beer, M., Kampen, H., and Wernike, K. C. (2019). *Culicoides* biting midges-underestimated vectors for arboviruses of public health and veterinary importance. *Viruses* 11:376. doi: 10.3390/v11040376
- Silva, L. A., and Dermody, T. S. (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J. Clin. Invest.* 127, 737–749. doi: 10.1172/jci84417
- Sim, S., Aw, P. P., Wilm, A., Teoh, G., Hue, K. D., Nguyen, N. M., et al. (2015). Tracking dengue virus intra-host genetic diversity during human-to-mosquito transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 9:e0004052. doi: 10.1371/journal.pntd.0004052
- Simpson, D. I. (1964). Zika virus infection in man. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 58, 335–338.
- Steinhauer, D. A., Domingo, E., and Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122, 281–288. doi: 10.1016/0378-1119(92)90216-c
- Sternberg, E. D., and Thomas, M. B. (2014). Local adaptation to temperature and the implications for vector-borne diseases. *Trends Parasitol.* 30, 115–122. doi: 10.1016/j.pt.2013.12.010
- Strand, M. R. (2018). Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. *Curr. Opin. Insect Sci.* 28, 59–65. doi: 10.1016/j.cois.2018.05.008
- Tabachnick, W. J. (2010). Challenges in predicting climate and environmental effects on vector-borne disease epistemics in a changing world. *J. Exp. Biol.* 213, 946–954. doi: 10.1242/jeb.037564
- Tesla, B., Demakovskiy, L. R., Mordecai, E. A., Ryan, S. J., Bonds, M. H., Ngonghala, C. N., et al. (2018). Temperature drives Zika virus transmission: evidence from empirical and mathematical models. *Proc. Biol. Sci.* 285:20180795. doi: 10.1098/rspb.2018.0795
- Thomas, S. M., Obermayr, U., Fischer, D., Kreyling, J., and Beierkuhnlein, C. (2012). Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasit. Vectors* 5:100.
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., and Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3:e201. doi: 10.1371/journal.ppat.0030201
- Tun-Lin, W., Burkot, T. R., and Kay, B. H. (2000). Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Med. Vet. Entomol.* 14, 31–37. doi: 10.1046/j.1365-2915.2000.00207.x
- Turell, M. J. (1993). Effect of environmental temperature on the vector competence of *Aedes taeniorhynchus* for Rift Valley fever and Venezuelan equine encephalitis viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 49, 672–676. doi: 10.4269/ajtmh.1993.49.672
- Valentine, M. J., Murdock, C. C., and Kelly, P. J. (2019). Sylvatic cycles of arboviruses in non-human primates. *Parasit. Vectors* 12:463.
- Vancini, R., Wang, G., Ferreira, D., Hernandez, R., and Brown, D. T. (2013). Alphavirus genome delivery occurs directly at the plasma membrane in a time- and temperature-dependent process. *J. Virol.* 87, 4352–4359. doi: 10.1128/jvi.03412-12

- Vasconcelos, P. F., and Monath, T. P. (2016). Yellow fever remains a potential threat to public health. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 16, 566–567. doi: 10.1089/vbz.2016.2031
- Vasilakis, N., Deardorff, E. R., Kenney, J. L., Rossi, S. L., Hanley, K. A., and Weaver, S. C. (2009). Mosquitoes put the brake on Arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *PLoS Pathog.* 5:e1000467. doi: 10.1371/journal.ppat.1000467
- Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., et al. (2007). Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2:e1168. doi: 10.1371/journal.pone.0001168
- Vogels, C. B., Fros, J. J., Goertz, G. P., Pijlman, G. P., and Koenraadt, C. J. (2016). Vector competence of northern European *Culex pipiens* biotypes and hybrids for West Nile virus is differentially affected by temperature. *Parasit. Vectors* 9:393.
- Waldock, J., Chandra, N. L., Lelieveld, J., Proestos, Y., Michael, E., Christophides, G., et al. (2013a). The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathog. Glob. Health* 107, 224–241.
- Waldock, J., Parham, P. E., Lelieveld, J., and Christophides, G. K. (2013b). Climate and human health: the impact of climate change on vector-borne diseases, Paphos, Cyprus (17–19 October 2012). *Pathog. Glob. Health* 107, 387–392. doi: 10.1179/204772413z.000000000161
- Weaver, S. C., and Reisen, W. K. (2010). Present and future Arboviral threats. *Antiviral Res.* 85, 328–345. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008
- Westbrook, C. J., Reiskind, M. H., Pesko, K. N., Greene, K. E., and Lounibos, L. P. (2010). Larval environmental temperature and the susceptibility of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) to Chikungunya virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 10, 241–247.
- Wimalasiri-Yapa, B., Stassen, L., Hu, W., Yakob, L., McGraw, E. A., Pyke, A. T., et al. (2019). Chikungunya virus transmission at low temperature by *Aedes albopictus* mosquitoes. *Pathogens* 8:149. doi: 10.3390/pathogens8030149
- Winokur, O. C., Main, B. J., Nicholson, J., and Barker, C. M. (2020). Impact of temperature on the extrinsic incubation period of Zika virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14:e0008047. doi: 10.1371/journal.pntd.0008047
- Xiao, F. Z., Zhang, Y., Deng, Y. Q., He, S., Xie, H. G., Zhou, X. N., et al. (2014). The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in *Aedes albopictus*. *Arch. Virol.* 159, 3053–3057. doi: 10.1007/s00705-014-2051-1
- Xue, R. D., Edman, J. D., and Scott, T. W. (1995). Age and body size effects on blood meal size and multiple blood feeding by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* 32, 471–474. doi: 10.1093/jmedent/32.4.471
- Young, P. R. (2018). Arboviruses: a family on the move. *Adv. Exp. Med. Biol.* 1062, 1–10. doi: 10.1007/978-981-10-8727-1_1
- Zhang, X., Sun, L., and Rossmann, M. G. (2015). Temperature dependent conformational change of dengue virus. *Curr. Opin. Virol.* 12, 109–112. doi: 10.1016/j.coviro.2015.04.006
- Zouache, K., and Failloux, A. B. (2015). Insect-pathogen interactions: contribution of viral adaptation to the emergence of vector-borne diseases, the example of chikungunya. *Curr. Opin. Insect Sci.* 10, 14–21. doi: 10.1016/j.cois.2015.04.010
- Zouache, K., Fontaine, A., Vega-Rua, A., Mousson, L., Thiberge, J. M., Lourenco-De-Oliveira, R., et al. (2014). Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc. Biol. Sci.* 281:20141078. doi: 10.1098/rspb.2014.1078
- Zouache, K., Raharimalala, F. N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L. H., Ravelonandro, P., et al. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75, 377–389. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2020 Bellone and Failloux. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



Partie II

Mémoire expérimental

Chapitre 5

Matériel biologique et procédures générales

Chapitre 6

Travaux expérimentaux

Evolution et adaptation du virus du chikungunya (Article 2)

Régulation transcriptionnelle des gènes d'*Ae. albopictus* (Article 3)

Microbiome bactérien d'*Ae. albopictus* (Article 4)

Contexte Général

En aout 2007, des cas de chikungunya contractés localement sont diagnostiqués dans la province de Ravenne en Italie (Angelini et al., 2007). Ces cas de chikungunya autochtones, dont le nombre approximatif fut estimé à 330, furent les premiers recensés en Italie, mais aussi en Europe (ECDC, 2020b). En 2010, la situation se répète et deux cas de transmission locale du CHIKV sont signalés dans le département du Var, en France (Grandadam et al., 2011). En France, en 2014 (12 cas) puis en 2017 (17 cas) et en Italie en 2017 (499 cas), des cas autochtones de chikungunya sont à nouveau détectés (ECDC, 2020b). Durant des décennies, les arbovirus plus traditionnellement retrouvés dans les régions tropicales ont épargné l'Europe, mais ces derniers évènements semblent indiquer que la situation tend à changer. Les causes de ces changements sont principalement liées à l'intensification des échanges internationaux, à la circulation croissante de ces agents pathogènes dans les régions tropicales et à la colonisation du territoire européen par l'espèce invasive, *Ae. albopictus*. En conséquence, de nouvelles populations de moustiques s'établissent et forment avec les virus introduits de nouveaux systèmes vectoriels qui évoluent sous l'influence des contraintes environnementales locales, particulièrement différentes de celles retrouvées en zones tropicales. Parmi les paramètres environnementaux, la température est d'une importance particulière, car le moustique est un organisme ectotherme dont la température interne varie avec celle du milieu ambiant. L'ensemble des processus biologiques du moustique, notamment ceux liés à la transmission des virus, sont alors exposés aux températures de l'environnement. Cela suscite donc la question de l'effet de la température sur la transmission par le moustique d'agents pathogènes tel que le CHIKV. Des expériences menées au laboratoire ont mis en évidence l'existence d'interactions tripartites entre le génotype du moustique, celui du CHIKV et la température (interactions Génotype x Génotype x Environnement) (Zouache et al., 2014). Ces résultats démontrent des effets variés de la température sur les couples virus-moustiques en accord avec certaines données de la littérature (Samuel et al., 2016). Toutefois, les mécanismes moléculaires sous-tendant ces observations restent à être décrits.

La transmission des virus par le moustique se fait par le franchissement de plusieurs barrières anatomiques permettant en bout de course la libération de particules virales dans la salive des moustiques. Durant ce cheminement dans le vecteur, une combinaison de facteurs liés au virus et au vecteur déterminera l'issue de l'infection (voir section 1.2.2 du chapitre 1). Selon quelles modalités la température peut-elle interférer avec la transmission virale ? Comment les facteurs importants pour la transmission sont-ils impactés par la température ?

Les travaux expérimentaux présentés dans cette thèse explorent en lien avec la température, trois paramètres clés de la transmission virale : (i) l'évolution génétique du virus, (ii) la régulation de l'expression génétique du moustique et (iii) la composition des communautés bactériennes du moustique.

Le CHIKV, comme la plupart des virus à ARN, possède des caractéristiques répliquatives (voir section 1.1.2.1 du chapitre 1) permettant une évolution rapide et un potentiel d'adaptation remarquable. La distribution sous forme de quasi-espèces du virus lui offre la possibilité de s'adapter aux environnements changeants par sélection de variants viraux préexistants dans la population virale. Actuellement, il existe très peu d'informations sur la manière dont la température pourrait influencer l'évolution et les phénotypes des arbovirus. Dans la première partie des travaux expérimentaux, nous avons réalisé un suivi de l'évolution de clones infectieux du CHIKV à 20°C et 28°C *in vitro*, sur cellules de moustiques, et *in vivo*, chez le moustique *Ae. albopictus*.

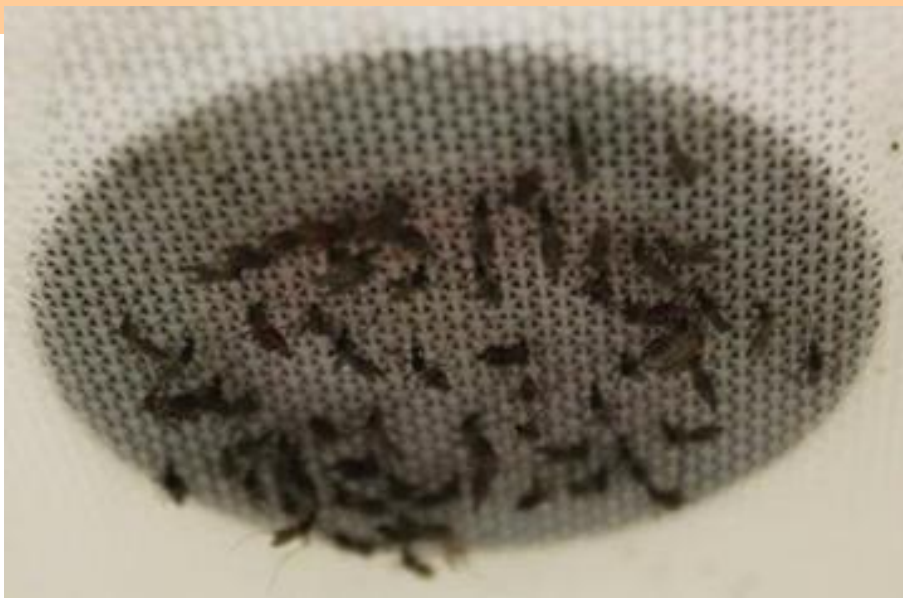
La régulation des gènes est un mécanisme important permettant aux organismes vivants d'adapter leurs phénotypes en fonction des conditions environnementales (Kelly, Panhuis, & Stoehr, 2012; Piglucci, 1996). Elle a pour effet de moduler l'expression des produits de gènes (ARNm ou ARN non codant), en les augmentant ou en les diminuant selon les besoins physiologiques. Bien qu'encore mal compris, des mécanismes génétiques (interactions GxG) ont été reconnus comme jouant un rôle majeur dans la réceptivité à l'infection des moustiques (voir section 1.3.3.1 du chapitre 1). Dans la seconde partie du projet, nous étudions les changements d'expression génétique du moustique *Ae. albopictus* associés aux variations de température (20°C et 28°C). Nous examinons ensuite le lien potentiel de ces changements avec la transmission virale.

Enfin, le moustique héberge des populations microbiennes dont l'interférence avec la transmission virale a largement été décrite, en particulier pour certaines bactéries (Dennison et al., 2014). La dernière partie de notre étude consiste donc à évaluer l'effet de la température sur la composition et la structure des populations bactériennes du moustique *Ae. albopictus* durant l'infection par le CHIKV.

Nous émettons l'hypothèse selon laquelle ces trois paramètres seraient modifiés par la température. La combinaison de ces modifications définirait par conséquent les différents profils de transmission.

Chapitre 5

Matériel biologique et procédures générales



Crédit: L. Danet

Moustiques prélevant du sang lors d'un gorgement artificiel.

Dans ce chapitre sont présentés le matériel biologique et les procédures expérimentales générales utilisés au cours de la thèse. Les spécificités techniques de chaque expérience sont détaillées dans les sections correspondantes du chapitre 6.

5. Chapitre 5 : Matériel biologique et procédures générales

5.1. Clones infectieux ICRES

Deux clones infectieux d'une souche du CHIKV ont été utilisés au cours de nos expériences (Figure 33). Ces clones ont été conçus et fournis à titre gracieux par le Prof. Andres Merits (Institute of Technology, Tartu, Estonie). Les clones infectieux viraux sont des outils de génétique inverse permettant la modification du génome viral et facilitant la caractérisation de déterminants génétiques viraux associés à certains phénotypes. Ils diffèrent des souches virales par l'absence de diversité génétique ; les séquences génétiques des particules virales d'un clone infectieux sont identiques entre elles. Elles sont obtenues à partir d'une construction génétique (vecteur) dans laquelle a été introduit l'ADN complémentaire complet de l'ARN génomique d'une souche virale. La construction génétique à l'origine des clones infectieux que nous avons utilisés est basée sur la souche LR2006-OPY1 du CHIKV (génotype ECSA) isolé du sérum d'un patient en provenance de La Réunion (Accession no. DQ443544.2) (Parola et al., 2006). Les deux clones se distinguent par une différence d'un acide aminé à la position 226 de la glycoprotéine d'enveloppe E1. Le premier clone porte une valine à la position E1-226, naturellement présente dans la souche virale tandis que le deuxième clone porte une alanine à cette même position. Comme vu à la section 5 du chapitre 2, la mutation E1-A226V est une mutation adaptative qui a naturellement été sélectionnée chez le moustique *Ae. albopictus* lors de l'épidémie de La Réunion en 2006. Cette mutation a joué un rôle majeur dans la dispersion du CHIKV. Le choix de l'utilisation des deux clones provient du fait que les souches du CHIKV ayant émergé en Europe portaient soit l'un ou l'autre des acides aminés (ECDC, 2020b).

Produits sur cellules de rein de hamster (BHK-21), les titres des clones viraux s'élèvent à $10^{9,15}$ ffu/mL (*focus-forming units*/mL) pour le clone E1-226V et à $10^{8,90}$ ffu/mL pour le clone E1-226A. Le contrôle par séquençage des clones infectieux a validé la présence des codons correspondant à l'alanine ou à la valine pour chacun des clones et l'absence d'autres mutations.

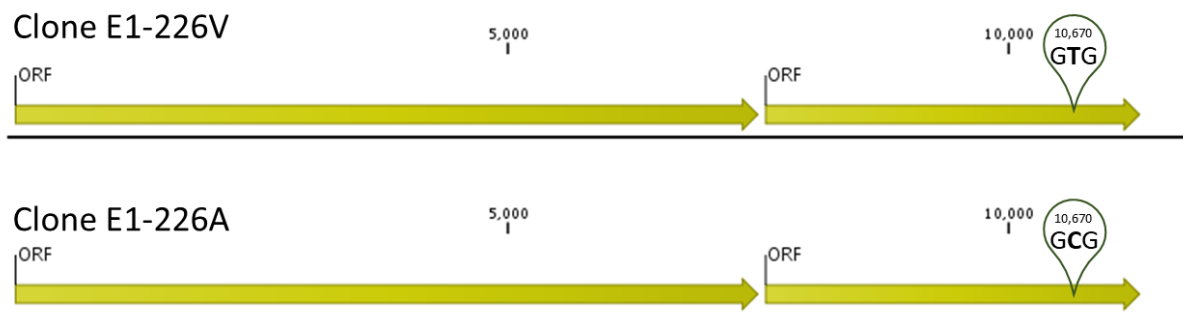


Figure 33. Clones infectieux du CHIKV. Comptant 11 850 bases, les deux clones se distinguent par une différence de nucléotide en position 10 670 de la séquence nucléotidique, conduisant à un changement dans la séquence protéique (GTG> Valine et GCG> Alanine).

5.2. *Ae. albopictus* du sud de la France

La population de moustique utilisée au cours des expériences a été collectée en juillet 2018 à Montpellier. Les œufs de moustiques ont été prélevés à l'aide de pondoirs pièges placés dans trois sites différents de la ville de Montpellier. À partir de ces œufs, 1074 moustiques ont été obtenus et ont permis d'initier au laboratoire une colonie d'*Ae. albopictus* du sud de la France. Les œufs pondus sur papier buvard sont immergés dans 1 litre d'eau déchloré et maintenus dans une pièce à $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Après éclosion, les larves sont réparties à raison de 200 larves par bassine d'eau et nourries avec des pastilles de levure de bière. Au stade nymphal, les moustiques sont transférés dans des pots d'eau et placés dans des cages en chambre chaude. Les moustiques adultes sont élevés sous des conditions contrôlées de nutrition (solution de sucrose 10%), de température ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$), d'humidité (70% HR) et de photopériode (cycles jour:nuit de 12 h:12 h). Les femelles sont gorgées trois fois par semaine sur des souris anesthésiées (souris OF1, laboratoires Charles River, France) afin d'assurer la ponte des œufs et maintenir ainsi la colonie. Les femelles utilisées pour les infections orales ne sont jamais gorgées avant le repas sanguin infectieux. Pour le projet de thèse, nous avons utilisé les générations de moustiques F2 à F7.

5.3. Infection orale des moustiques

L'infection orale des moustiques consiste à simuler la prise d'un repas sanguin infectieux sur un patient en phase virémique en proposant à des femelles de moustiques une préparation de

sang et de virus. L'infection expérimentale est réalisée suivant une adaptation du protocole décrit par Vazeille *et al.* en 2007.

La veille du repas sanguin, les femelles de moustiques âgées de 10 à 15 jours sont anesthésiées par le froid et réparties dans des boîtes à fond amovible (65 femelles par boîte) (Figure 34). Les boîtes contenant les femelles de moustiques sont ensuite transportées dans l'insectarium du laboratoire de confinement P3/I3 à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et 80% d'humidité. Les femelles sont laissées à jeun pendant 24 h afin d'optimiser les taux de gorgement durant le repas artificiel. En amont du repas, du sang de lapin est prélevé et lavé dans du tampon phosphate salin (PBS ; de l'anglais *Phosphate Buffered-Saline*) 1X afin d'éliminer la fraction sérique du sang et de conserver uniquement les érythrocytes qui seront resuspendus dans du PBS 1X. Le repas sanguin infectieux est préparé juste avant l'infection orale des moustiques. Il se compose de 2/3 d'érythrocytes de lapin et de 1/3 de suspension virale. On y ajoute un phagostimulant, l'adénosine triphosphate (ATP) à une concentration finale de 10 mM. Pour les expériences d'infection orale présentées au chapitre 6, le titre viral des repas sanguins est défini à 10^7 FFU/mL. Une fois le mélange infectieux prêt, il est distribué dans des capsules recouvertes d'un morceau d'intestin de porc (Figure 34). Les capsules sont ensuite fixées sur les blocs chauffants du système Hemotek® qui permettent de maintenir la température du repas sanguin à 37°C (Figure 34). Le fond amovible des boîtes contenant les moustiques est relevé afin de concentrer les moustiques dans la partie supérieure des boîtes. Les boîtes sont ensuite placées sous les gorgeurs pour que les moustiques puissent piquer à travers l'intestin de porc et ainsi, s'alimenter (Figure 34). Afin de préserver l'infectiosité des particules virales, le repas sanguin n'excédera pas une heure. Au terme du repas sanguin, les femelles sont anesthésiées sur glace et seules celles qui se sont pleinement gorgées sont conservées et transférées dans des boîtes en carton (Figure 34). Un coton imbibé d'eau sucrée à 10% est fourni pour l'alimentation des femelles pendant la durée de l'incubation post-infection. Les femelles sont maintenues en chambre climatique à 20°C ou $28^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ et 80 à 90% d'humidité pendant la durée d'incubation définie par le schéma expérimental de l'expérience. La température de 20°C a été identifiée comme étant la température mensuelle moyenne minimale requise pour la transmission du CHIKV (Tilston, Skelly, & Weinstein, 2009). Cette température a donc été choisie dans nos expériences comme représentative d'une température basse. La température de 28°C est considérée comme la température moyenne typique des régions tropicales et est couramment utilisée comme température standard dans les expériences d'infection des moustiques par le

CHIKV. Cette température nous servira donc de comparatif afin de juger de l'effet d'une basse température sur les paramètres de transmission.

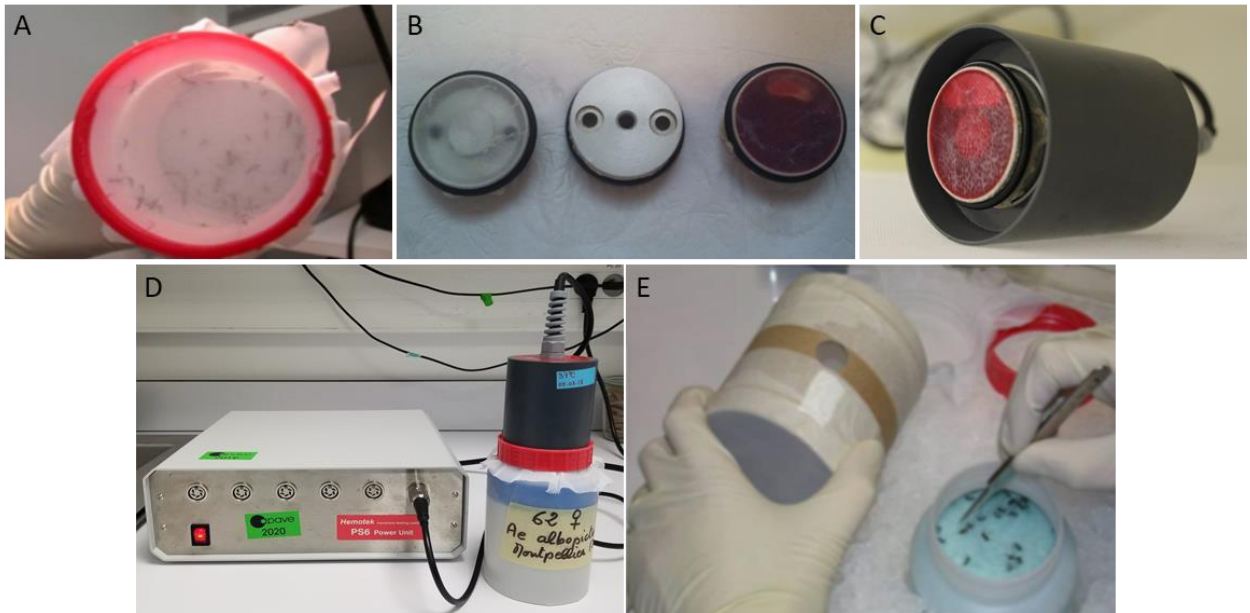


Figure 34. Procédure d'infection expérimentale de moustiques. (A) Boîte à fond amovible contenant les femelles de moustique. (B et C) Capsules et bloc chauffant du dispositif de gorgement artificiel Hemotek®. (D) Mise en contact des moustiques avec la préparation de sang. (E) Transfert des femelles gorgées dans des boîtes en carton.

5.4. Analyse de l'efficacité de transmission : technique de la salivation forcée

L'évaluation du potentiel des moustiques à transmettre un agent infectieux se fait par la collecte de la salive des femelles analysées. Dans le laboratoire, la collecte de salive est réalisée suivant une adaptation du protocole décrit par Dubrulle et al. en 2009. Il s'agit d'une technique de salivation forcée qui consiste à induire un stress chez la femelle en lui arrachant les pâtes et les ailes. La salive est récoltée en insérant le proboscis du moustique dans un cône contenant 5 μ L de sérum de veau fœtal (SVF) (Figure 35). Après 45 min, le contenu du cône est transféré dans un tube contenant 45 μ L de milieu Leibovitz (L-15) qui est conservé ensuite à -80°C jusqu'à analyse. La détection de particules virales dans les salives des femelles analysées se fait par titrage et permet de définir l'efficacité de transmission, correspondant à la proportion de femelles avec des salives infectées sur l'ensemble des femelles analysées. Ce paramètre témoigne de la compatibilité du couple virus-moustique et permet d'un point de vue épidémiologique d'estimer la proportion de femelles capables de transmettre un virus et d'évaluer ainsi le risque épidémique associé à la transmission du virus par les moustiques testés.

La mesure de la charge virale des salives positives est une donnée supplémentaire permettant d'évaluer le potentiel de transmission de chaque femelle. En effet, le nombre de particules virales excrétées par la femelle est déterminant pour la transmission ; on estime que plus la charge virale est forte, plus les chances de transmission à l'hôte vertébré sont élevées (Churcher et al., 2017).

D'autres paramètres clés dans l'évaluation de la compétence vectorielle en laboratoire incluent les taux d'infection (analyse de l'abdomen ou du tube digestif), d'infection disséminée (analyse de la tête, des pâtes ou des ailes des femelles infectées) et de transmission (analyse des salives des femelles présentant une infection disséminée).



Figure 35. Technique de salivation forcée de moustiques.

5.5. Détection virale par titrage

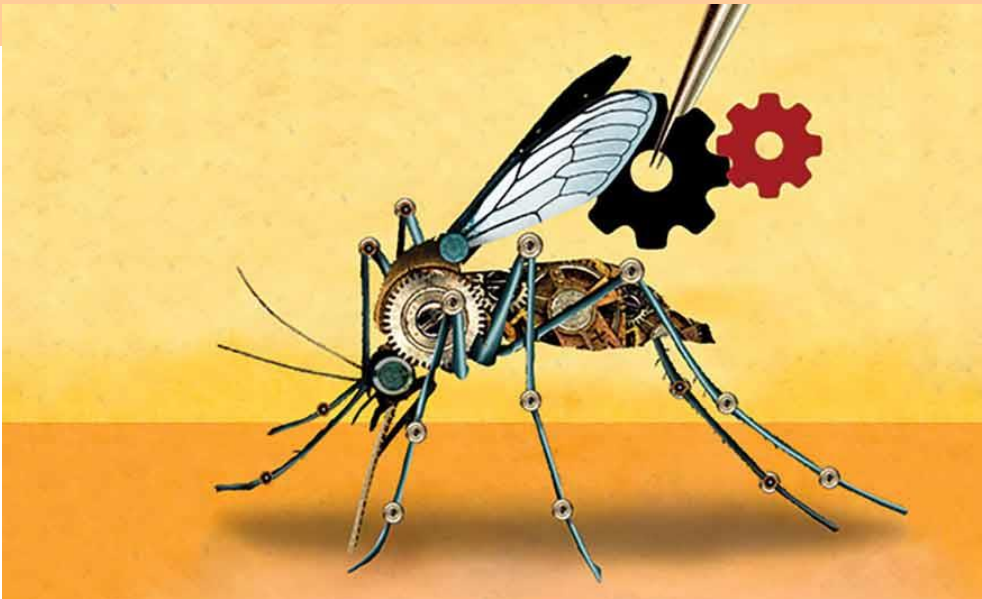
Les virus issus de productions virales ou d'échantillons de moustiques infectés sont détectés par la technique des *focus-forming units* (FFU) sur des cellules d'*Ae. albopictus*, clone C6/36 (ATCC) (Igarashi, 1978). En raison d'une réponse antivirale déficiente, ces cellules sont idéales pour la réplication de plusieurs arbovirus, comme le DENV et le CHIKV (Brackney et al., 2010; Igarashi, 1978). Le milieu de croissance de ces cellules est le Leibovitz L-15 additionné de 10 % de SVF. Des plaques 96 puits sontensemencées 48 h avant le titrage à raison de $3,1 \times 10^6$ cellules par puits et incubées à 28°C sans CO₂. Le jour du titrage, les échantillons sont dilués et 50 µL de ces dilutions sont déposés sur les cellules. Après une incubation de 1 h à 28°C,

l'inoculum est retiré et 150 μ L d'un mélange (1:1) de carboxyméthylcellulose (CMC) à 4% et de milieu Leibovitz L-15 contenant 5 % de SVF est déposé sur les tapis cellulaires. Pour les échantillons de moustiques (non stériles), un antifongique - antibactérien (Life technologies®) est ajouté au mélange à une concentration finale de 1,5X. Les plaques sont ensuite incubées à 28°C sans CO₂ pendant 3 jours. À la fin de la période d'incubation, les cellules sont fixées au formaldéhyde (3,4%) pendant 20 min à température ambiante. Les tapis cellulaires sont ensuite rincés trois fois en PBS 1X puis marqués avec une solution d'ascite anti-CHIKV diluée au 1000^{ème} pendant 1 h à température ambiante. Après 3 rinçages au PBS 1X, un anticorps secondaire dilué au 500^{ème} (Alexa fluor 488 goat anti mouse ThermoFisher®) est déposé sur les cellules pour une incubation de 30 min à 37°C. Pour terminer, les cellules sont une fois de plus rincées 3 fois au PBS 1X. Enfin, le statut infectieux (positif ou négatif) ou le titre précis des échantillons est déterminé par observation des foyers au microscope à fluorescence. Les titres calculés sont exprimés en (FFU)/mL.

Chapitre 6

Travaux expérimentaux

Crédit: M. Morgenstern, Sciences News



Dans ce chapitre sont présentés les travaux expérimentaux réalisés au cours de la thèse. Ils sont rédigés sous la forme d'articles scientifiques correspondant aux trois parties du sujet : évolution et adaptation virale, régulations transcriptionnelles et microbiome bactérien du moustique.

6.1. Effet de la température sur l'évolution et l'adaptation du virus du chikungunya

6.1.1. Objectifs

Cette étude a pour objectif de caractériser les trajectoires évolutives du CHIKV en fonction de la température *in vitro*, en culture cellulaire, et *in vivo*, chez le moustique. On s'interroge ici sur les déterminants génétiques viraux sensibles à la température, dans le but de déterminer les modalités selon lesquelles, la température pourrait favoriser la sélection de variants viraux pour une meilleure transmission par le moustique.

6.1.2. Démarche expérimentale

Afin d'atteindre nos objectifs, nous avons réalisé des études d'évolution expérimentale consistant à maintenir par passages successifs les deux clones infectieux du CHIKV (décrits au chapitre 5) à 20°C ou 28°C. Dans un premier temps, les expériences ont été effectuées *in vitro* sur cellules de moustiques U4.4 (*Ae. albopictus*) et Aag2 (*Ae. aegypti*). Ces expériences ont été complétées par des études d'évolution virale *in vivo*, chez le moustique. Enfin, les performances de transmission des variants viraux obtenus au bout des différents passages successifs *in vitro* et *in vivo* ont été évaluées chez le moustique.

Passages *in vitro*. Des cellules de moustiques U4.4 et Aag2 ont été infectées avec les clones infectieux du CHIKV E1-226A et E1-226V puis incubées à 20°C ou 28°C. Après une période d'incubation de 2 jours, les productions virales sont récoltées et 1/10^e des suspensions virales sont utilisées pour infecter de nouvelles cellules. Chaque production virale représente un passage. Nous avons réalisé 30 passages en réplicat, des deux clones infectieux, sur les deux types cellulaires et soumis aux deux températures (Figure 36). Le suivi de l'évolution virale s'est fait par séquençage des populations virales des passages 10, 20 et 30. Afin d'évaluer le caractère réversible des changements observés au terme des 30 passages, 10 passages additionnels ont été effectués en inversant la température de maintien initiale (Figure 36). Par exemple, un virus qui est maintenu à 20°C pendant les 30 premiers passages passe à 28°C du

passage 31 au passage 40. Les populations virales des passages 40 (P40) sont également examinées par séquençage.

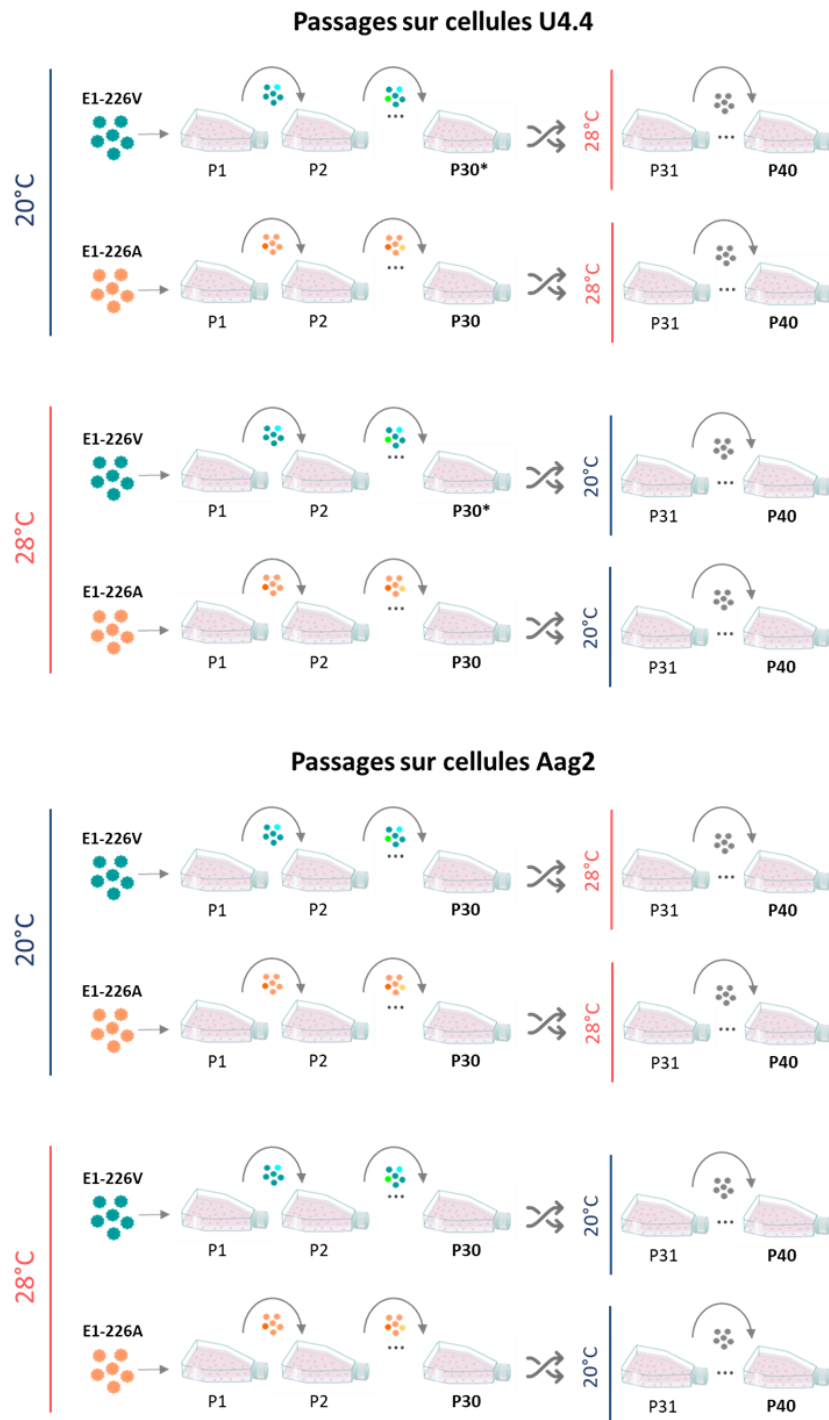


Figure 36. Représentation schématique des passages des clones du CHIKV *in vitro* à 20°C et 28°C. Chaque condition expérimentale a été réalisée en réplicat. Les passages 10, 20, 30 et 40 ont été analysés par séquençage. L’astérisque montre les passages 30 (P30) qui ont été utilisés pour initier les passages *in vivo* (voir figure 37). A partir du P31, la température de maintien initiale est inversée.

Passages *in vivo*. Loin de représenter un organisme entier, le modèle d'évolution expérimentale sur cellules de moustiques exclut une grande partie de la complexité des interactions virus-moustiques qui façonnent la sélection des variants viraux, notamment lors du franchissement des barrières anatomiques du moustique (voir section 1.1.2.2 du chapitre 1). Notre approche expérimentale de l'effet de la température sur l'évolution virale a été complétée par une étude d'évolution virale *in vivo*, chez le moustique *Ae. albopictus*. Cette expérience consiste à infecter des moustiques lors d'un repas sanguin infectieux puis à les incuber à 20°C ou 28°C. A la fin de la période d'incubation, les salives des moustiques ont été collectées et les virus présents dans les salives sont amplifiés sur cellules C6/36. Les productions virales ainsi obtenues sont utilisées pour infecter par voie orale (repas à 10⁷ ffu/mL) de nouveaux lots de moustiques (procédure décrite pour le DENV dans (Bellone et al., 2020)). Chaque production virale issue des virus présents dans les salives des moustiques représente un passage. Nous avons réalisé aux deux températures et en réplikat, cinq passages *in vivo* avec d'une part le clone infectieux E1-226V initial (P0-V) et d'autre part, les passages 30 du clone infectieux E1-226V sélectionnés sur cellules U4.4 à 20°C et 28°C (P30-V-20°C et P30-V-28°C) (Figure 37). Les passages *in vivo* du P0-V permettent d'évaluer comment le virus évolue en fonction de la température chez le moustique. Alors que les passages *in vivo* des virus préalablement passés 30 fois sur cellules U4.4, permettent de définir si une préadaptation à la température *in vitro* apporte un certain avantage sélectif une fois passé chez le moustique.

En parallèle, les virus utilisés pour initier les passages *in vivo*, ont également été passé cinq fois (en réplikat) sur cellules C6/36. Ce contrôle permet de s'assurer que les mutations virales sélectionnées chez le moustique ne sont pas liées à la phase d'amplification sur cellules des virus issus des salives infectieuses.

Les populations virales obtenues à l'issue des cinq passages *in vivo* de même que les contrôles qui y sont associés ont été examinées par séquençage.

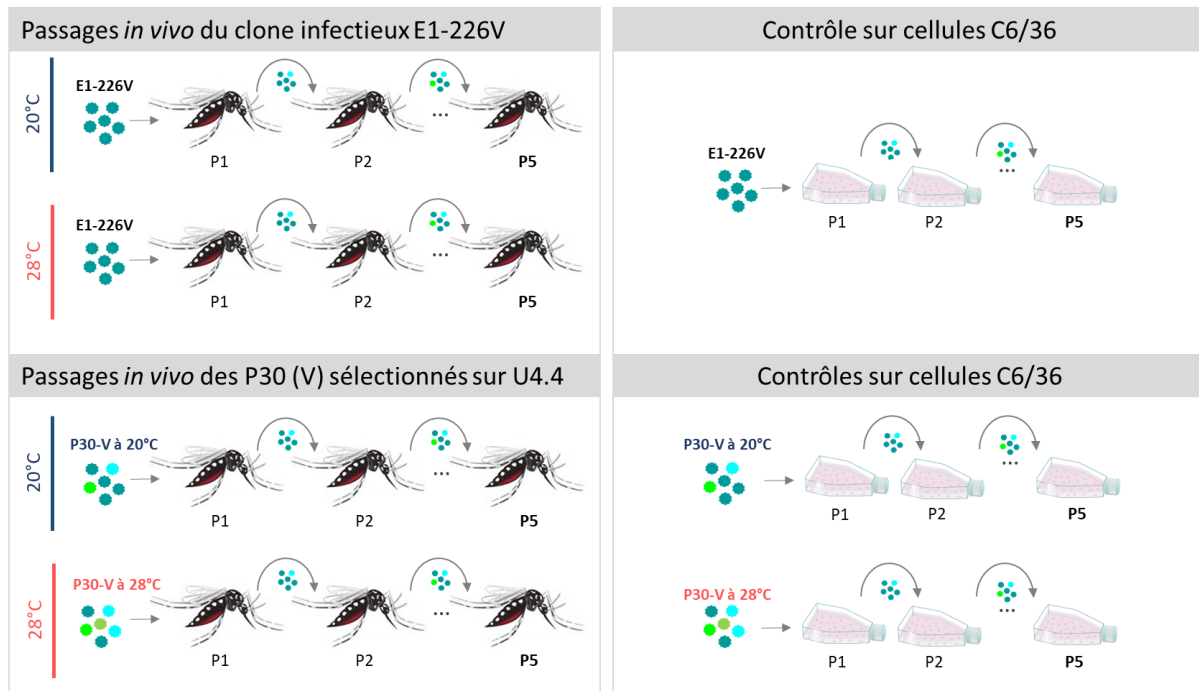
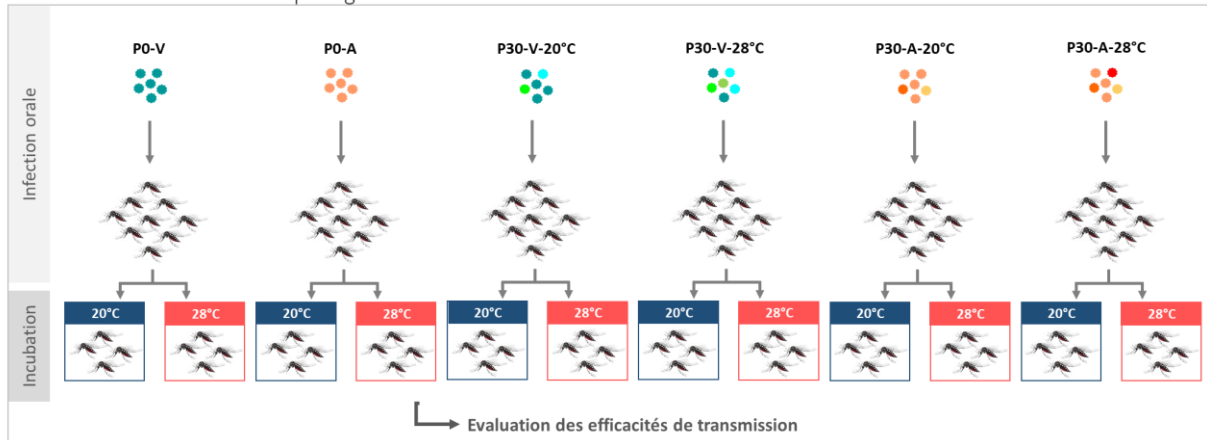


Figure 37. Représentation schématique des passages *in vivo*, chez le moustique *Ae. albopictus*. Chaque condition expérimentale a été réalisée en réplikat. Les passages du cadre du bas sont réalisés avec les réplikat biologiques des P30 du clone infectieux E1-226V sélectionnés à 20°C (en bleu) ou à 28°C (en rouge) sur cellules U4.4 (voir figure 36). Entre chaque passage sur moustique, il y a une étape d'amplification virale sur cellules C6/36 (non schématisée ici). Des passages contrôles sont donc effectués (en réplikat) pour chaque virus utilisé pour initier les passages *in vivo*. Les P5 *in vivo* et leurs contrôles (P5 C6/36) ont été analysés par séquençage.

Transmission par *Ae. albopictus* des variants viraux générés. Afin d'évaluer les performances de transmission des variants générés à la suite des passages successifs *in vitro* (P30-U4.4) et *in vivo* (P5), nous avons procédé à des infections expérimentales de moustiques *Ae. albopictus* avec ces virus. Une analyse de l'efficacité de transmission de chaque virus est réalisée à 20°C et à 28°C (voir section 5.4 du chapitre 5), indifféremment de la température de maintien lors des passages (Figure 38). Nous testons l'hypothèse selon laquelle le maintien par passages successifs d'un virus à une température donnée conduira à l'adaptation du virus à cette température et augmentera finalement l'efficacité de transmission par le moustique lorsqu'il est incubé à cette même température (Figure 39). Nous évaluons deux paramètres chez le moustique *Ae. albopictus* : l'adaptation et la sensibilité des variants viraux à la température. L'adaptation est déterminée en comparant les performances de transmission des variants viraux à celles des clones infectieux initiaux E1-226V ou E1-226A (P0-V ou P0-A). La sensibilité à la température des variants viraux est estimée en comparant les performances de transmission

d'un même variant viral chez des moustiques incubés après infection à 20°C *versus* ceux à 28°C (Figure 39).

Efficacités de transmission des passages *in vitro*



Efficacités de transmission des passages *in vivo*

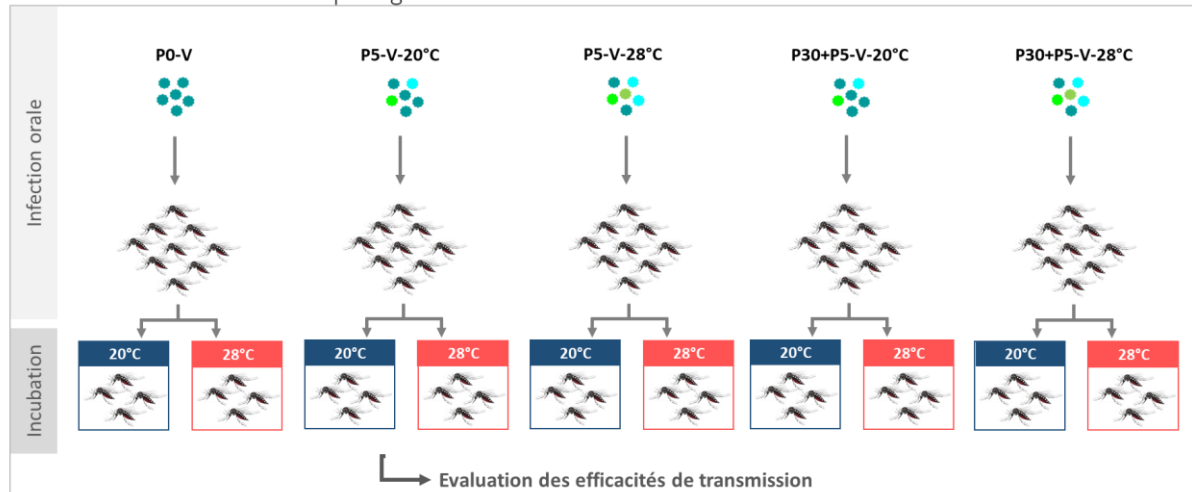


Figure 38. Représentation schématique des évaluations d'efficacité de transmission des variants sélectionnés *in vitro* (en haut) et *in vivo* (en bas). Chaque infection avec un variant représente en réalité deux infections, avec chacun des réplicats sélectionnés.

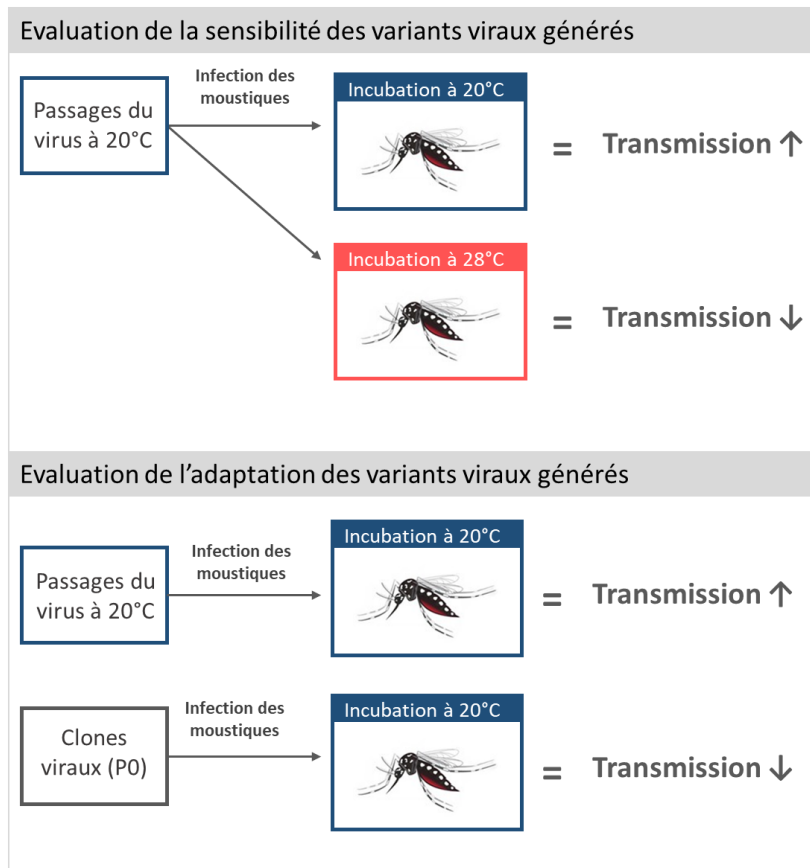


Figure 39. Représentation schématique de nos hypothèses en lien avec l'adaptation et la sensibilité à la température des variants viraux.

6.1.3. Résultats

Passages *in vitro*. Les analyses de séquençage des P30 montrent que le CHIKV emprunte des trajectoires évolutives différentes en fonction de la température, du type cellulaire et du clone viral. De façon intéressante nous avons remarqué que le clone viral E1-226V portant une valine en position 226 de la glycoprotéine d'enveloppe E1 subit systématiquement un changement d'acide aminé de valine vers alanine à cette même position et cela uniquement sur les cellules Aag2. L'apparition de cette mutation est plus tardive à 20°C qu'à 28°C.

Par ailleurs, des mutations spécifiques de la température ont été identifiées pour chaque type cellulaire. Sur U4.4, la mutation E2-T96I a été retrouvée dans les réplicats des deux virus (A et V) uniquement à 28°C. Sur Aag2, la température de 20°C a permis la sélection de la mutation E2-Y9H pour les réplicats des deux virus (A et V).

De manière plus générale, on remarque que le virus V présente plus de mutations que le virus A tandis que sur U4.4, l'inverse est observé. La glycoprotéine de surface E2 semble être un site mutationnel préférentiel (hotspot).

Les analyses du séquençage des P40 sont en cours. Toutefois, les premières données indiquent un effet différent de l'inversion de la température sur U4.4 et Aag2.

Plus de détails sont donnés dans la section 6.1.5. Article.

Passages *in vivo*. Les résultats du séquençage des P5 *in vivo* sont également en cours d'analyse. Les premières données montrent que les réplicats évoluent de manière relativement indépendante. Aucune mutation à une fréquence supérieure à 10% et partagée entre réplicats n'a été identifiée comme étant spécifique de la température, 20°C ou 28°C.

Plus de détails sont donnés dans la section 6.1.5. Article.

Transmission par *Ae. albopictus* des variants viraux générés. Les performances répliquatives des variants viraux obtenus à la suite des passages successifs *in vitro* sur cellules U4.4 et *in vivo* chez *Ae. albopictus* ont été évaluées par des analyses d'efficacité de transmission chez *Ae. albopictus*.

Pour les passages successifs *in vitro*, aucun des variants générés (P30) ne présentaient de meilleures capacités de transmission par *Ae. albopictus* en comparaison aux clones infectieux initiaux (P0-V et P0-A), après incubation à la température de maintien des variants (Figure 40). Les variants viraux issus du clone infectieux E1-226V et obtenus après 30 passages sur cellules U4.4 à 20°C (P30-V-20°C, réplicat 1 et 2) étaient transmis (incubation à 20°C) de façon similaire au clone initial E1-226V (P0-V) à 6 et 9 jours post-infection (jpi) ($p > 0,05$) (Figure 40 ; A). Les P30-V-28°C étaient moins bien transmis (incubation à 28°C) que le P0-V aux deux jpi ($p < 0,01$, sauf pour le réplicat 2 à 9 jpi pour lequel la différence était non significative) (Figure 40 ; B). Les réplicats P30-A-20°C étaient significativement moins bien transmis (incubation à 20°C) que le P0-A à 9 jpi. A 6 jpi, ni le P0-A ni les P30-A-20°C n'étaient transmis par le moustique (Figure 40 ; C). Les P30-A-28°C présentaient à 6 jpi de moins bonnes efficacités de transmission que le P0-A (incubation à 28°C) ($p < 0,05$), tandis qu'à 9 jpi ces différences n'étaient pas significatives ($p > 0,05$) (Figure 40 ; D).

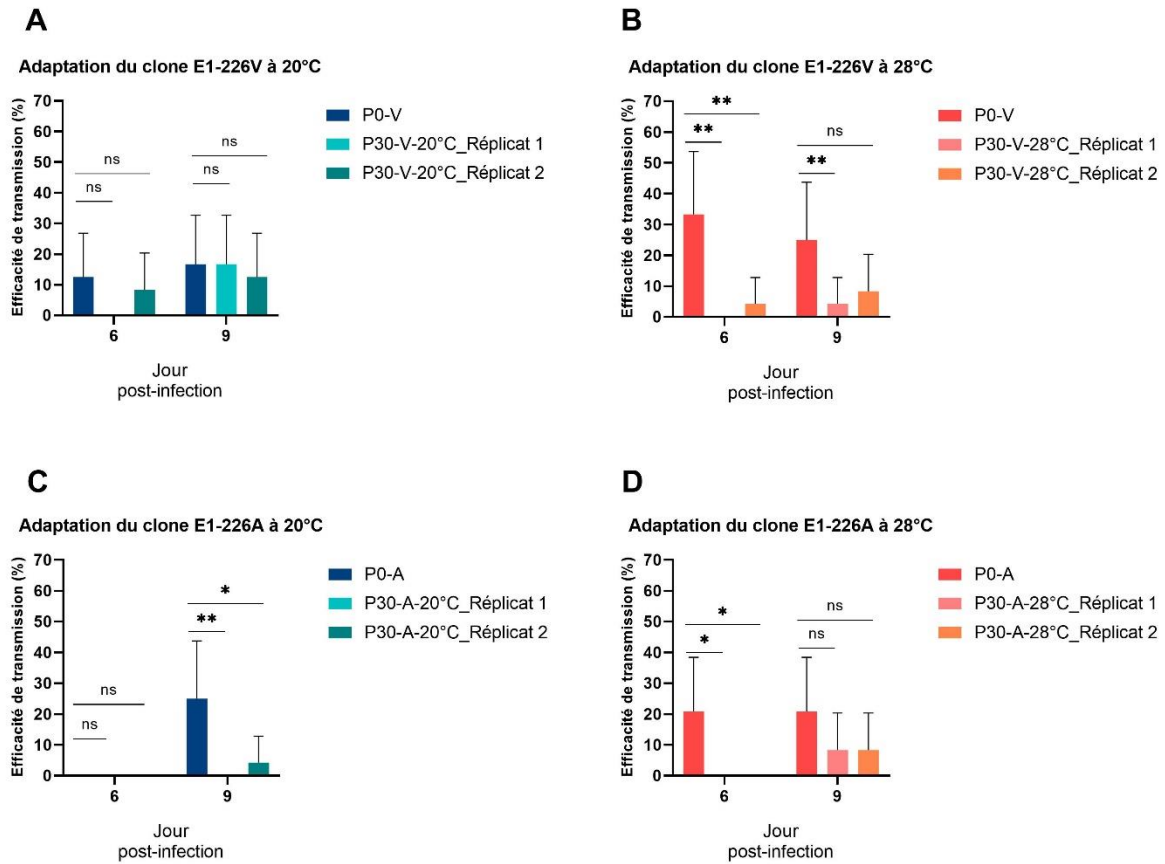


Figure 40. Evaluation de l'adaptation à la température des variants viraux générés *in vitro* (P30/U4.4) chez le moustique *Ae. albopictus*.

Les variants sélectionnés après 30 passages sur cellules U4.4 ne présentaient pas de sensibilité à la température (Figure 41). L'évaluation des efficacités de transmission de chacun des variants (P30-V-20°C, P30-V-28°C, P30-A-20°C et P30-A-28°C) après incubation des moustiques à 20°C et à 28°C, montre que le maintien du virus à une température donnée ne conduit pas à la sélection de variants mieux transmis par le moustique maintenu à cette même température (Figure 41).

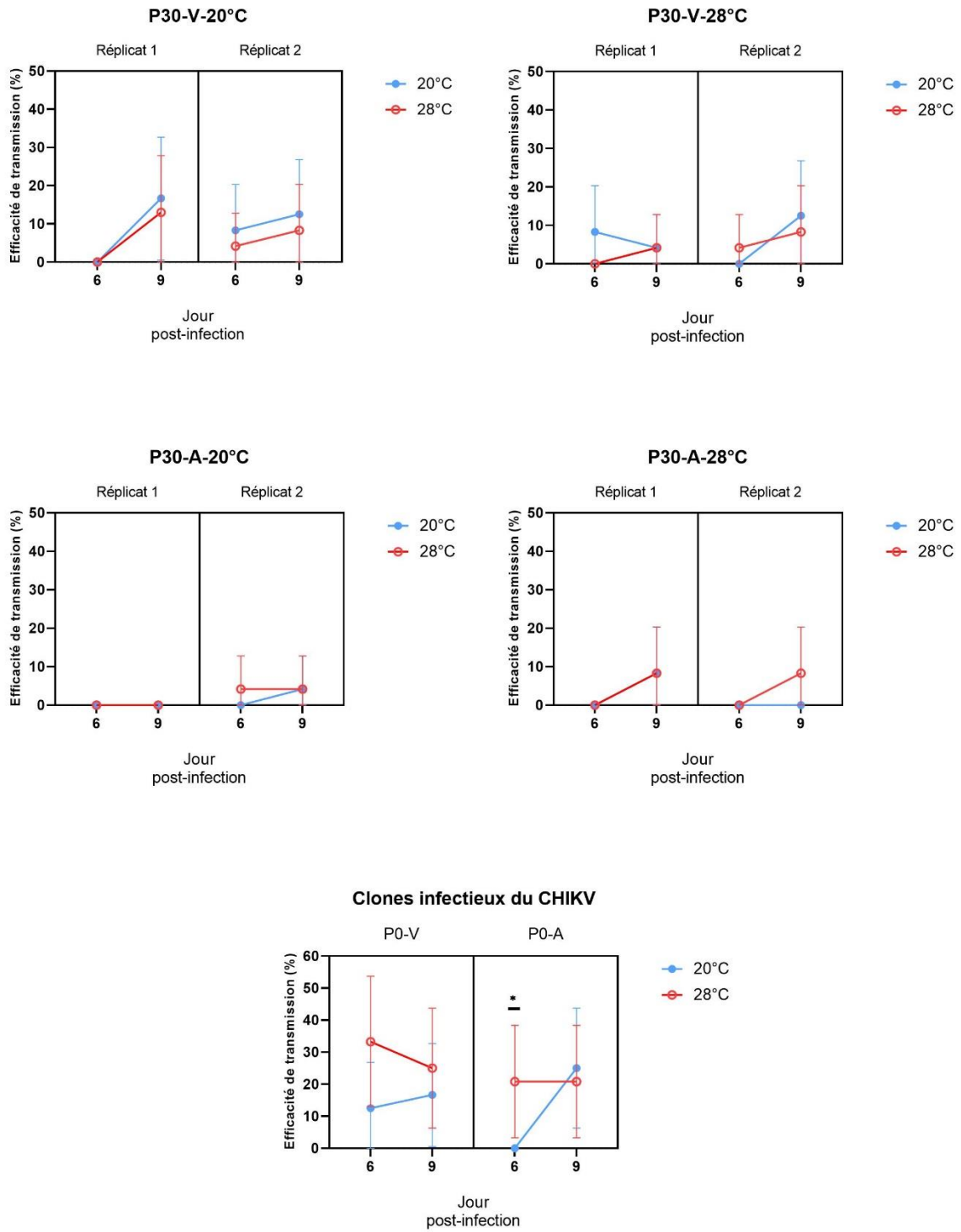


Figure 41. Evaluation de la sensibilité à la température des clones viraux initiaux (P0-V et P0-A) et des variants viraux générés *in vitro* (P30/U4.4) chez le moustique *Ae. albopictus*.

Les variants issus des passages successifs sur moustique (P30+P5-V-20°C, P30+P5-V-28°C, P5-V-20°C et P5-V-28°C) présentaient des capacités de transmission par *Ae. albopictus*

similaires au clone infectieux initial (P0-V), après incubation à la température de maintien des variants ($p>0,05$) (Figure 42). Les seules différences significatives ont été observées pour le réplicat 1 du P30+P5-V-20°C, qui à 9 jpi, était moins bien transmis que le P0-V ($p=0,012$) (Figure 42, A), et pour le réplicat 2 du P30+P5-V-28°C, qui à 9 jpi, était mieux transmis que le P0-V ($p=0,02$) (Figure 42, B).

Concernant la sensibilité à la température des variants sélectionnés *in vivo*, les seules différences significatives ont été observées pour le réplicat 1 P30+P5-V-20°C, qui malgré un maintien à 20°C, était mieux transmis à 28°C qu'à 20°C à 9 jours pi ($p=0,003$) (Figure 43, A), et pour le réplicat 2 du P30+P5-V-28°C, qui était après un maintien à 28°C était mieux transmis à 28°C qu'à 20°C ($p=0,026$) (Figure 43, B).

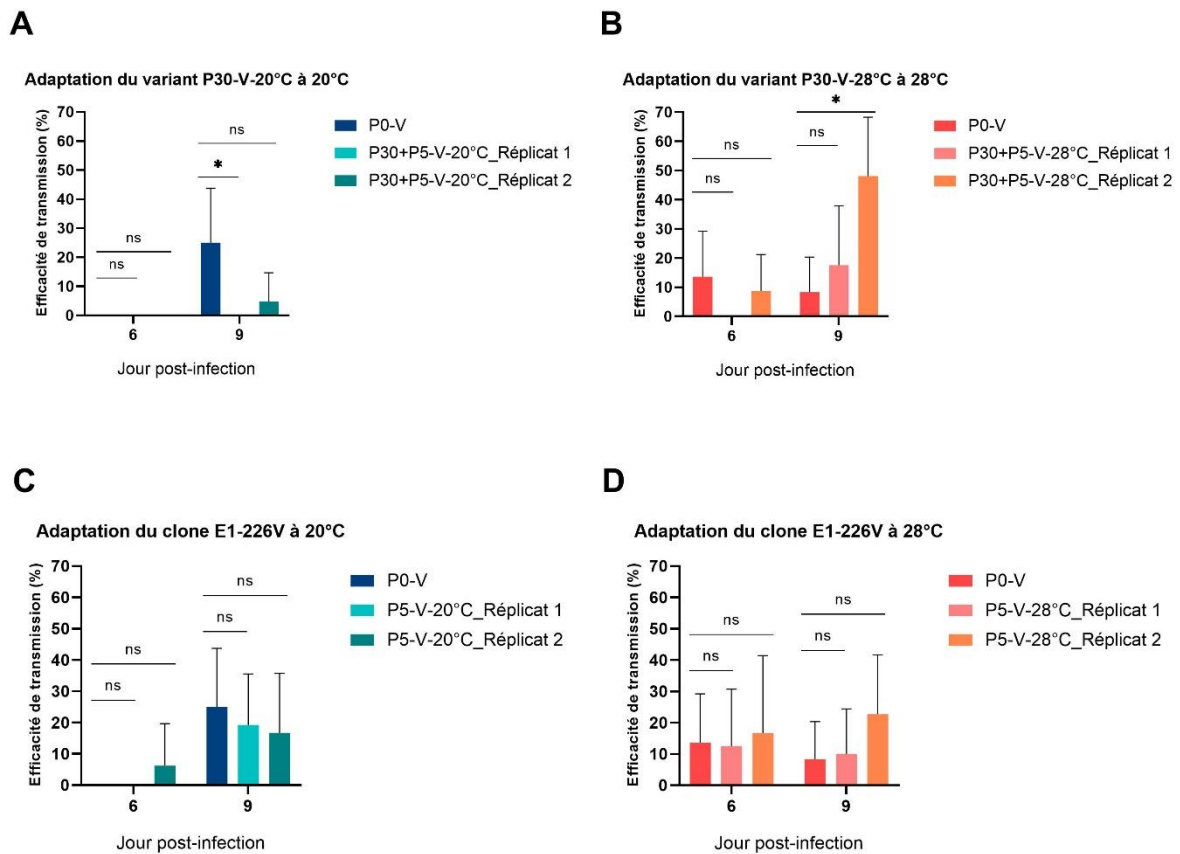


Figure 42. Evaluation de l'adaptation à la température des variants viraux générés *in vivo* (P5 et P30+P5) chez le moustique *Ae. albopictus*.

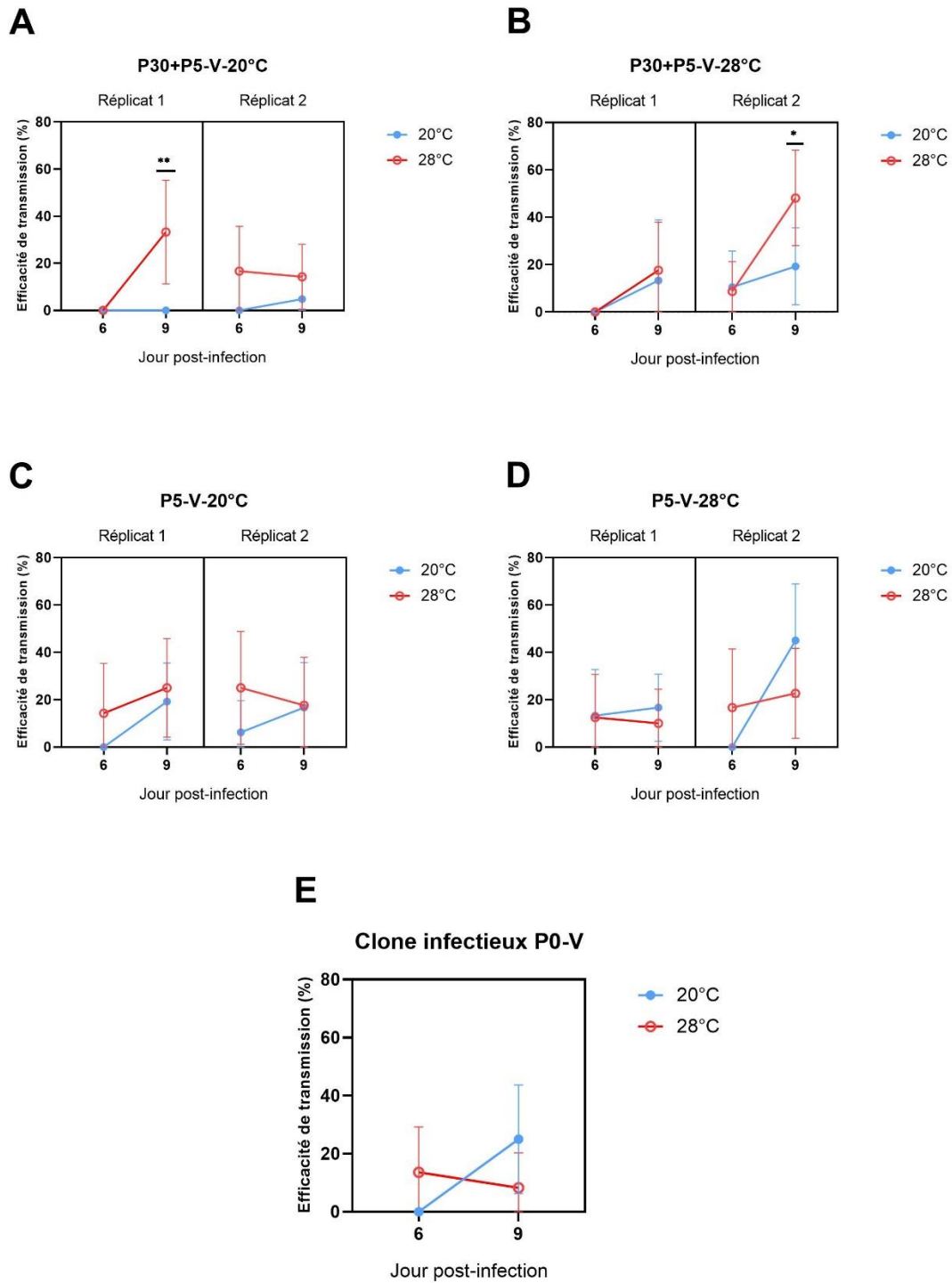


Figure 43. Evaluation de la sensibilité à la température des clones viraux initial E1-226V (P0-V) et des variants viraux générés *in vivo* (P5 et P30+P5) chez le moustique *Ae. albopictus*.

Le nombre de femelles analysées pour chaque condition expérimentale est précisé en Annexe 2 et 3.

6.1.4. Conclusion

La capacité d'un arthropode vecteur à acquérir puis à transmettre un agent pathogène à un hôte vertébré dépend à la fois de facteurs biotiques et abiotiques. Étant des organismes poïkilothermes, les moustiques sont très sensibles aux variations de température et par conséquent, des effets sur la réplication et la transmission des agents pathogènes qu'ils véhiculent, sont attendus. Les maladies à transmission vectorielle, habituellement retrouvées dans les régions tropicales, deviennent de plus en plus fréquentes en Europe, en lien avec l'implantation d'espèces invasives assurant la transmission locale des agents pathogènes. Nous avons émis l'hypothèse selon laquelle la transmission à basse température pourrait être améliorée par la sélection de variants viraux plus adaptés à la réplication à basse température. En utilisant un système expérimental de sélection virale, reposant sur des passages viraux successifs sur cellules de moustiques maintenues à 20°C ou à 28°C, nous avons démontré que le CHIKV suivait des trajectoires évolutives distinctes en fonction du virus, du type cellulaire et de la température. Des mutations spécifiques de la température ont été identifiées à 28°C sur cellules U4.4 d'*Ae. albopictus* et à 20°C et 28°C sur cellules Aag2 d'*Ae. aegypti*. Les variants obtenus au terme des 30 passages sur cellules U4.4 ne présentaient cependant, aucun avantage répliatif lors de l'évaluation des efficacités de transmission chez le moustique *Ae. albopictus* exposé à la température utilisée pour la sélection virale. Les virus maintenus sur cellules semblent avoir perdu leurs capacités répliatives (franchissement des barrières anatomiques) chez le moustique. Nous avons donc complété notre étude d'évolution expérimentale en réalisant une expérience d'évolution du CHIKV *in vivo*. Les premiers résultats indiquent qu'au bout de cinq passages *in vivo*, les virus ne subissent pas de changements génétiques significatifs, ce qui signifie que la sélection expérimentale à l'aide de moustiques peut limiter la diversification virale et l'adaptation à la température. Comme pour les passages *in vitro*, les virus obtenus à l'issue des passages *in vivo*, ne présentaient pas de meilleures capacités de transmission par le moustique *Ae. albopictus*.

6.1.5. Article

Genetic changes after experimental selection of chikungunya virus by temperature

Rachel Bellone,^{1,2} Pierre Lechat,³ Laurence Mousson,¹ Chloé Bohers,¹ Andres Merits,⁴ Géraldine Piorkowski,^{5,6} Yoann Madec,⁷ Xavier de Lamballerie,^{5,6} Catherine Dauga^{1,*} and Anna-Bella Failloux^{1,*,#}

¹ Department of Virology, Institut Pasteur, Arboviruses and Insect Vectors Unit, Paris, France

² Sorbonne Université, Collège Doctoral, F75005 Paris, France

³ Hub Bioinformatique et Biostatistique, Institut Pasteur, Paris, France

⁴ University of Tartu, Institute of Technology, Tartu, Estonia

⁵ Aix Marseille University, IRD French Institute of Research for Development, EHESP French School of Public Health, EPV UMR_D 190 'Emergence des Pathologies Virales', Marseille, France

⁶ IHU Méditerranée Infection, APHM Public Hospitals of Marseille, Marseille, France

⁷ Unité de Recherche et d'Expertise Epidémiologie des Maladies Emergentes, Département de Santé Globale, Institut Pasteur, Paris, France

*co-last authors

#Corresponding author: anna-bella.failoux@pasteur.fr (ABF)

Abstract

As an RNA virus, chikungunya virus (CHIKV) possesses replicative properties allowing rapid evolution and consequently, high adaptation potential to environmental changes. Currently, very little is known on how temperature might influence evolution and phenotypes of arboviruses. To characterize evolutionary trajectories associated with temperature, we performed serial passages of two CHIKV infectious clones in *Ae. albopictus* (U4.4) and *Ae. aegypti* (Aag2) cells maintained at 20°C and 28°C. We analyzed genetic changes influenced by temperature, mosquito cell type and infectious clone. Our results demonstrated cell, virus and temperature specific mutations. We identified mutations at the position 226 of the E1 glycoprotein: (1) from an Ala to Val when CHIKV was serially passaged at 20°C in *Ae. albopictus* U4.4 cells and (2) from a Val to an Ala when CHIKV was passaged at 20°C or 28°C in *Ae. aegypti* Aag2 cells. Mutations specific to temperature were identified for each cell type. On U4.4 cells, the E2-T96I mutation was found specific to 28°C whereas on Aag2 cells, the E2-Y9H mutation was selected by a temperature of 20°C.

Keywords: chikungunya virus, temperature, genetic evolution, *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti*.

Introduction

First identified in Tanzania in 1952 (Robinson, 1955), the chikungunya virus (CHIKV) is an emerging mosquito-borne virus which has widely spread around the world in the last two decades. Described as an acute febrile affection characterized by chronic arthralgia and skin rash in humans, CHIKV became a major issue responsible for explosive outbreaks across the globe and for which, no treatment nor vaccine is available so far. CHIKV is a small, enveloped, single-stranded positive-sense RNA virus from the *Alphavirus* genus in the *Togaviridae* family. The genome of an approximate length of 12 kb contains two open reading frames (ORFs) connected by a non-coding region and encoding for non-structural (nsp) and structural proteins, respectively.

A striking attribute of RNA viruses is their high mutation rate (Domingo & Holland, 1997; Drake & Holland, 1999; Steinhauer & Holland, 1987). During viral RNA replication, mutations are frequently incorporated into the genome due to low fidelity of viral RNA-dependent RNA polymerases (RdRP), and absence of proofreading activity and mismatch repair system (Steinhauer, Domingo, & Holland, 1992). This error-prone replication mode, is responsible for continuous generation of intra-population genetic diversity which results in genetic plasticity and consequently, high adaptability of RNA viruses (Domingo & Perales, 2019; Pfeiffer & Kirkegaard, 2005). One notable example of this adaptive potential of RNA viruses, is that of CHIKV (East-Central-South African genotype, ECSA) to the mosquito *Aedes albopictus*. The exclusive transmission of CHIKV by *Ae. albopictus* during the epidemic on La Réunion Island in 2005-2006 favored the emergence of a viral variant carrying an amino acid substitution (alanine by valine) at position 226 of the E1 envelope glycoprotein (Schuffenecker et al., 2006). This mutation was responsible for a significant increase of CHIKV infectivity in *Ae. albopictus* leading to a better vector competence for the virus (Tsetsarkin, Vanlandingham, McGee, & Higgs, 2007; Vazeille et al., 2007). In the typical mosquito vector *Ae. aegypti*, the mutation had no significant effect on vector competence, demonstrating the specificity of the E1-226V variant selection (Tsetsarkin et al., 2007).

Since mosquitoes are poikilothermic ectotherms (i.e., internal body temperature is not constant and depends on environmental temperatures), in addition to specific genetic factors, viruses have to deal with temperature variations within their vector host. This raises the question of how temperature may affect virus genetic evolutionary patterns and selection of new variants.

To characterize evolutionary trajectories associated with temperature, we performed serial passages of two CHIKV infectious clones (E1-226V and E1-226A) in *Ae. albopictus* (U4.4) and *Ae. aegypti* (Aag2) cells maintained at 20°C and 28°C. Serial passages were also completed *in vivo*, on *Ae. albopictus* mosquitoes incubated at 20°C and 28°C. We analyzed genotypic changes influenced by temperature, mosquito cell type and infectious clones.

Material and Methods

Ethics statement. Animals were housed in the Institut Pasteur animal facilities (Paris) accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on live rodents. Work on animals was performed in compliance with French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 2010/63, French Law 2013-118, February 6th, 2013). All experiments were approved by the Ethics Committee #89 and registered under the reference APAFIS (Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des Fins Scientifiques) #6573-2016061412077987 v2.

Cells. *Ae. albopictus* cells (U4.4 and C6/36) were maintained in Leibovitz L-15 medium (Life Technologies CA, USA) with non-essential amino acids (1X) (Life Technologies CA, USA), penicillin/streptomycin (100 U/ml and 100 µg/ml, respectively) (Dominique Dutscher, Brumath, France) and supplemented with 10% of FBS. *Ae. aegypti* (Aag2) were maintained in Schneider's medium (Thermo Fisher Scientific, USA) with L-glutamine, penicillin/streptomycin (100 U/ml and 100 µg/ml, respectively) (Dominique Dutscher, Brumath, France) and supplemented with 10% of FBS. U4.4 and Aag2 cell lines were used for CHIKV serial passages. C6/36 cell line is a RNAi deficient cell line (Brackney et al., 2010) and was used for virus amplification and titration.

Infectious viral clones. We used two CHIKV infectious clones (ICRES1), kindly provided by Prof. Andres Merits (Institute of Technology, Tartu, Estonia). The infectious clones were derived from the LR2006-OPY1 CHIKV, isolated from the serum of a febrile patient returning from La Réunion Island (La Réunion, ECSA genotype, Accession no. DQ443544.2) (Parola et al., 2006).

The two clones are distinguished by an amino acid difference at position 226 of the E1 envelope glycoprotein. The first clone harbors a valine at position E1-226, naturally present in the viral strain, while the second clone carries an alanine at this same position, inserted by genome

editing. Infectious clones were produced on BHK-21 cells (Baby Hamster Kidney, ATCC) and stored at -80°C prior use. Viral titers estimated by focus-forming assay on C6/36 cells was $10^{9.15}$ focus-forming units per mL (FFU/mL) for the E1-226V (named virus V) clone and $10^{8.34}$ FFU/mL for the clone E1-22A (named virus A).

Mosquitoes. *Ae. albopictus* eggs were sampled in July 2018 in Montpellier, France, using ovitraps (1047 individuals were used to start the colony). The location of Montpellier was chosen as autochthonous CHIKV cases were detected there in 2014 (Delisle et al., 2015). In insectaries, eggs were hatched in 1 L of dechlorinated tap water. Larvae were split in pans of 200 individuals and were fed with yeast tablets (Gayelord Hauser). Water and food were renewed every 2 days. Immature stages were maintained at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Emerging adults were reared in cages at $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a 12:12 light:dark cycle, 80% relative humidity and fed with a 10% sucrose solution *ad libitum*. To amplify the population, females were blood-fed three times a week on anaesthetized mice (OF1 mice, Charles River laboratories, France). The fifth and the sixth generations in laboratory were used for serial passages *in vivo*.

Serial passages *in vitro*. We used the two infectious clones to initiate serial passages on U4.4 and Aag2 cells. Sub-confluent cells prepared in 25 cm^2 flasks were infected in duplicates at a MOI of 0.1. Cells were then incubated at 28°C for adsorption. After 1 h, cells monolayers were rinsed (with L-15 or Schneider medium depending on the cell) and then covered with 5 mL of fresh medium supplemented with 2% FBS. Afterwards, cells were incubated at 20°C or 28°C in climatic chambers (Binder, KB 53, Tuttlingen, Germany). After 2 days of incubation, supernatants were harvested, centrifuged at 1,000 g for 5 min and a solution of sodium bicarbonate (Life technologies, CA, USA) was added to adjust the pH to 7. From passage 2 to 40, passages were completed using 500 μL of the previous passage as inoculum. From passage 31 to 40, the initial temperature was inverted; passages maintained at 20°C were placed at 28°C for 10 additional passages and *vice-versa*. Genetic viral evolution was monitored by sequencing of passages 10, 20, 30 and 40. Passages titers were assessed every five passages (see virus titration) (Figure S1).

Serial passages *in vivo*. The parental infectious clone E1-226V (P0-V) and the P30 on U4.4 of the clone E1-226V (P30-V- 20°C and P30-V- 28°C) were used to initiate serial passages on the mosquito *Ae. albopictus*. Mosquitoes were orally challenged with these viruses provided in a blood-meal (washed rabbit erythrocytes) at a final titer of 10^7 FFU/mL. Engorged females were incubated at 20°C or 28°C in climatic chambers (Binder, KB 53, Tuttlingen, Germany) with a

14:10 light:dark cycle, 80-90% relative humidity. After 9 days of incubation, saliva of about 20 mosquitoes (per experimental condition) were collected (as described in (Vega-Rua et al., 2013)) and then pooled in 500 μ L of L-15 medium prior filtration through a Millipore H membrane (0.22 μ m). The filtrate of each sample was used to inoculate a sub-confluent 25 cm² flask of C6/36 cells. After 1 h, the inoculum was removed and cells were rinsed with medium. L-15 medium (5 mL) complemented with 2% FBS was added and cells were incubated for 3 days at 28 °C. Supernatants were then collected, titrated and provided (in a blood meal at 10⁷ FFU/mL) to new batches of mosquitoes to run the next passage. We carried out in replicates a total of five passages *in vivo*. Passages 2 were performed with head/thorax homogenates of passages 1, as infectious saliva were at very small viral titers. Control isolates corresponded to serially passaged viruses on C6/36 cells to identify mutations of *in vivo* passages resulting from amplification phase on C6/36 cells.

Virus titration. Monolayers of C6/36 cells were inoculated with 50 μ L of diluted samples in 96-well plates. After an incubation of 1 h at 28°C, cells were overlaid with 1:1 mix of carboxymethyl cellulose and Leibovitz L-15 medium supplemented with 5% FBS. Following an incubation period of 3 days at 28°C, cells were fixed with 3.7% formaldehyde, washed 3 times in PBS 1X and stained using a hyper-immune ascetic fluid specific to CHIKV as the primary antibody and an Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG as the secondary antibody (Life Technologies, CA, USA). The number of focus-forming units was determined under a fluorescent microscope.

Viral genome deep sequencing. Viral RNAs were extracted from parental infectious clones (P0-V and P0-A), *in vitro* (P10, P20, P30 and P40) and *in vivo* passages (P5) using Nucleospin RNA II kit (Macherey-Nagel, Hœrdt, France) according to the manufacturer's instructions. Genomes were amplified using the reverse transcriptase Platinum® Taq High Fidelity polymerase enzyme (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA) with a set of primers presented in Table S1. PCR products were pooled in equimolar proportions. After Qubit quantification using Qubit® dsDNA HS Assay Kit and Qubit 4.0 fluorometer (ThermoFisher Scientific) amplicons were fragmented (sonication) into fragments of 200 bp long. Libraries were built adding barcode, for sample identification, and primers to fragmented DNA using AB Library Builder System (ThermoFisher Scientific). To pool equimolarly the barcoded samples, a quantification step by real time PCR using Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific) was realised. An emulsion PCR of the pools and loading on 520 chip was achieved using the automated Ion Chef instrument (ThermoFisher). Sequencing was performed

using the S5 Ion torrent technology (Thermo Fisher Scientific) following manufacturer's instructions.

Genome sequence analysis. The analysis covered the entire viral genome excluding the first 18 nucleotides of the 5'UTR and the 88 nucleotides upstream the polyA tail. High frequency variants (up to 0.1) and low frequency variants (as low as 0.005) of viral populations were characterized by using the ViVan pipeline (Isakov et al., 2015). For each sample, we obtained single-nucleotide polymorphism (SNPs), with position, coverage and residue annotation (reference and alternate nucleotide and amino acid change, if occurred).

Then, SNPs detected in viral genomes were visualized through SNPviewer, a bioinformatics tool in development at the Institut Pasteur (P. Lechat, Hub). This software allowed us to compare viral sequences of several samples with the reference sequence (CHIKV, mutation A), to detect fast- or low- evolving viruses and to identify mutation hot-spots.

In addition, ViVan, allowed us to compare two by two, samples of viral replicates sharing the same conditions of culture and temperature, in order to highlight significant mutations (or deletions), that are common to every replicate of one condition, but are not found in any replicate in the other condition (Table 1). Each SNP was selected as major or minority variants, if at least the frequency of one replicate reached the required threshold.

Results

Serial passages of infectious clones on mosquito cells.

General characteristics and patterns of detected substitutions. The overview of mutations distribution along the CHIKV genome revealed the presence of mutational hotspots. On U4.4 cells, hot spots were localized mainly in E2 and to a lesser extent, in nsp4 (Figure 1). On Aag2 cells, hotspots were identified in E2 and nsp4 for all experimental conditions and in nsp2 for the virus V at 20°C and 28°C (Figure 2). High frequency mutations ($\geq 10\%$; red lines) were mostly located in E2 (Figure 1 and 2). Overall, U4.4-V-20°C and Aag2-A-28°C were the two experimental conditions for which the fewest mutations were observed (Figure 1, 2 and 3).

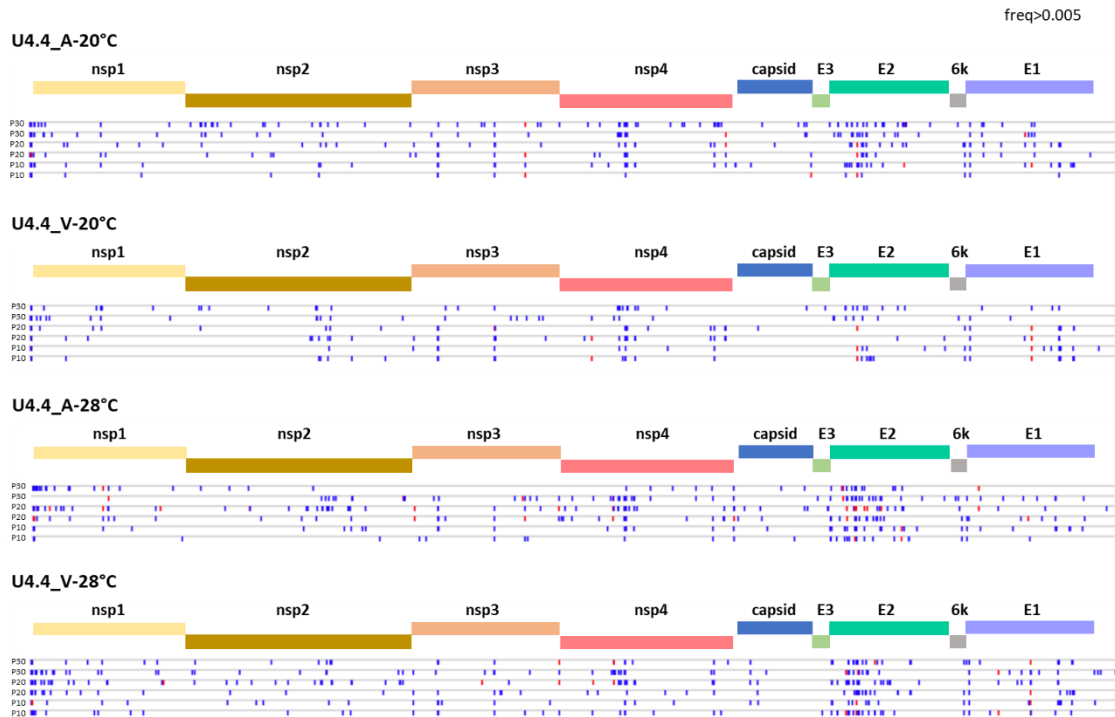


Figure 1. Distribution of substitutions on *Ae. albopictus* U4.4 cells. Horizontal bars schematize the CHIKV genome, each bar representing a protein whose name is specified above. Lines below correspond to a sample (P10, P20, P30 in replicates). SNP sites are shown as vertical lines with low frequency mutations (<10%) in blue and high frequency mutations (>10%) in red.

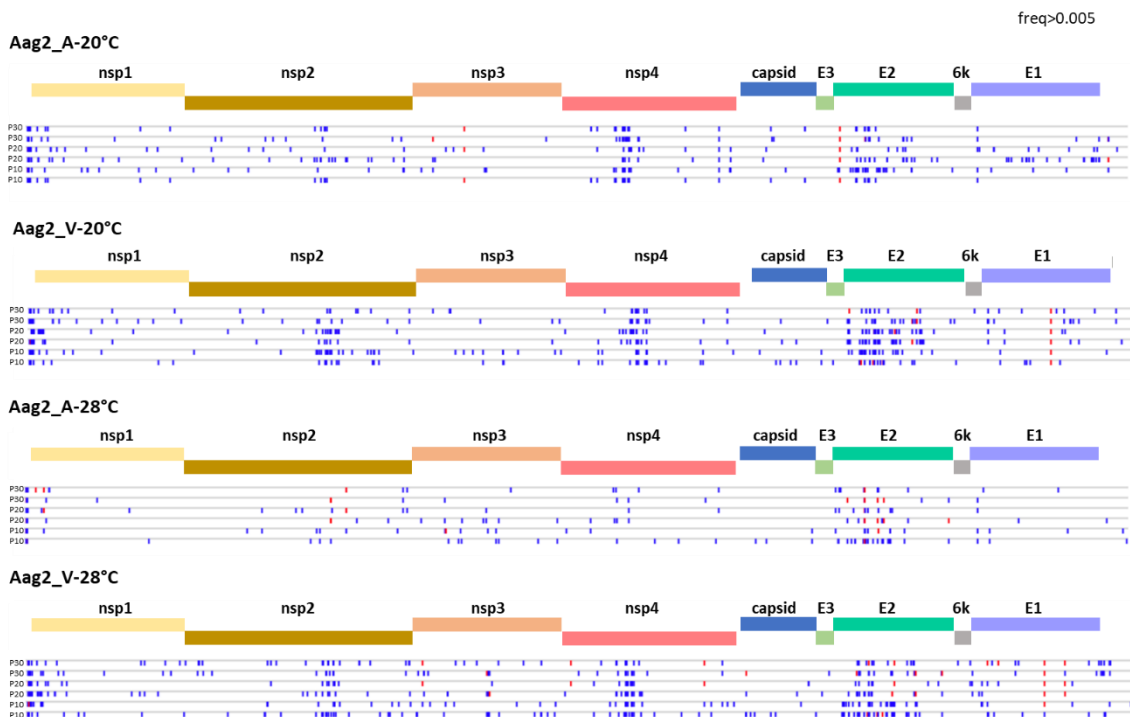


Figure 2. Distribution of substitutions on *Ae. aegypti* Aag2 cells. Horizontal bars schematize the CHIKV genome, each bar representing a protein whose name is specified above. Lines below correspond to a sample (P10, P20, P30 in replicates). Mutations positions are shown as vertical lines with low frequency mutations (<10%) in blue and high frequency mutations (>10%) in red.

Global SNP count revealed a higher genomic variability during serial passages on Aag2 cells (n=1137) than on U4.4 cells (n=873), particularly visible among substitutions at low frequencies (Figure 3, A and B). When considering substitutions with a frequency $\geq 10\%$, genetic variability was always higher at 28°C than at 20°C (Figure 3, C). Moreover, we noticed that the virus V (E1-226V) exhibited greater number of SNP than the virus A (E1-226A) on Aag2 cells at each temperature. Whereas, on U4.4 cells the opposite was observed; higher number of mutations was found for the virus A compared to virus V (Figure 3, C).

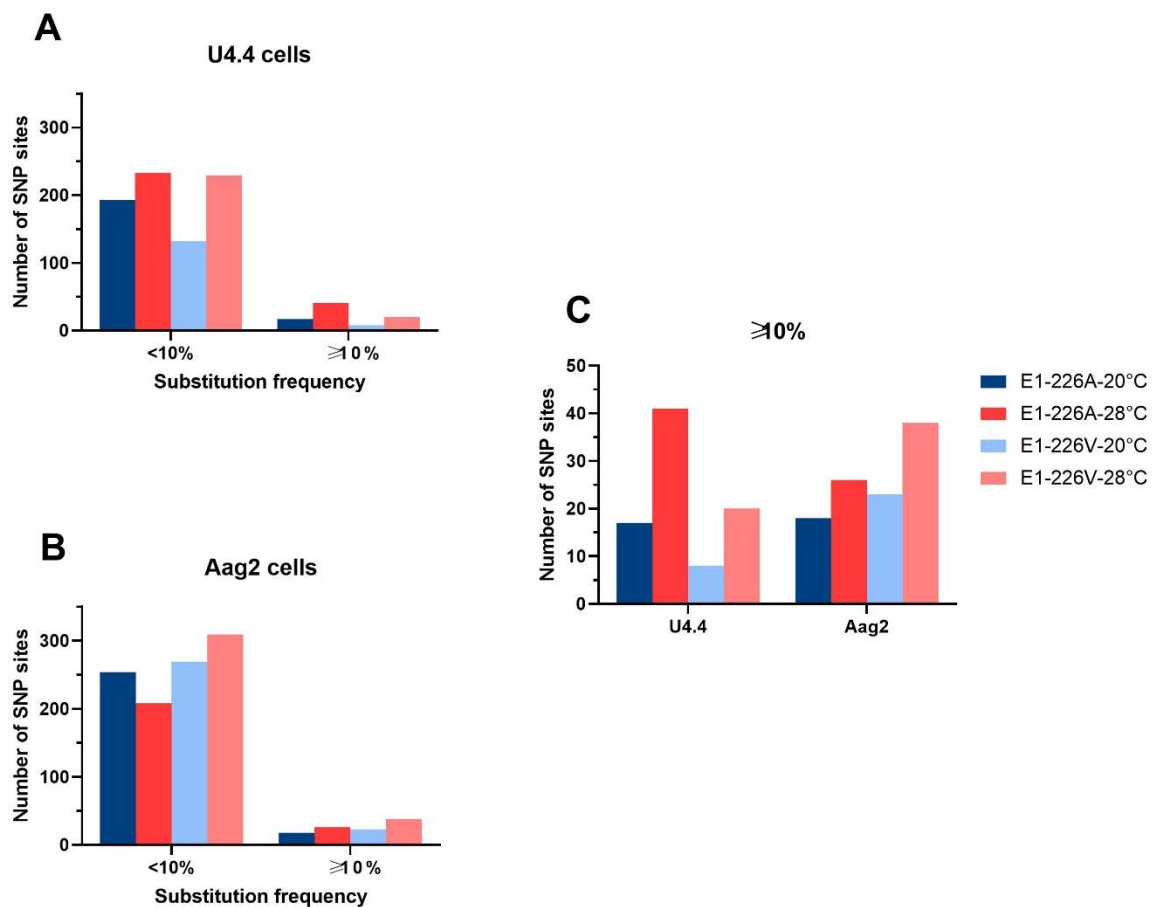


Figure 3. Number of single nucleotide polymorphism (SNP) sites detected on U4.4 (A and C) and Aag2 (B and C). Numbers of SNPs are the cumulated count of mutations of P10, P20 and P30 for each experimental condition.

Specific shared mutation analysis. In order to characterize genetic changes resulting from the 30 passages *in vitro*, we identified mutations shared between replicates that were related to the virus (E1-226V and E1-226A) or to specific adaptation to mosquito cells or temperature (Table 1).

By comparing mutations found on U4.4 cells and Aag2 cells at 20°C, we pinpointed cell specific mutations. The two mutations specific to U4.4 cells were located in nsp2 (nucleotide position 764) and E1 (nucleotide position 10670). The mutation in E1 corresponded to a switch from alanine to valine (E1-A226V) of the two P30-A-20°C replicates at frequency of 1%. The two mutations specific to Aag2 cells were situated at the nucleotide position 7294 (nsp4) and 8566 (E2). At 28°C, no shared mutation between all replicates of both viruses was unique to U4.4 or Aag2 (Table 1).

Some mutations were found to be specific to the viral clone (A or V) used to initiate passages. On U4.4 cells, the mutation at the position 9100 (E2) was found in P30-A-20°C replicates but not in that of P30-V-20°C. While the mutation at the position 6227 (nsp4), was present in P30-V-28°C replicates but not in those of P30-A-28°C. Similarly, on Aag2 cells, the mutation at the position 8964 (E2) was found specific to P30-A-28°C compared to P30-V-28°C. Interestingly, on Aag2 cells, a switch from valine to alanine (nucleotide position 10670, E1-V226A) was observed for the virus V at both temperatures at very high frequencies (P30-V-20°C: 99.6% and 99.2%; P30-V-28°C: 53.6% and 99.9%) (Table 1).

Finally, temperature also influenced virus evolution; on both cell types, we identified several mutations unique to 28°C or 20°C. A strong effect of temperature was observed on U4.4 cells with the selection at 28°C for both viruses of a mutation at the position 8828 (E2-T96I, threonine to isoleucine) (32.9% and 48.1% for U4.4-P30-V-28°C and 4.7% and 66.2% for U4.4P30-A-28°C). This mutation was also found specific to 28°C on Aag2 but only for replicates of the virus A (Aag2-P30-A-28°C; 97.6% and 20.1%). In addition, temperature of 20°C greatly influenced the selection of a mutation (nucleotide position 8566) positioned in the E2 surface glycoprotein (E2-Y9H, tyrosine to histidine). Frequencies of the mutation were particularly high with, however, a difference between frequencies of virus A and V; we observed lower frequencies for replicates of virus V (60.2% and 11%) than for those of virus A (88.8% and 94.7%). As seen above, this mutation was only selected on Aag2 cells. Five other mutations were found in nsp2 and E2 were specific to 28°C with virus V (P30-V-28°C) on U4.4 cells. On Aag2 cells, three additional mutations, located in E2, were found specific to temperature (28°C or 20°C) with either the virus V or the virus A (Table 1).

Of note, identified shared mutations were located in nsp2 (n=1), nsp4 (n=3), E2 (n=9) and E1 (n=1); all mutations located in non-structural proteins were synonymous mutations while those in E1 and E2 were non-synonymous mutations (Table 1).

Table 1. Specific shared substitutions detected at P30 in U4.4 and Aag2 cells. Mutations mentioned are for at least one replicate at a frequency above 10%. Asterisks indicate mutations that are specific to several experimental conditions.

Substitutions shared between replicates found on U4.4 cells				
Virus specific				
Nucleotide position	Region	Amino acid change	Unique to	Virus harboring the mutation
6227*	nsp4	Synonymous	virus V	P30-V-28°C
9100	E2	N>D	virus A	P30-A-20°C
Temperature specific				
Nucleotide position	Region	Amino acid change	Unique to	Virus harboring the mutation
5645	nsp4	Synonymous	28°C	P30-V-28°C
6227*	nsp4	Synonymous	28°C	P30-V-28°C
8704	E2	G>R	28°C	P30-V-28°C
8731	E2	W>R	28°C	P30-V-28°C
8828*	E2	T>I	28°C	P30-V-28°C and P30-A-28°C
9011	E2	V>A	28°C	P30-V-28°C
Cell type specific				
Nucleotide position	Region	Amino acid change	Unique to	Virus harboring the mutation
764	nsp2	Synonymous	U4.4	P30-V-20°C and P30-A-20°C
10670*	E1	A>V	U4.4	P30-A-20°C
Substitutions shared between replicates found on Aag2 cells				
Virus specific				
Nucleotide position	Region	Amino acid change	Unique to	Virus harboring the mutation
8964*	E2	F>L	virus A	P30-A-28°C
10670*	E1	V>A	virus V	P30-V-28°C and P30-V-20°C
Temperature specific				
Nucleotide position	Region	Amino acid change	Unique to	Virus harboring the mutation
8566*	E2	Y>H	20°C	P30-V-20°C and P30-A-20°C
8831	E2	M>T	20°C	P30-V-20°C
9230	E2	T>I	20°C	P30-A-20°C
8828*	E2	T>I	28°C	P30-A-28°C
8964*	E2	F>L	28°C	P30-A-28°C
Cell type specific				
Nucleotide position	Region	Amino acid change	Unique to	Virus harboring the mutation
7294	nsp4	Synonymous	Aag2	P30-V-20°C and P30-A-20°C
8566*	E2	Y>H	Aag2	P30-V-20°C and P30-A-20°C

Temperature reversal / Passages 40 analysis. Temperature of maintenance until P30 was inverted from P31 to P40. Monitoring of viral production titers showed that only viruses maintained at 20°C on U4.4 cells were impacted by temperature inversion; titers dramatically dropped from P30 (20°C) to P31 (28°C) and gradually increased until P40 (Figure S1). Sequencing analysis of P40 revealed that temperature reversal (from 28°C to 20°C) impacted differently virus evolution on Aag2 and U4.4 cells. On Aag2 cells, P40 (P40-V and P40-A) harbored a lot of shared substitutions and deletions that were not present in the corresponding P30 (Figure S2). These substitutions and deletions were mainly at low frequency (below 10%) and especially located in non-coding regions. In contrast, on U4.4 cells, very few shared

mutations were unique to P30 or P40, suggesting that P40 were quite similar to corresponding P30 (Table S2).

Serial passages of parental E1-226V and variants P30 of E1-22V in *Ae. albopictus*.

After five passages *in vivo*, we observed very low level of parallel evolution (between replicates) for both parental infectious clone V (P5-V-20°C and P5-V-28°C) and serially passaged infectious clone V in U4.4 (P30+P5-V-20°C and P30+P5-V-28°C). No shared mutation above a frequency of 10% was found specific to 20°C or 28°C. At frequency below 10%, we identified some mutations specific to temperature. For viruses serially passaged only *in vivo*, four shared mutations were specific to 20°C (found only in P5-V-20°C replicates) and four were specific to 28°C (found only in P5-V-28°C replicates). For viruses serially passaged on U4.4 and then *in vivo*, two shared mutations were specific to 20°C (found only in P30+P5-V-20°C replicates) and two were specific to 28°C (found only in P30+P5-V-28°C replicates) (Table S3).

Discussion

Because mosquitoes are poikilothermic ectotherms, pathogens that they host are exposed to environmental temperature variations. This raises the question of whether temperature can affect arbovirus genetic evolutionary patterns and selection of new variants. Using experimental systems based on selection of thermo-sensitive viral variants, two infectious clones, differing in one single amino acid at the position 226 of E1 surface glycoprotein, were serially passaged *in vitro*, on mosquito cell lines and *in vivo*, on *Ae. albopictus* mosquitoes at two temperatures, 20°C and 28°C. We found that, although different from a single amino acid, viral clones followed distinct mutational pathways depending on the cell type. Interestingly, a fixed mutation at the E1 gene corresponding to a switch from valine to alanine (E1-V226A) was detected in all replicates of P30-V, regardless of temperature and only on *Ae. aegypti* Aag2 cells. Conversely, passaging the viral clone with an alanine at the position E1-226 on *Ae. albopictus* U4.4 cells led to the selection of a variant with valine (E1-A226V) at a low frequency of 1% and only at 20°C. This demonstrates a strong selective pressure of the cell type on the two viral clones; the alanine is selected on *Ae. aegypti* cells, whereas the valine is selected on *Ae. albopictus* cells. However, while the E1-226A selection on *Ae. aegypti* cells is independent from temperature, it seems that the temperature of 20°C helps the selection of E1-226V on *Ae. albopictus* cells. This result suggests that the adaptive E1-A226V amino acid change conferring

enhanced transmission by *Ae. albopictus* (Tsetsarkin et al., 2007; Vazeille et al., 2007) might not be favored to the same extent in different environments.

In accordance with the fact that the E1-A226V is an *Ae. albopictus*-adaptative mutation, we found higher number of mutations ($\geq 10\%$) for the E1-226A clone than for the E1-226V clone on *Ae. albopictus* cells. In contrast, on *Ae. aegypti* cells, higher number of mutations ($\geq 10\%$) were found for the E1-226V clone compared to the E1-226A clone. This could be seen as an adaptation process of viruses to the cell type to which they are least adapted (Elena & Sanjuan, 2005).

One of our main objectives was to characterize CHIKV evolutionary trajectories associated with temperature. At the position 96 of the surface glycoprotein E2, we identified a mutation specific to temperature of 28°C. This mutation (E2-T96I) was selected at 28°C, in all replicates of both viruses on *Ae. albopictus* U4.4 cells and in replicates of virus E1-226A on *Ae. aegypti* Aag2 cells. The selective pressure of temperature is particularly strong on U4.4 cells, as the mutation occurs regardless of the virus. On Aag2, the appearance of the E2-T96I mutation at 28°C depends on the virus. A mutation specific to the temperature of 20°C was also found at the position 9 of the E2 glycoprotein (E2-Y9H). The mutation was selected at 20°C, in all replicates of both viruses on *Ae. aegypti* Aag2 cells only. The appearance of this mutation was thus considered as temperature- and cell type-dependent.

All the temperature specific mutations identified in this study were either located on E2 or nsP4. The CHIKV surface glycoprotein E2 is involved in cell attachment and entry, whereas the non-structural protein nsP4 encodes for the RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) of the virus (Silva & Dermody, 2017). Both proteins are particularly important for virus replication and are used in different vaccine compositions (Gorchakov et al., 2012) and therapeutics (Wada et al., 2017). Mutations in the nsP4 may affect the polymerase error rate and consequently, the mutation frequency in the viral RNA population. It has been shown that a single change (C483Y amino acid) in the nsP4 RdRp of CHIKV increases replication fidelity and generates populations with reduced genetic diversity (Coffey, Beeharry, Borderia, Blanc, & Vignuzzi, 2011); interestingly, it induced a lower infection and dissemination titers in mosquitoes.

Several mutations were detected in the nsP2 gene after passages of the clone E1-226V at 20°C and 28°C on Aag2 cells. The nsP2 region possesses enzymatic activities including NTPase and RNA triphosphatase activity (Karpe, Aher, & Lole, 2011), RNA helicase activity (Das, Merits, & Lulla, 2014), and protease activity (Utt et al., 2015). Nsp2 can counteract host cellular antiviral responses through multiple mechanisms including general transcriptional shutdown by

degradation of the Rpb1 subunit of host cellular RNA polymerase II (Akhrymuk, Kulemzin, & Frolova, 2012), induction of JAK/STAT signaling pathway (Fros et al., 2010), and autophagy (Judith et al., 2013). It has also been shown that nsp2 can act with nsP4 to alter replication complex fidelity (Stapleford et al., 2015).

The temperature reversal has distinct effect on virus evolution on Aag2 and U4.4 cells. Much more differences were seen between P30 and P40 on Aag2 cells compared to U4.4 where the switch of temperature did not drastically alter viral populations composition.

Five passages of E1-226V (parental and P30/U4.4) in *Ae. albopictus* by serial oral infections did not lead to significant genetic changes meaning that experimental selection using mosquitoes can limit viral diversification as the virus must overcome several anatomical barriers acting as genetic bottlenecks (Forrester, Coffey, & Weaver, 2014).

Overall, our results demonstrate that viral evolution during serial passages *in cellulo* is influenced by the infectious clone, the cell line and temperature. In addition, we provided key features of virus adaptation to temperature on U4.4 and Aag2 cells. Beyond selection of viral variants by temperature, CHIKV transmission is most likely based on more complex mechanisms that may interplay. Other factors related to mosquito genetics and epigenetics components may intervene in modulating CHIKV transmission by vectors.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Philippe Bousses, Davy Jiolle and Christophe Paupy (IRD, Montpellier) for their help in collecting mosquitoes.

FUNDING

This study was supported by the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant n°ANR-10-LABX-62-IBEID), the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under ZIKAlliance grant agreement No 734548 and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 731060 (Infravec2, Research Infrastructures for the control of vector-borne diseases; <http://infravec2.eu/>). RB was supported by Infravec2. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Akhrymuk, I., Kulemzin, S. V., & Frolova, E. I. (2012). Evasion of the innate immune response: the Old World alphavirus nsP2 protein induces rapid degradation of Rpb1, a catalytic subunit of RNA polymerase II. *J Virol*, *86*(13), 7180-7191. doi:10.1128/JVI.00541-12
- Brackney, D. E., Scott, J. C., Sagawa, F., Woodward, J. E., Miller, N. A., Schilkey, F. D., . . . Ebel, G. D. (2010). C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Negl Trop Dis*, *4*(10), e856. doi:10.1371/journal.pntd.0000856
- Coffey, L. L., Beeharry, Y., Borderia, A. V., Blanc, H., & Vignuzzi, M. (2011). Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(38), 16038-16043. doi:10.1073/pnas.1111650108
- Das, P. K., Merits, A., & Lulla, A. (2014). Functional cross-talk between distant domains of chikungunya virus non-structural protein 2 is decisive for its RNA-modulating activity. *J Biol Chem*, *289*(9), 5635-5653. doi:10.1074/jbc.M113.503433
- Delisle, E., Rousseau, C., Broche, B., Leparç-Goffart, I., L'Ambert, G., Cochet, A., . . . Golliot, F. (2015). Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill*, *20*(17). doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.17.21108
- Domingo, E., & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, *51*, 151-178. doi:10.1146/annurev.micro.51.1.151
- Domingo, E., & Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genet*, *15*(10), e1008271. doi:10.1371/journal.pgen.1008271
- Drake, J. W., & Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *96*(24), 13910-13913. doi:10.1073/pnas.96.24.13910
- Elena, S. F., & Sanjuan, R. (2005). RNA viruses as complex adaptive systems. *Biosystems*, *81*(1), 31-41. doi:10.1016/j.biosystems.2005.02.001
- Forrester, N. L., Coffey, L. L., & Weaver, S. C. (2014). Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*, *6*(10), 3991-4004. doi:10.3390/v6103991
- Fros, J. J., Liu, W. J., Prow, N. A., Geertsema, C., Ligtenberg, M., Vanlandingham, D. L., . . . Pijlman, G. P. (2010). Chikungunya virus nonstructural protein 2 inhibits type I/II interferon-stimulated JAK-STAT signaling. *J Virol*, *84*(20), 10877-10887. doi:10.1128/JVI.00949-10
- Gorchakov, R., Wang, E., Leal, G., Forrester, N. L., Plante, K., Rossi, S. L., . . . Weaver, S. C. (2012). Attenuation of Chikungunya virus vaccine strain 181/clone 25 is determined by two amino acid substitutions in the E2 envelope glycoprotein. *J Virol*, *86*(11), 6084-6096. doi:10.1128/JVI.06449-11
- Isakov, O., Borderia, A. V., Golan, D., Hamenahem, A., Celniker, G., Yoffe, L., . . . Shomron, N. (2015). Deep sequencing analysis of viral infection and evolution allows rapid and detailed characterization of viral mutant spectrum. *Bioinformatics*, *31*(13), 2141-2150. doi:10.1093/bioinformatics/btv101
- Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., . . . Lecuit, M. (2013). Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep*, *14*(6), 534-544. doi:10.1038/embor.2013.51
- Karpe, Y. A., Aher, P. P., & Lole, K. S. (2011). NTPase and 5'-RNA triphosphatase activities of Chikungunya virus nsP2 protein. *PLoS One*, *6*(7), e22336. doi:10.1371/journal.pone.0022336
- Parola, P., de Lamballerie, X., Jourdan, J., Rovey, C., Vaillant, V., Minodier, P., . . . Charrel, R. N. (2006). Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg Infect Dis*, *12*(10), 1493-1499. doi:10.3201/eid1210.060610

- Pfeiffer, J. K., & Kirkegaard, K. (2005). Increased fidelity reduces poliovirus fitness and virulence under selective pressure in mice. *PLoS Pathog*, *1*(2), e11. doi:10.1371/journal.ppat.0010011
- Robinson, M. C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *49*(1), 28-32. doi:10.1016/0035-9203(55)90080-8
- Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., . . . Brisse, S. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*, *3*(7), e263. doi:10.1371/journal.pmed.0030263
- Silva, L. A., & Dermody, T. S. (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*, *127*(3), 737-749. doi:10.1172/JCI84417
- Stapleford, K. A., Rozen-Gagnon, K., Das, P. K., Saul, S., Poirier, E. Z., Blanc, H., . . . Vignuzzi, M. (2015). Viral Polymerase-Helicase Complexes Regulate Replication Fidelity To Overcome Intracellular Nucleotide Depletion. *J Virol*, *89*(22), 11233-11244. doi:10.1128/JVI.01553-15
- Steinhauer, D. A., Domingo, E., & Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, *122*(2), 281-288. doi:10.1016/0378-1119(92)90216-c
- Steinhauer, D. A., & Holland, J. J. (1987). Rapid evolution of RNA viruses. *Annu Rev Microbiol*, *41*, 409-433. doi:10.1146/annurev.mi.41.100187.002205
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., & Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*, *3*(12), e201. doi:10.1371/journal.ppat.0030201
- Utt, A., Das, P. K., Varjak, M., Lulla, V., Lulla, A., & Merits, A. (2015). Mutations conferring a noncytotoxic phenotype on chikungunya virus replicons compromise enzymatic properties of nonstructural protein 2. *J Virol*, *89*(6), 3145-3162. doi:10.1128/JVI.03213-14
- Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., . . . Failloux, A. B. (2007). Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One*, *2*(11), e1168. doi:10.1371/journal.pone.0001168
- Vega-Rua, A., Zouache, K., Caro, V., Diancourt, L., Delaunay, P., Grandadam, M., & Failloux, A. B. (2013). High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One*, *8*(3), e59716. doi:10.1371/journal.pone.0059716
- Wada, Y., Orba, Y., Sasaki, M., Kobayashi, S., Carr, M. J., Nobori, H., . . . Sawa, H. (2017). Discovery of a novel antiviral agent targeting the nonstructural protein 4 (nsP4) of chikungunya virus. *Virology*, *505*, 102-112. doi:10.1016/j.virol.2017.02.014

Supplementary Data

Table S1. Sets of primers used to amplify CHIKV whole genome.

Name	Sequence	Sens -Rev	Working concentration
Chik-1S-NGS	ATGGCTGCGTGAGACACAC	Sens 1	10 μ M
Chik-WT-3162R	TGAGACCACTGCCTATCATTTA	Reverse 1	10 μ M
Chik-WT-3079S	GACCTTCGATACATTCCAAA	Sens 2	10 μ M
Chik-WT-6321R	CACGTTGAATACTGCTGAGT	Reverse 2	10 μ M
Chik-3S-NGS	ACACACTACAGAATGTACTGGCA	Sens 3	10 μ M
Chik-3R-NGS	CGTACATGAGTGACTAATCTTCT	Reverse 3	10 μ M
Chik-4S-NGS	CAGCACCGTGTACGATTACTGG	Sens 4	10 μ M
Chik-4R-NGS	GTTTCGAGAATCGTGAAGAGTTC	Reverse 4	10 M

Figure S1. Evolution of viral production titers along the 40 serial passages in U4.4 and Aag2 cells. Temperatures were inverted from passage 31 to passage 40. V and A correspond to the infectious clones E1-226A and E1-226V.

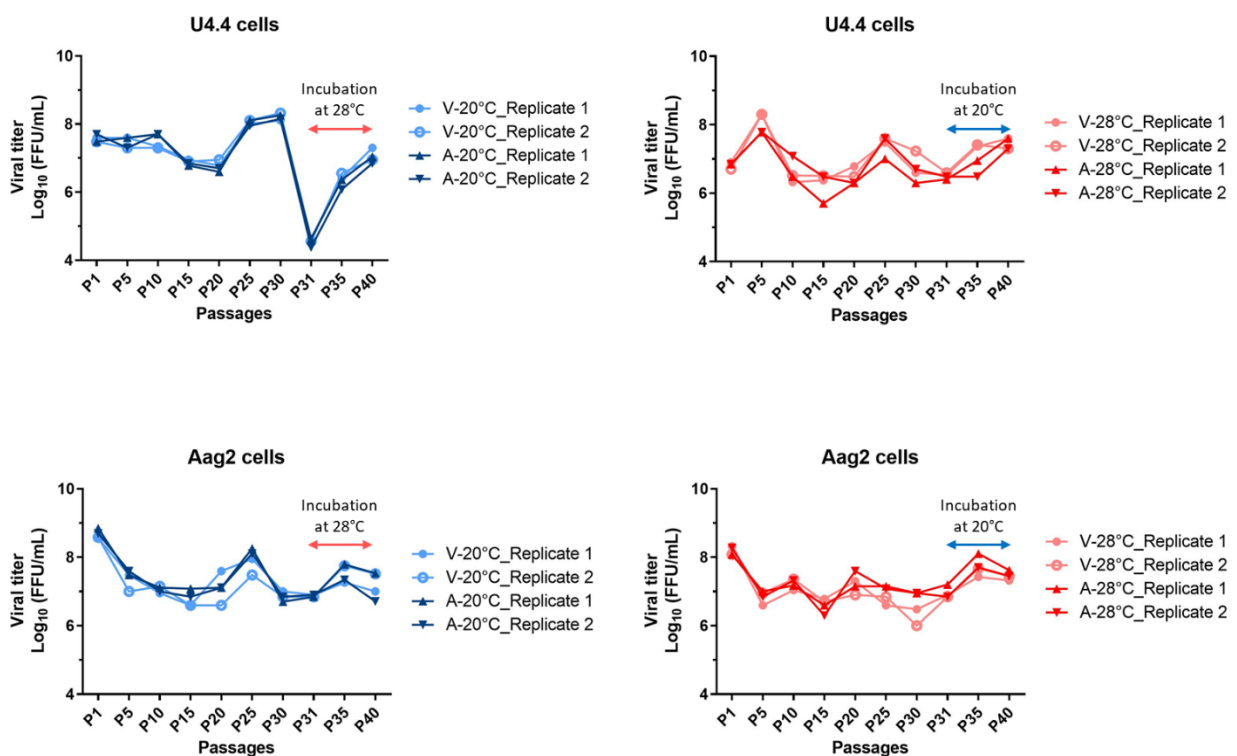


Table S2. Global count of specific shared mutations detected in P30s and P40s in U4.4 and Aag2 cells.

Temperature reversal (P30-28°C -> P40-20°C)			
Samples	Incubation temperature	Common Unique Mutations*	Common Unique Deletions*
Aag2-P30-A	28°C	1	12
Aag2-P40-A	20°C	9	18
Aag2-P30-V	28°C	2	8
Aag2-P40-V	20°C	9	22
U4.4-P30-A	28°C	0	1
U4.4-P40-A	20°C	3	4
U4.4-P30-V	28°C	5	4
U4.4-P40-V	20°C	3	5

*Common to replicates and unique to the experimental condition

Table S3. Global count of specific shared mutations detected in passages of E1-226V (parental and P30/U4.4) *in vivo*, on *Ae. albopictus*.

Passages of E1-226V (parental and P30/U4.4) on <i>Ae. albopictus</i>						
	Samples	Incubation temperature	Common Unique Mutations*	Location	Common Unique Deletions*	Location
f ≥10%	P5	20°C	0	–	0	–
	P5	28°C	0	–	0	–
	P30+P5	20°C	0	–	0	–
	P30+P5	28°C	0	–	0	–
f <10%	P5	20°C	4	E2 3'NTR	1	E2
	P5	28°C	4	nsp1 nsp2 E2	1	E1
	P30+P5	20°C	2	6k E1	1	nsp1
	P30+P5	28°C	2	nsp2	2	nsp1 nsp2

*Common to replicates and unique to the experimental condition

6.2. Effet de la température sur la régulation transcriptionnelle des gènes d'*Ae. albopictus*

6.2.1. Objectifs

Cette étude vise à analyser comment le moustique *Ae. albopictus* réagit, sur le plan transcriptionnel, à une basse température. On cherche ici à décrire les changements transcriptionnels induits par la température chez des moustiques non infectés mais également durant l'infection par le CHIKV. Plus précisément, nous évaluerons l'influence de la température sur la réponse du moustique à l'infection et tenterons de comprendre comment ces réponses pourraient modifier l'issue de l'infection.

6.2.2. Démarche expérimentale et analytique

Afin de caractériser les changements transcriptionnels associés à la température durant l'infection par le CHIKV, nous avons comparé les profils transcriptomiques de moustiques non-infectés et infectés, incubés à deux températures, 20°C et 28°C.

Pour cela, des lots de moustiques ont été infectés avec le clone infectieux E1-226V du CHIKV puis incubés à 20°C ou 28°C (Figure 44). En parallèle, d'autres lots de moustiques ont reçu un repas de sang non-infectieux et ont ensuite été placés à 20°C ou 28°C (Figure 44). Après 9 jours d'incubation, les salives des moustiques exposés au virus ont été récoltées afin d'identifier les individus capables de transmettre le virus et calculer les efficacités de transmission des moustiques à chaque température. Parmi les moustiques exposés au virus, seuls les moustiques dont les salives sont infectieuses ont été sélectionnés pour les expériences de transcriptomique ; ils sont, pour plus de simplicité, désignés comme moustiques infectés dans le texte. Par la suite, nous avons extrait l'ARN total des moustiques entiers selon les quatre conditions expérimentales : non-infectés à 20°C, non-infectés à 28°C, infectés à 20°C et infectés à 28°C (Figure 44).

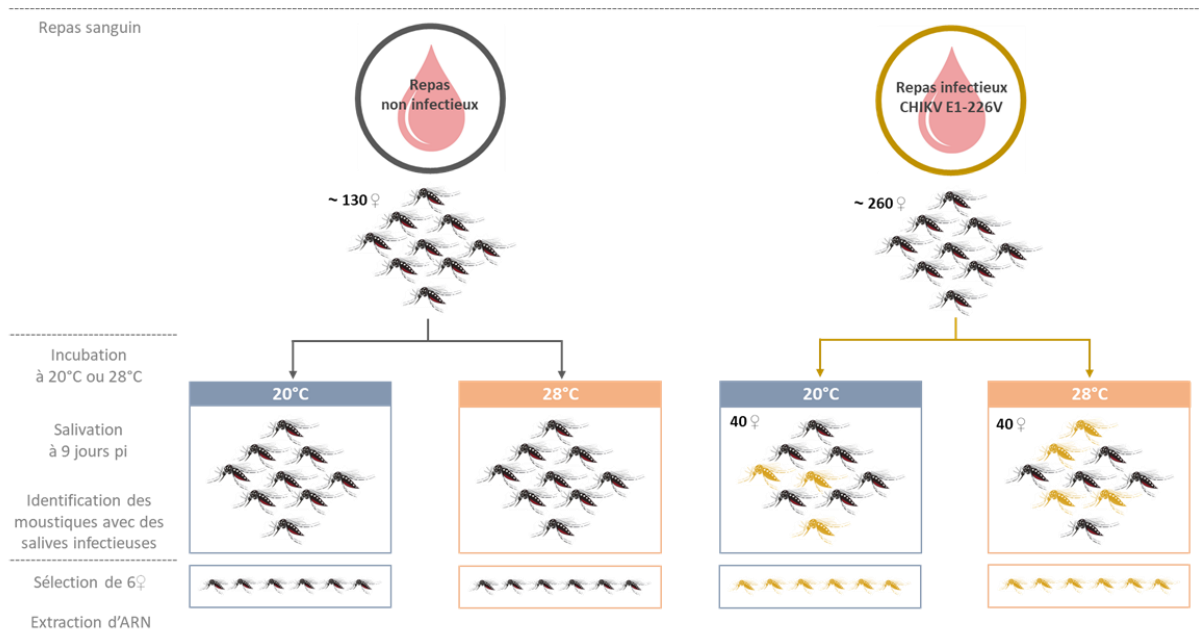


Figure 44. Schéma expérimental d'infection des moustiques pour l'étude du transcriptome. Les moustiques colorés en jaune sont ceux pour lesquelles nous avons détecté la présence de CHIKV dans les salives.

Chaque condition expérimentale est représentée par six femelles individuelles servant de réplicat biologique, comme recommandé dans les travaux de (Schurch et al., 2016). Au final, un total de 24 échantillons d'ARN (12 issus de femelles non-infectés et 12 de femelles infectés) a été séquencé.

L'analyse des transcriptomes consiste à identifier les gènes différenciellement exprimés entre deux conditions expérimentales (Tableau 2). Dans cette étude, nous avons réalisé quatre comparaisons qui visent à évaluer (i) l'effet de la température sur le transcriptome de moustiques infectés ou non-infectés et (ii) l'effet de l'infection sur le transcriptome de moustiques incubés à 20°C ou 28°C (Tableau 2).

Effet de la température
Non infectés 20°C <i>versus</i> Non infectés 28°C
Infectés 20°C <i>versus</i> Infectés 28°C
Effet de l'infection par le CHIKV
Infectés 20°C <i>versus</i> Non infectés 20°C
Infectés 28°C <i>versus</i> Non infectés 28°C

Tableau 2. Récapitulatif des comparaisons différentielles des transcriptomes de moustiques.

Pour chaque comparaison, nous obtenons une liste de gènes différentiellement exprimés entre deux conditions expérimentales. Ces gènes sont « up-régulés » quand le comptage normalisé des transcrits de la condition choisie comme référence est statistiquement supérieur à celui de la deuxième condition. Inversement, les gènes sont dits « down-régulés » quand le comptage normalisé des transcrits de la condition référence est statistiquement inférieur à celui de la deuxième condition. Nous avons procédé à l'analyse des profils de gènes différentiellement exprimés par étape :

- (1) Déterminer le nombre de gènes différentiellement exprimés entre deux conditions ; cela démontre à quel point les processus transcriptionnels sont proches (peu de gènes différentiellement exprimés) ou éloignés (beaucoup de gènes différentiellement exprimés) ;
- (2) Définir le catalogue des gènes non-codants et des gènes codants avec des fonctions connues ou inconnus ;
- (3) Identifier les 10 gènes les plus fortement « up- ou down-régulés » ; cela permet d'identifier les gènes dont les régulations sont fortement affectées par la température et/ou l'infection ;
- (4) Identifier les gènes dont les fonctions sont impliquées dans le métabolisme du stress et la réponse immunitaire, afin d'interpréter plus finement l'effet de la température sur la réponse à l'infection.

6.2.3. Résultats

Les résultats de cette partie indiquent qu'en absence d'infection, l'expression génétique du moustique est affectée par la température. A 20°C, les gènes en lien avec le cytosquelette sont fortement up-régulés tandis que ceux impliqués dans les voies du stress oxydatif et des sérines protéases sont down-régulés. Concernant, les réponses à l'infection, on observe qu'à 9 jpi les profils d'expression génétique sont complètement différents à 20°C et à 28°C, avec une forte proportion de gènes de l'immunité et du stress surexprimés à 20°C. La surexpression de ces gènes à 20°C n'est toutefois pas corrélée à une efficacité de transmission du CHIKV significativement plus basse à 20°C.

6.2.4. Conclusion

La température modifie fortement les profils d'expression génétique du moustique, en particulier pendant l'infection par le CHIKV. Cette influence de la température sur la réponse à l'infection du moustique pourrait considérablement altérer les interactions entre le virus et son hôte vecteur, et par conséquent, l'issue de l'infection. Dans notre expérience, la surexpression des gènes de l'immunité et du stress à 20°C n'a pas eu de conséquences significatives sur l'efficacité de transmission du CHIKV. On suppose que d'autres facteurs contrebalancent les effets de cette surexpression des gènes afin de favoriser la transmission à 20°C.

6.2.5. Article

Temperature modifies gene expression profiles of *Aedes albopictus* during chikungunya virus infection

Rachel Bellone,^{1,2} Laurence Mousson,¹ Andres Merits,³ Etienne Kornobis,⁴ Catherine Dauga,^{1,*} and Anna-Bella Failloux^{1,*,#}

¹ Department of Virology, Institut Pasteur, Arboviruses and Insect Vectors Unit, Paris, France

² Sorbonne Université, Collège Doctoral, F75005 Paris, France

³ University of Tartu, Institute of Technology, Tartu, Estonia

⁴ Hub Bioinformatique et Biostatistique, Institut Pasteur, Paris, France

* co-last authors

#Corresponding author: anna-bella.failloux@pasteur.fr (ABF)

Abstract

Mosquito-borne viruses such as dengue, Zika and chikungunya virus are emerging threats to public health. Mosquitoes ensure a biological transmission of viruses, which must replicate and cross mosquito tissue barriers before being transmitted. Upon infection, mosquitoes mount an immune response toward pathogens which implies major transcriptional changes, probably determinant to infection outcome and persistence establishment. Precisely how temperature may affect these responses across different mosquito-virus combinations and how this may influence transmission is still poorly elucidated. In this study, we performed transcriptomic analysis on *Aedes albopictus* mosquitoes and showed that mosquito gene expression profiles in response to CHIKV infection were totally different at 28°C and 20°C. This resulted in lower transmission efficiencies but higher mean viral load in saliva at 20°C. In absence of infection, we also found major transcriptional differences between mosquitoes held at 20°C and 28°C. Taken together, our results indicate that temperature is a major factor shaping mosquito gene expression in absence or during arboviral infection.

Keywords: chikungunya virus, temperature, transcriptional regulation, RNA-seq, *Ae. albopictus*.

Introduction

Mosquito-borne viruses are emerging threats to public health. Over the past three decades, the geographical distribution of arboviruses such as dengue (DENV), Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) viruses, have expanded causing increasingly frequent and large epidemics (Gubler, 1996, 2002; Mayer, Tesh, & Vasilakis, 2017). This epidemiological change coincides with the dispersal of two major arthropod-borne virus (arbovirus) vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*.

Mosquitoes ensure an active replication of viruses and their ability to become infected and subsequently transmit a virus is defined by their vector competence. As in many host-pathogen systems, the outcome of infection depends on specific pairings of mosquito and pathogen genotypes described under genotype-by-genotype (G x G) interactions (Lambrechts et al., 2009; Lambrechts, Halbert, Durand, Gouagna, & Koella, 2005). Since mosquitoes are poikilothermic ectotherms (i.e., internal body temperature is not constant and depends on temperature of surrounding environment), ambient temperature is an overriding environmental factor affecting different aspect of mosquito biological processes, as well as virus replication and transmission (Bellone & Failloux, 2020; Mordecai et al., 2019; Reinhold, Lazzari, & Lahondere, 2018; Samuel, Adelman, & Myles, 2016; Tesla et al., 2018; Wimalasiri-Yapa et al., 2019). Thereby, environmental temperature adds an additional level of complexity to the G x G interactions, then described under genotype-by-genotype-by-environment (G x G x E) interactions (Zouache et al., 2014). However, the extent to which temperature may influence physiological, molecular and genetic interactions between vectors and viruses shaping transmission remains largely unclear. Upon infection, mosquitoes mount an immune response toward pathogens which implies major transcriptional changes, probably determinant to infection outcome and persistence establishment (Bonizzoni et al., 2012; Colpitts et al., 2011; Etebari et al., 2017; Vedururu, Neave, Sundaramoorthy, et al., 2019; Vedururu, Neave, Tachedjian, et al., 2019). Precisely how temperature may affect the nature, magnitude, timing and duration of these responses across different mosquito-virus combinations and how this may influence transmission is still poorly elucidated (Adelman et al., 2013; Murdock, Paaijmans, Bell, et al., 2012; Murdock, Paaijmans, Cox-Foster, Read, & Thomas, 2012). Recent studies have revealed that gene expression of *Ae. aegypti* in response to ZIKV (Ferreira et al., 2020) and CHIKV (Wimalasiri-Yapa et al., 2021) infection greatly varied according to temperature. To date, this information is not available for *Ae. albopictus*. This mosquito is an invasive species that has, in last decades, largely extended its original distribution range of tropical and subtropical regions

to much cooler temperate regions, increasing the risk of mosquito-borne viral diseases in regions so far spared such as Europe and Northern America (Barzon, 2018; Enserink, 2007). Considered as a secondary vector for several arboviruses, the role of *Ae. albopictus* as a major vector has been increasingly recognized in recent outbreaks (Paupy et al., 2010; Rezza, 2012), especially for CHIKV (de Lamballerie et al., 2008). The CHIKV is an emerging arbovirus that caused large outbreaks affecting millions of people worldwide (Calba et al., 2017; Schuffenecker et al., 2006; Venturi et al., 2017; Yactayo, Staples, Millot, Cibrelus, & Ramon-Pardo, 2016; Zeller, Van Bortel, & Sudre, 2016). The virus is an enveloped single-strand positive-sense RNA virus that belongs to *Alphavirus* genus in the *Togaviridae* family.

Deeper understanding of molecular interactions between CHIKV and its vectors exposed to different temperatures is pivotal for identifying biological constraints on transmission, forecasting and mitigating emergences. In this study, we investigated the effects of temperature on gene expression of uninfected and CHIKV-infected *Ae. albopictus* mosquitoes. The objective was to describe the whole mosquito transcriptome response triggered by CHIKV infection at 20°C and 28°C.

Material and Methods

Ethics statement. Animals were housed in the Institut Pasteur animal facilities (Paris) accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on live rodents. Work on animals was performed in compliance with French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 2010/63, French Law 2013-118, February 6th, 2013). All experiments were approved by the Ethics Committee #89 and registered under the reference APAFIS (Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des FIns Scientifiques) #6573-2016061412077987 v2.

Mosquitoes. *Ae. albopictus* eggs were sampled in July 2018 in Montpellier, France, using ovitraps (1047 individuals were used to start the colony). The location of Montpellier was chosen as autochthonous CHIKV cases were detected there in 2014 (Delisle et al., 2015). In insectaries, eggs were hatched in 1 L of dechlorinated tap water. Larvae were split in pans of 200 individuals and were fed with yeast tablets (Gayelord Hauser). Water and food were renewed every 2 days. Immature stages were maintained at 25°C ± 1°C. Emerging adults were reared in cages at 28°C ± 1°C with a 12:12 light:dark cycle, 80% relative humidity and fed with

a 10% sucrose solution *ad libitum*. To amplify the population, females were blood-fed three times a week on anaesthetized mice (OF1 mice, Charles River laboratories, France).

Chikungunya virus and mosquito infections. Experimental infections of mosquitoes were performed using a CHIKV infectious clone ICRES1, kindly provided by Prof. Andres Merits (Institute of Technology, Tartu, Estonia). The infectious clone was derived from the LR2006-OPY1 CHIKV strain harboring the adaptative E1-A226 V mutation, isolated from the serum of a febrile patient returning from La Réunion Island (La Réunion, ECSA genotype, Accession no. DQ443544.2) (Parola et al., 2006). The infectious clone was produced on BHK-21 cells (Baby Hamster Kidney, ATCC) and stored at -80°C prior to its use for mosquito oral infections. The viral titer estimated by focus-forming assay on C6/36 cells (*Ae. albopictus* larval cell line, ATCC) was $10^{9.15}$ focus-forming units per mL (FFU/mL).

Boxes of ~60 10 to 15 day-old females (F5 generation; n=400) were sorted and transferred to a biosafety level 3 (BSL-3) insectary (28°C ± 1°C) for a 24 h period of acclimatization and starvation. Mosquitoes were then exposed to a non-infectious or CHIKV-containing blood meal (10^7 FFU/mL). The blood meal contained 2/3 of washed rabbit erythrocytes, 1/3 of media or viral suspension and ATP as a phagostimulant at a final concentration of 10 mM. Engorged females from non-infectious or infectious blood meal were both randomly allocated to two constant temperatures (20°C or 28°C ± 0.1°C) in climatic chambers with a 14:10 diurnal cycle and 80 to 90% relative humidity. Mosquitoes were provided 10% sucrose *ad libitum* during the 9 days of incubation.

The temperature of 20°C was chosen as representative of the minimal mean monthly temperature required for CHIKV transmission (Tilston, Skelly, & Weinstein, 2009), whereas 28°C was chosen as a typical average temperature of tropical regions and is commonly used as a standard temperature in CHIKV mosquito infection experiments.

Mosquito salivation. Mosquitoes saliva were collected at 9 days post-infection (dpi) using a protocol of forced salivation described in (Vega-Rua et al., 2013). Briefly, mosquito legs and wings were removed and proboscis was inserted into a micropipette tip filled with 5 µL of fetal bovine serum (FBS). After 45 min, the saliva-containing FBS was expelled in 45 µL of Leibovitz L-15 medium (Invitrogen, CA, USA). Following salivation, saliva samples and mosquito bodies were kept at -80°C until titration and RNA extraction, respectively. In total, 80 saliva from mosquitoes fed on CHIKV infectious blood meal were collected; half were from mosquito incubated at 20°C and the other half came from mosquitoes incubated at 28°C. In

order to avoid biases from the salivation step, mosquitoes fed on non-infectious blood meal were processed equally and were thus forced to salivate as mosquitoes fed on CHIKV infectious blood meal.

Virus titration. Mosquitoes able to transmit the CHIKV were identified by titration of saliva samples. Monolayers of C6/36 cells were inoculated with 35 μ L of samples in 96-well plates. After an incubation of 1 h at 28°C, cells were overlaid with 1:1 mix of carboxymethyl cellulose and Leibovitz L-15 medium supplemented with 5% FBS and 1.5X of anti-biotoxic-anti-fungal solution (Life Technologies, CA, USA). Following an incubation period of 3 days at 28°C, cells were fixed with 3.7% formaldehyde, washed 3 times in PBS 1X and stained using a hyper-immune ascetic fluid specific to CHIKV as the primary antibody and an Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG as the secondary antibody (Life Technologies, CA, USA). The number of focus-forming units was determined under a fluorescent microscope.

RNA extraction, library construction and sequencing. For each temperature regimens (20°C and 28°C), experimental conditions were comprised of (i) uninfected mosquitoes and (ii) infected-mosquitoes, with CHIKV-positive saliva. Six mosquito bodies (without legs and wings) were individually processed for each experimental condition, giving a total of 24 samples. Samples were homogenized with silica glass beads for 30 sec in lysis buffer RA1 and β -mercaptoethanol using a homogenizer (Precellys 24®). Total RNA was extracted from homogenates using a RNA extraction kit (Nucleospin® RNA, Macherey-Nagel). RNA was eluted in 40 μ L RNAase-free water and kept at -80°C until further analysis. RNA integrity and concentration were evaluated on Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, USA).

PolyA fraction of total RNA was purified from 10 μ g RNA using Dynabeads according to the manufacturer's instructions (ThermoFisher). Libraries were built using a TruSeq Stranded mRNA library Preparation Kit (Illumina, USA) following the manufacturer's protocol. Quality control was performed on an Agilent BioAnalyzer. Sequencing was performed on a NovaSeq 6000 (Illumina) by Novogene to obtain 150 base paired-end reads.

Transcriptome analysis. To characterize changes in the RNA transcriptome in response to temperature, we compared the RNA expression profiles of unexposed mosquitoes maintained at temperature related to tropical climate (28°C) to those of mosquitoes housed under cool temperature (20°C).

To determine whether temperature modified global RNA expression in CHIKV-infected mosquitoes, we compared RNA expression profiles between uninfected and CHIKV-infected mosquitoes at 20°C and at 28°C.

Finally, to evaluate the effects of temperature on global RNA expression in CHIKV-infected mosquitoes in late stage of infection process (CHIKV-positive saliva), we compared the expression profiles of CHIKV-infected mosquitoes maintained at 28°C to those submitted to cool temperature (20°C).

The RNA-seq analyses were performed with Sequana v0.9.16 (https://github.com/sequana/sequana_rnaseq) (Cokelaer, Desvillechabrol, Legendre, & Cardon, 2017), a pipeline based on Snakemake 5.8.1 (Koster & Rahmann, 2012).

Reads were trimmed from adapters using Cutadapt 2.10 (Martin, 2011) then mapped to the *Ae. albopictus* genome (GCF_006496715.1) using STAR 2.7.3a (Dobin et al., 2013). FeatureCounts 2.0.0 (Liao, Smyth, & Shi, 2014) was used to produce the count matrix, assigning reads to features using corresponding primary annotation (release 102) with strand-specificity information. Quality control statistics were summarized using MultiQC 1.8 (Ewels, Magnusson, Lundin, & Kaller, 2016). Statistical analysis on the count matrix was performed to identify differentially regulated genes. Differential expression testing was conducted using DESeq2 library 1.24.0 (Love, Huber, & Anders, 2014) scripts based on SARTools 1.7.0 (Varet, Brillet-Gueguen, Coppee, & Dillies, 2016) indicating the significance (Benjamini-Hochberg adjusted p-values, false discovery rate FDR < 0.05) and the effect size (fold-change) for each comparison.

For functional annotation, we developed a Python script to scan for the intersections between the “LOC+GeneID” from the RNA-Seq pipeline files and gene annotation of the reference genome AalbF2 (Palatini et al., 2020), to automatically assign scaffolds, coordinates and predicted functions to genes differentially expressed (DEGs).

To help interpretation of results, we classified a selection of genes according to five classes and 20 subclasses of functional interest (Table S9). We focused our analysis on thermal tolerance, classical and non-specific immune pathways and stress related pathways. Special attention was given to DEGs coding for uncharacterized proteins and non-coding RNA genes.

Statistical Analysis. Rates and proportions were compared using Fisher’s exact test and viral loads using Kruskal-Wallis non-parametric tests. Tests were conducted using the STATA software (StataCorp LP, Texas, USA). p-values <0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of temperature on CHIKV transmission by *Ae. albopictus* mosquitoes.

To determine how temperature influences CHIKV transmission, we evaluated mosquito transmission efficiencies at 20°C and 28°C by detecting viral particles in saliva of CHIKV-exposed mosquitoes. At 9 dpi, transmission efficiency of mosquitoes held at 20°C (15%) was lower than that of those held at 28°C (27.5%), although no significant statistical difference was detected (Fisher's exact test: $p > 0.05$; Figure 1A). The mean number of viral particles was significantly higher in saliva of mosquitoes exposed at 20°C (mean, 93) than at 28°C (mean, 11) (Kruskal-Wallis test: $p < 0.05$). Numbers of viral particles were more widely dispersed when mosquitoes were exposed at 20°C (2 to 380 particles per mosquito) rather than 28°C (4 to 33 particles per mosquito), with however any statistical difference (Kruskal-Wallis test: $p > 0.05$; Figure 1B). Based on these phenotypic differences, we conducted a more in-depth investigation by performing RNAseq analysis on a subset of six mosquitoes with CHIKV-positive saliva and six unexposed mosquitoes at 20°C and 28°C.

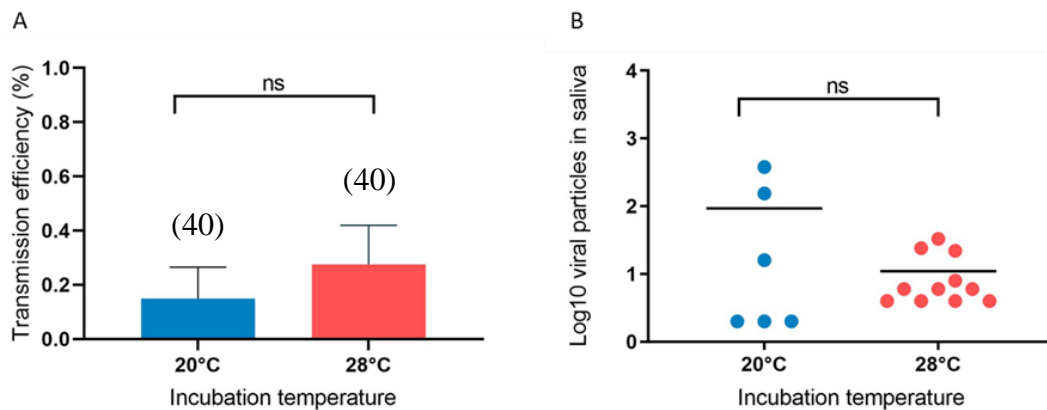


Figure 1. Transmission efficiency of CHIKV (A) and number of viral particles in saliva (B) in *Ae. albopictus* maintained at 20°C and 28°C. In brackets, the number of females analyzed.

Temperature alters gene expression profiles of uninfected *Ae. albopictus* mosquitoes

To evaluate how temperature affects mosquito gene expression profiles, we compared uninfected mosquitoes held at two temperatures, 20°C and 28°C. We identified a total of 296 differentially expressed genes (DEGs); 125 were up-regulated and 171 were down-regulated at 20°C compared to 28°C (Tables S1 and S2). 20% of DEGs (60/296) corresponded to non-coding RNA genes and 80% (236/296) were protein-coding genes of known (193/236) or unknown (43/236) functions (Table S2).

In this comparison, the 10 most up-regulated genes (in terms of fold change) were mainly non-coding RNA genes (n=6/10) (Table 1). The non-coding RNA genes, LOC115259153 and LOC109397960, corresponded to the highest up- and down-regulated transcripts (48 and 46-fold, respectively) (Table 1). The protein-coding gene with the highest enrichment at 20°C was coding for the protein G12 (22-fold), whereas a cytochrome P450 305a1 was the most down-regulated (38-fold) (Table 1). Other 10 most deregulated protein-coding genes included the serine protease SP24D (14-fold up-regulated) and the dynactin (22-fold down-regulated) involved in cytoskeleton activity (Table 1).

Table 1. Top 10 differentially expressed transcripts ranked by fold change in uninfected *Ae. albopictus* mosquitoes held at 20°C relative to mosquitoes held at 28°C.

Genes up-regulated*			
Gene ID	Log2FoldChange	Fold Change	Gene description
LOC115259153	5,587	48	non-coding
LOC115264557	5,509	46	non-coding
LOC109405538	4,774	27	non-coding
LOC109405522	4,673	26	non-coding
LOC115257370	4,655	25	non-coding
LOC109421073	4,482	22	protein G12-like
LOC109622154	4,417	21	protein-glucosylgalactosylhydroxylysine glucosidase-like
LOC115270350	4,041	16	non-coding
LOC109431115	3,897	15	uncharacterized protein
LOC109410531	3,828	14	serine protease SP24D-like
Genes down-regulated*			
Gene ID	Log2FoldChange	Fold Change	Gene description
LOC109397960	-5,528	46	non-coding
LOC115269683	-5,251	38	probable cytochrome P450 305a1
LOC109417827	-4,97	31	collagenase-like
LOC109415025	-4,947	31	non-coding
LOC115261041	-4,773	27	pleckstrin homology-like domain family A member 1
LOC109430335	-4,662	25	uncharacterized protein
LOC109425337	-4,63	25	uncharacterized protein
LOC109426788	-4,515	23	collagenase-like
LOC109408610	-4,483	22	dynactin subunit 2
LOC115261074	-4,465	22	extensin-like

*Regulations are shown for 20°C

40% (n=77/193) of the differentially expressed protein-coding genes had functions of interest from an immune and stress response point of view (Table S2). Among them, 45% (n=35/77) were involved in stress-related pathways and 25% (n=19/77) in non-specific immune pathways (Figure 2).

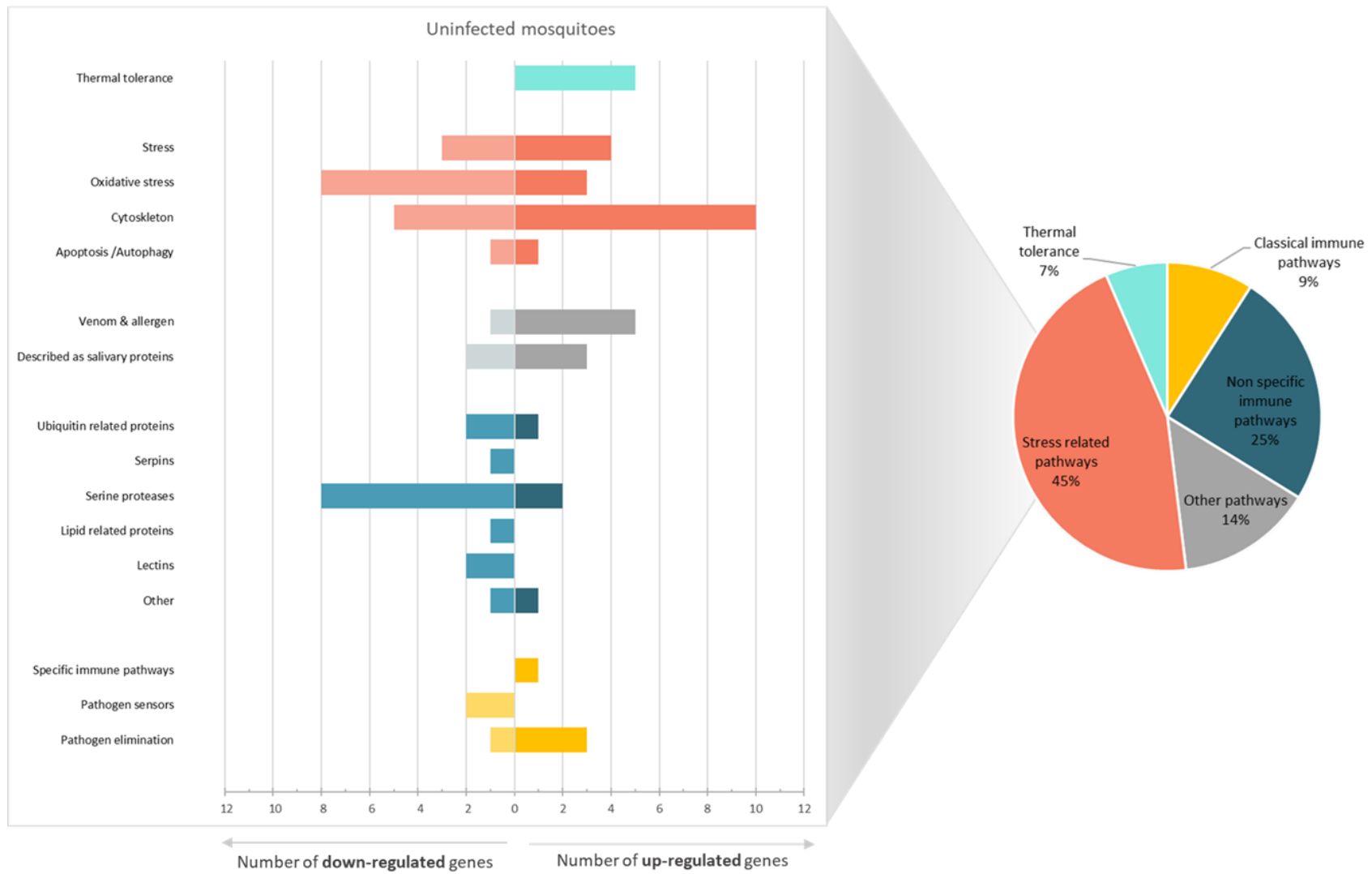
In the stress-related class, functions of DEGs were related to apoptosis/autophagy (n=2/35), cytoskeleton (n=15/35), oxidative stress (n=11/35) and stress (n=7/35) (Figure 2). Most of up-regulated genes at 20°C were in the cytoskeleton subclass (n=10/18) and mainly corresponded to actin paralogs (n=5/10). Most of down-regulated genes were associated to oxidative stress (n=8/17) and mainly corresponded to copies of cytochrome P450 (n=5/8) (Figure 2 and Table S1). In the stress category, expression of heat shock proteins, such as Hsp70 protein cognate 2, Hsp60 and Hsp10 were also detected as deregulated by temperature.

The non-specific immune class was largely represented by the serine proteases family (n=10/19). Down-regulated serine proteases corresponded to chymotrypsin and trypsin (n=5/8), the main proteolytic enzymes in mosquitoes. Up-regulated serine proteases corresponded to the endopeptidases Grass and SP24D. Several serpin, ubiquitin and lectin genes were also differentially expressed in response to temperature.

Other DEGs of interest belonged to classical immune pathways (9%; 7/77), thermal tolerance (7%; 5/77) and other pathways (14%; 11/77) (Figure 2). Aubergine, a PIWI-interacting RNA (piRNAs) protein and phenoloxidase-activating factors, components of melanization, were over-expressed at 20°C. Four isoforms of aquaporins and protein G12, categorized in thermal tolerance subclass, were up-regulated in response to 20°C exposure. Several venom allergens such as Scoloptoxin SSD552, Venom allergen 5.01 and Venom serine protease were also up-regulated (n=5/6) while Cysteine venom protein 6, was strongly down-regulated (21-fold) at 20°C (Table S1).

The comparative transcriptomes analysis of uninfected mosquitoes revealed significant differences in gene expression between mosquitoes held at 20°C and at 28°C. In terms of immune and stress response, genes related to oxidative stress, cytoskeleton and serine proteases were particularly disrupted in response to temperature.

Figure 2. Differentially expressed genes involved in stress and immune pathways of uninfected *Ae. albopictus* held at 20°C relative to those held at 28°C.



Temperature acutely modified response to CHIKV infection of *Aedes albopictus* mosquitoes.

To investigate how CHIKV infection affects mosquito gene expression profiles across different temperatures, we compared CHIKV-infected mosquitoes to uninfected mosquitoes at 20°C and at 28°C. At 9 dpi, the total number of DEGs was three times higher at 20°C compared to 28°C; 602 DEGs were identified at 20°C while only 172 DEGs were detected at 28°C (Table S3, S4 and S5). Genes were mostly up-regulated (124 down-regulated, 478 up-regulated) by CHIKV infection at 20°C, whereas most genes were down-regulated (115 down-regulated, 57 up-regulated) at 28°C (Table S5). The relative portion of differentially expressed non-coding RNA genes (17% (102/602) at 20°C and 22% (38/172) at 28°C) were similar between the two temperatures (Fisher's exact test: $p > 0.05$; Table S5).

The 10 most up- and down-regulated genes (in terms of fold change) were completely different at 20°C and 28°C (Table 2 and 3). At 20°C, the highest up- and down-regulated genes were a GATOR complex protein MIOS-like (72-fold), involved in meiosis, and a transmembrane 9 superfamily member protein (32-fold), respectively (Table 2). Several non-coding (n=5) and uncharacterized function genes (n=6) were also ranked in the 10 most up- and down-regulated genes. At 28°C, the most up-regulated gene was a WW domain-containing adapter protein (55-fold) and the most down-regulated was the cysteine-rich venom protein (39-fold) (Table 3). Other genes ranked in the 10 most deregulated genes at 28°C included a chymotrypsin (20-fold up-regulated), the aquaporin-11 (18-fold up-regulated) and the ficolin-3-like (26-fold down-regulated), acting as lectin in innate immunity (Table 3). Half of the 10 most down-regulated transcripts were non-coding RNAs (Table 3).

Table 2. Top 10 differentially expressed transcripts ranked by fold change in CHIKV-infected *Ae. albopictus* mosquitoes relative to uninfected mosquitoes at 20°C.

Genes up-regulated*			
Gene ID	Log2FoldChange	Fold Change	Gene description
LOC115254907	6,172	72	GATOR complex protein MIOS-like
LOC115257011	6,041	66	pickpocket protein 28-like
LOC115260581	5,648	50	non-coding
LOC109418187	5,635	50	coagulation factor IX-like
LOC109400028	5,501	45	uncharacterized protein
LOC115265713	5,229	38	uncharacterized protein
LOC115261014	5,047	33	uncharacterized protein
LOC109399133	5,01	32	non-coding
LOC109430112	4,94	31	uncharacterized protein
LOC115259648	4,902	30	non-coding
Genes down-regulated*			
Gene ID	Log2FoldChange	Fold Change	Gene description
LOC109417678	-5,007	32	transmembrane 9 superfamily member 2
LOC109429985	-4,987	32	eRF1 methyltransferase catalytic subunit MTQ2-like
LOC115255912	-4,897	30	non-coding
LOC109411765	-4,457	22	embryonic polarity protein dorsal-like
LOC109621362	-4,431	22	non-coding
LOC115264331	-4,211	19	protein THEM6-like
LOC115264687	-4,075	17	uncharacterized protein
LOC109398301	-3,912	15	uncharacterized protein isoform X1
LOC109622262	-3,564	12	synaptic vesicle glycoprotein 2B-like
LOC109400278	-3,549	12	larval cuticle protein A2B-like

*Regulations are shown for infected mosquitoes

Table 3. Top 10 differentially expressed transcripts ranked by fold change in CHIKV-infected *Ae. albopictus* mosquitoes relative to uninfected mosquitoes at 28°C.

Genes up-regulated*			
Gene ID	Log2FoldChange	Fold Change	Gene description
LOC109401243	5,78	55	WW domain-containing adapter protein with coiled-coil homolog isoform X1
LOC109401247	5,15	36	plexin domain-containing protein 2
LOC115255919	5,011	32	non-coding
LOC109433457	4,823	28	fasciclin-3-like
LOC109424355	4,76	27	uncharacterized protein
LOC109398506	4,499	23	uncharacterized protein isoform X2
LOC109621229	4,344	20	40S ribosomal protein S19a-like
LOC115267286	4,339	20	chymotrypsin-2-like
LOC115258275	4,167	18	uncharacterized protein isoform X1
LOC109401196	4,135	18	aquaporin-11
Genes down-regulated*			
Gene ID	Log2FoldChange	Fold Change	Gene description
LOC109400762	-5,301	39	cysteine-rich venom protein 6-like
LOC115254337	-5,261	38	non-coding
LOC115267760	-5,227	37	uncharacterized protein isoform X2
LOC109400782	-5,201	37	farnesol dehydrogenase-like
LOC115270161	-5,136	35	non-coding
LOC115258929	-5,043	33	non-coding
LOC109415215	-4,739	27	non-coding
LOC109429718	-4,694	26	ficolin-3-like
LOC109406713	-4,542	23	non-coding
LOC109428377	-4,361	21	pancreatic lipase-related protein 2-like

*Regulations are shown for infected mosquitoes

Mosquito responses to infection at 20°C and 28°C were further characterized by analyzing functional annotations across classes and subclasses related to immunity and stress pathways.

At 20°C, 24% (145/602) of DEGs were coding for functions of interest; 128 were up-regulated and 17 down-regulated by CHIKV infection (Table S5). Among them, 34% (50/145) belonged to the stress-related class, 30% (43/145) to the non-specific immune class and 27% (39/145) to the classical immune class (Figure 3).

The vast majority of DEGs identified in the stress-related pathways were up-regulated (n=42/50). They were involved in apoptosis/autophagy (n=8/50), cytoskeleton (n=8/50), lysosome activity (n=6/50), oxidative stress (15/50), signaling/regulation (n=8/50) and stress (5/50) (Figure 3). The oxidative stress was represented by transcripts of several copies of cytochrome P450 (n=11/14), especially cytochrome P450 9f2 paralogs (n=8/11), peroxidase and glutathione-S-transferase (Figure 3 and Table S4). The apoptosis/autophagy and lysosome

activities were represented by paralogs of croquemort-like, programmed cell death and lysosomal proteins (Figure 3). The signaling/regulation category involved several transcripts of the Ras_ERK signaling pathway and the stress-activated protein kinase JNK-like. Several transcripts coding for chitinase and endochitinase were also detected (stress category) (Figure 3 and Table S4). The cytoskeleton activity was characterized by the overexpression of myosin-M heavy chain-like, gelsolin, glutactin-like proteins whereas actin-related protein 8, gelsolin, microfibril-associated glycoprotein 4-like were down-regulated during infection at 20°C (Figure 3 and Table S4).

Similarly, most of the DEGs involved in the non-specific immune pathway were up-regulated (n=38/43). (Figure 3 and Table S4). Serine proteases (n=21/43), lectins (n=2/43), serpins (n=5/43), ubiquitin (n=3/43) and lipid-related proteins (n=5/43) such as apolipoprotein or palmitoyl-protein thioesterase were actively transcribed (Figure 3 and Table S4). Interestingly, up-regulated serine proteases (n=19/21) showed a wide variety of functions, with the expression of CLIP, easter, grass, stubble, trypsin and transmembrane serine proteases (Table S4). In addition, several transcripts coding for metalloproteinases (peptidases) and multidrug resistance-associated proteins (ABC transporters) (other subclass) were deregulated during infection at 20°C.

DEGs of the classical immune pathways were almost exclusively up-regulated (n=38/39) (Figure 3). Pathogen sensors were mainly represented by leucine-rich repeat proteins (n=13/15). Pathogen elimination genes consisted of melanization components (n=9/16) such as phenoloxidase-activating factor 2 and some antimicrobial peptides (AMPs), like cecropin and defensins A and C (Table S4). The RNAi pathway, with Dicer and Argonaute-2 (n=2/8) and the Toll pathway, with the Toll-receptor 7 and three copies of the Toll ligand spaetzle (n=4/8) were the two specific immune pathways found activated by CHIKV infection (Table S4).

At last, five venom allergens corresponding to venom protease-like isoform X1 and X2, venom carboxylesterase-6-like, u-scoloptoxin (19)-Sm1a and venom serine carboxypeptidase-like were up-regulated while the scoloptoxin SSD976-like was down-regulated by infection at 20°C. No gene for thermal tolerance was detected at 9 dpi at 20°C (Figure 3 and Table S4).

At 28°C, we found only 25 DEGs coding for functions of interest (15%; 25/172); 11 were up-regulated and 14 were down-regulated by infection at 9 dpi (Table S5). They mainly

concerned oxidative stress (n=5) and serine proteases (n=5) subclasses (Figure 4). In the oxidative stress category, the three down-regulated genes corresponded to a peroxidase and two paralogs of cytochrome P450 (4C1, LOC109431816 and 6a14, LOC115269310). The two up-regulated genes were a glutathione S-transferase and another gene of cytochrome P450 6a14 (LOC109409160) (Figure 4 and Table S3).

Serine proteases were the only up-regulated genes of the non-specific immune pathways and corresponded mainly to chymotrypsin genes (n=3/5) for proteolytic degradation (Figure 4 and Table S3).

Infection at 28°C activated one gene of the thermal tolerance class (4%; 1/25) which is the highly up-regulated aquaporin-11 (top 10) (Figure 4 and Table S3). In the classical immune pathways (4%; 1/25), the only disrupted gene was a down-regulated pathogen sensor (peptidoglycan-recognition protein LB-like) (Figure 4 and Table S3). The three genes identified in the other pathways class (12%) corresponded to a down-regulated alpha-amylase I-like and two venom allergens; the cysteine-rich venom protein 6-like, down-regulated and, the venom allergen 5.01, up-regulated (Figure 4 and Table S3).

Finally, we identified only 10 DEGs in common, when comparing responses to CHIKV infection at 20°C (n=602) and at 28°C (n=172) (Table S6). Three of them were expressed in a similar way at both temperatures (up- or down-regulated) while the seven others showed opposite expression according temperature (down-regulated at 28°C and up-regulated at 20°C) (Table S6).

The comparison of transcriptomes of CHIKV-infected *versus* uninfected mosquitoes held at 20°C and at 28°C allowed us to describe the response to infection at 9 dpi. Gene expression profiles and pathways were clearly different at 20°C and at 28°C. Interestingly, genes of classical immune pathways were active at 20°C but not at 28°C.

Figure 3. Differentially expressed genes involved in stress and immune pathways of CHIKV-infected *Ae. albopictus* mosquitoes relative to uninfected mosquitoes at 20°C.

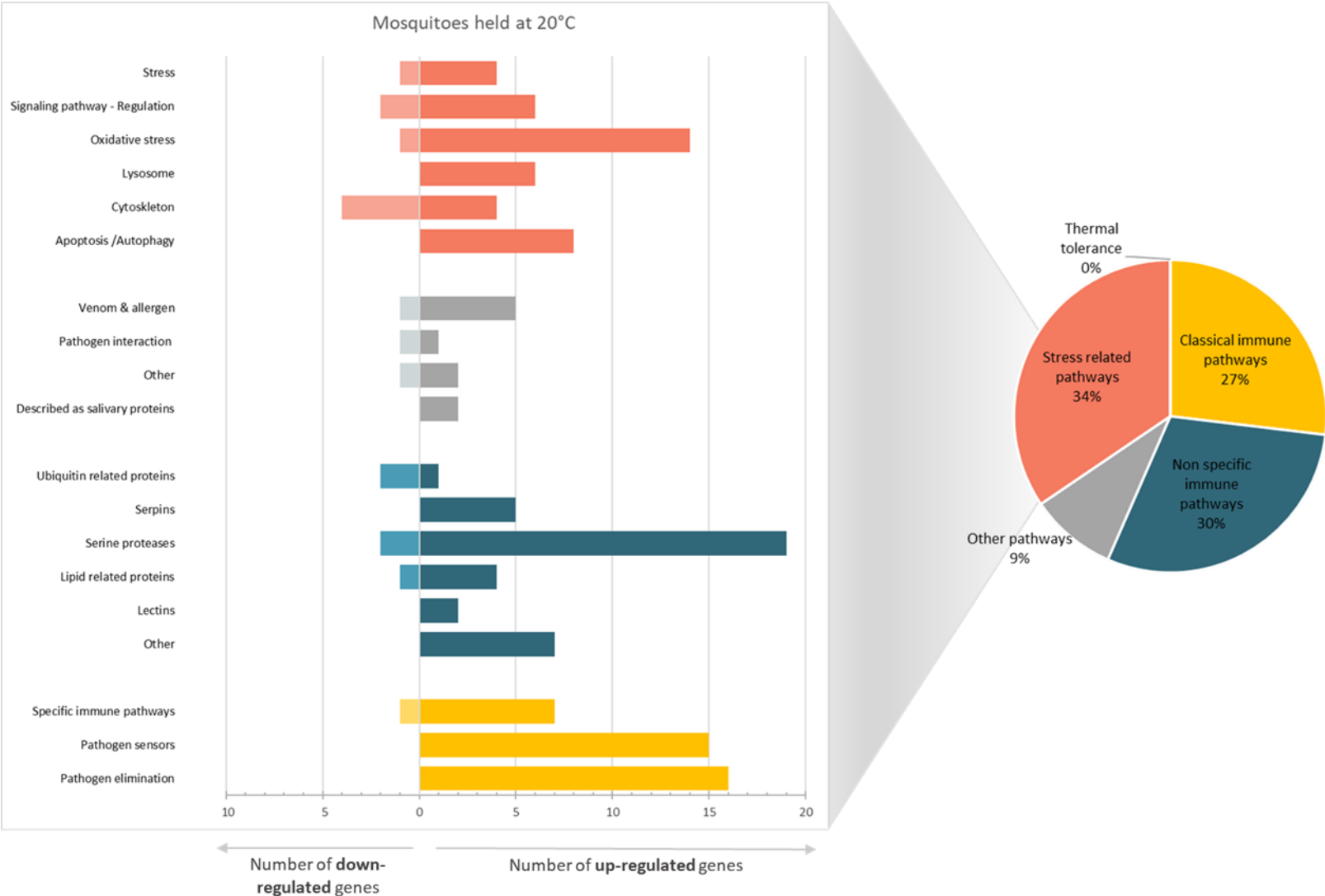
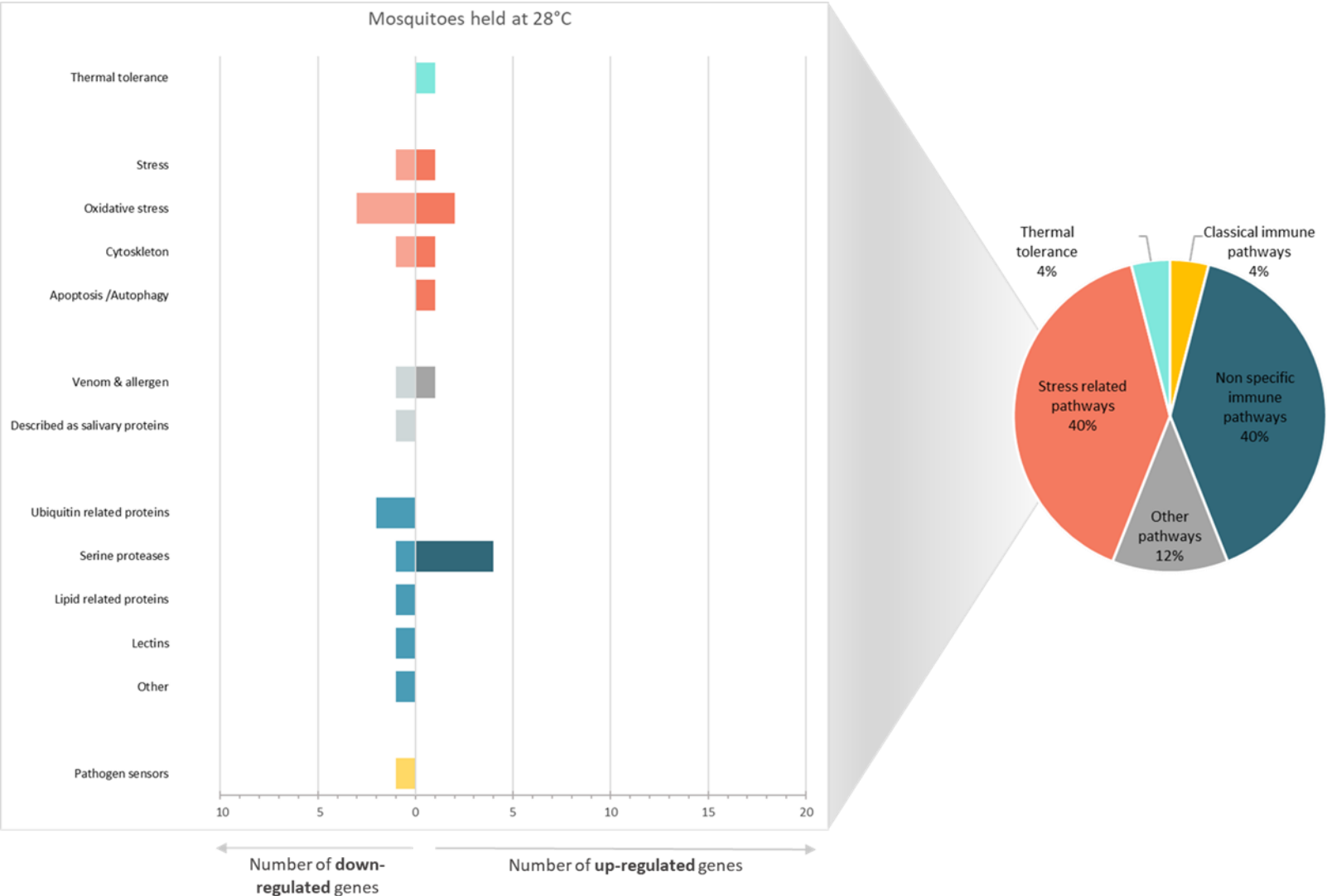


Figure 4. Differentially expressed genes involved in stress and immune pathways of CHIKV-infected *Ae. albopictus* mosquitoes relative to uninfected mosquitoes at 28°C.



Temperature heavily affects gene expression profiles of CHIKV-infected *Ae. albopictus* mosquitoes.

To assess the effect of temperature during infection, we compared mosquito gene expression profiles between CHIKV-infected mosquitoes held at 20°C and 28°C. We identified a total of 906 DEGs; 552 were up-regulated and 354 were down-regulated at 20°C compared to 28°C (Tables S7 and S8). 17% of DEGs (155/906) corresponded to non-coding RNA genes and 83% (751/906) were coding genes with either known (617/751) or unknown (134/751) functions (Table S8).

Transcripts with the highest up- and down-regulation (in terms of fold change) at 20°C were a non-coding RNA (LOC115270161; 46-fold) and an embryonic polarity protein (37-fold), respectively (Table 4). Other DEGs ranked in the 10 most up- or down-regulated transcripts included five non-coding RNAs, four proteins with unknown functions and several proteins involved in various cellular processes (n=9) (e.g. fatty acid synthase, 60S ribosomal protein, plexin domain-containing protein and cell wall mannoprotein PIR3) (Table 4).

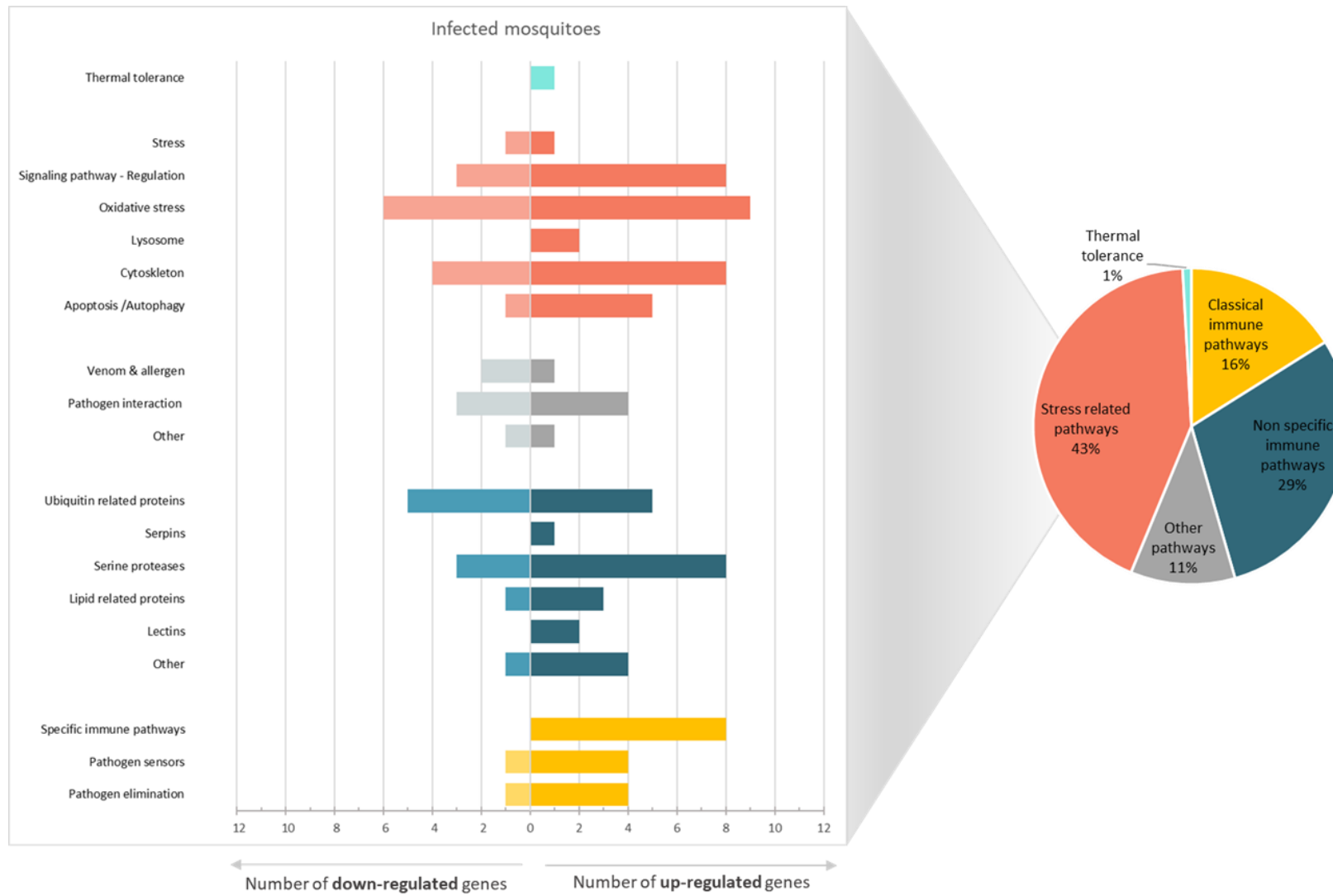
We identified 112 DEGs coding for function of interest (12%; 112/906); 552 were up-regulated and 354 were down-regulated at 20°C compared to 28°C (Table S8). Given the large difference between responses to infection at 20°C and at 28°C, many DEGs recruited by infection (described above) were found differentially expressed between infected mosquitoes at 20°C and 28°C. Most DEGs belonged to stress-related (43%; 48/112) and non-specific immune classes (29%; 33/112) (Figure 5). DEGs in the stress-related pathways were mostly up-regulated (n=33/48) at 20°C, in particular in the oxidative stress (n=9/15), cytoskeleton (n=8/12) and signaling/regulation (n=8/11) subclasses (Figure 5). DEGs of the non-specific immune pathways class were mainly involved in the serine proteases (n=11/33) and the ubiquitin-related proteins (n=10/33) subclasses (Figure 5). Most of up-regulated genes (n=8/23) were related to serine proteases whereas most of down-regulated genes (n=5/10) were associated to ubiquitin-related proteins (Figure 5 and Table S7). DEGs of classical immune pathways (16%; 18/112) were widely up-regulated at 20°C (n=16/18), especially specific immune pathways (n=8/16) which included components of the RNAi and Toll pathways (Figure 5 and Table S7).

Table 4. Top 10 differentially expressed transcripts ranked by fold change in CHIKV-infected *Ae. albopictus* mosquitoes held at 20°C relative to mosquitoes held at 28°C.

Genes up-regulated*			
Gene ID	Log2FoldChange	Fold Change	Gene description
LOC115270161	5,534	46	non-coding
LOC109622851	5,173	36	uncharacterized protein isoform X2
LOC115257696	5,082	34	non-coding
LOC115265185	4,724	26	fatty acid synthase-like
LOC115255855	4,686	26	60S ribosomal protein L11
LOC109427118	4,409	21	non-coding
LOC109396980	4,408	21	cuticle protein 64-like
LOC115267325	4,35	20	uncharacterized protein K02A2.6-like
LOC109405538	4,221	19	non-coding
LOC115267924	4,071	17	uncharacterized protein
Genes down-regulated*			
Gene ID	Log2FoldChange	Fold Change	Gene description
LOC109411765	-5,221	37	embryonic polarity protein dorsal-like
LOC109401247	-5,183	36	plexin domain-containing protein 2
LOC109422762	-4,822	28	cell wall mannoprotein PIR3
LOC109426788	-4,672	25	collagenase-like
LOC109417827	-4,499	23	collagenase-like
LOC109428846	-4,126	17	uncharacterized protein
LOC115265785	-4,12	17	non-coding
LOC109401269	-3,844	14	tubulin-specific chaperone E
LOC115264598	-3,828	14	histone H1-like
LOC115257519	-3,823	14	non-coding

*Regulations are shown for 20°C

Figure 5. Differentially expressed genes involved in stress and immune pathways of CHIKV-infected *Ae. albopictus* held at 20°C relative to those held at 28°C.



To further identify genes that are markedly influenced by temperature, we compared DEGs altered by temperature in uninfected (n=296) and CHIKV-infected (n=906) mosquitoes. We found 37 DEGs common to both conditions (Table 5). Among these shared DEGs, 26 were similarly regulated (up- or down-regulated in both infected and uninfected conditions) and 13 had inverse expression profiles (up-regulated in one condition and down-regulated in the other) (Table 5). Proteins similarly deregulated (n=19) included two peroxidases, an aquaporin AQPAn.G, a heat-shock-70 binding protein and a myosin up-regulated, and a down-regulated glutathione S-transferase D7 (Table 5). Proteins differentially deregulated (n=9) were at 20°C all down-regulated in uninfected and up-regulated in CHIKV-infected mosquitoes (e.g., multidrug resistance-associated protein 9, cytochrome P450 9f2, defensin C, etc.), except one protein (a chitinase) for which the opposite was observed (Table 5). Three shared DEGs were ranked in the 10 most up-regulated (non-coding RNA LOC109405538) and down-regulated (two collagenase proteins) transcripts of both uninfected and infected mosquitoes (Tables 1, 4 and 5).

The comparative transcriptome analysis of CHIKV-infected mosquitoes revealed substantial differences in gene expression between mosquitoes held at 20°C and 28°C.

Table 5. Differentially expressed transcripts at 20°C relative to 28°C shared in both CHIKV-infected and uninfected *Ae. albopictus* mosquitoes.

Non-coding			Log2FoldChange		Fold Change	
Regulation	Gene ID	Gene description	Uninfected	Infected	Uninfected	Infected
Up	LOC109405538*		4,774	4,221	27	19
	LOC115258217		1,091	1,098	2	2
Down	LOC115257519		-3,506	-3,823	11	14
	LOC115265218		-1,234	-1,818	2	4
Up/Down	LOC115255308		-1,578	3,031	3	8
	LOC115264302		-2,148	1,56	4	3
Coding: uncharacterized			Log2FoldChange		Fold Change	
Regulation	Gene ID	Gene description	Uninfected	Infected	Uninfected	Infected
Up	LOC109398941	uncharacterized protein	2,896	2,752	7	7
Up/Down	LOC109402566	uncharacterized protein	-1,618	1,49	3	3
	LOC115265344	uncharacterized protein	-1,805	1,577	3	3
Coding: characterized			Log2FoldChange		Fold Change	
Regulation	Gene ID	Gene description	Uninfected	Infected	Uninfected	Infected
Up	LOC109398465	peroxidase	2,729	1,882	7	4
	LOC109407239	alpha-aminoadipic semialdehyde synthase	2,133	1,523	4	3
	LOC109407520	homeobox protein six1b	1,756	1,244	3	2
	LOC109408711	aquaporin AQPAn.G isoform X1	1,582	1,351	3	3
	LOC109414070	sphingomyelin phosphodiesterase-like	2,524	2,704	6	7
	LOC109416351	(11Z)-hexadec-11-enoyl-CoA conjugase-like	1,67	1,602	3	3
	LOC109420505	solute carrier organic anion transporter family member 4A1-like	2,256	2,079	5	4
	LOC109423458	synaptic vesicle glycoprotein 2B-like	1,696	1,534	3	3
	LOC109431038	myosin-IIIa-like	1,154	1,556	2	3
	LOC109622683	peroxidase	2,739	2,235	7	5
	LOC115253828	hsp70-binding protein 1-like	3,14	3,07	9	8
	LOC115255819	solute carrier organic anion transporter family member 4A1-like	2,303	2,764	5	7
	LOC115256103	sphingomyelin phosphodiesterase-like	2,907	2,941	8	8
	LOC115256509	synaptic vesicle glycoprotein 2A-like isoform X3	1,78	1,424	3	3
	LOC115269057	splicing factor 3B subunit 1-like isoform X1	2,155	2,877	4	7
Down	LOC109417827*	collagenase-like	-4,97	-4,499	31	23
	LOC109421521	protein ABHD11	-0,656	-0,716	2	2
	LOC109426788*	collagenase-like	-4,515	-4,672	23	25
	LOC115262057	glutathione S-transferase D7-like	-2,01	-2,6	4	6
Up/Down	LOC109400094	multidrug resistance-associated protein 9-like	-0,871	2,302	2	5
	LOC109403928	probable cytochrome P450 9f2	-1,272	1,662	2	3
	LOC109408659	xanthine dehydrogenase 1-like isoform X2	-0,746	0,546	2	1
	LOC109409889	defensin-C	-2,527	2,82	6	7
	LOC109411468	myogenesis-regulating glycosidase-like	-2,437	1,606	5	3
	LOC109411696	lipoma-preferred partner homolog	-1,006	2,129	2	4
	LOC109412833	lipase 3-like isoform X2	-1,792	1,666	3	3
	LOC109415349	histidine-rich glycoprotein-like	-3,887	2,203	15	5
	LOC115262777	chitinase	2,212	-2,359	5	5

(*) Top 10 transcripts

Discussion

Temperature is a key driver of vector-borne disease transmission (Carrington, Armijos, Lambrechts, & Scott, 2013; Johnson et al., 2015; Kilpatrick, Meola, Moudy, & Kramer, 2008; Mordecai et al., 2017; Tesla et al., 2018). Transmission potential of CHIKV by *Ae. albopictus* was demonstrated to strongly depends on the three-way interplay of mosquito population, virus strain and ambient temperature (Zouache et al., 2014). Such GxGxE interactions could explain variations in occurrence, dynamics and distribution of mosquito-borne diseases, but very little is currently understood about the underlying mechanisms involved (Adelman et al., 2013; Murdock, Paaijmans, Bell, et al., 2012; Murdock, Paaijmans, Cox-Foster, et al., 2012). Regulation of gene expression is a common mechanism that organisms use to adapt their phenotypes and maintain fitness in response to stressors such as temperature changes (Piglucci, 1996; Sorensen et al., 2020). In this study, we aimed at understanding how mosquito responses to temperature interfere with those of infection, with attention paid to the consequences on virus transmission.

When infecting *Ae. albopictus* with CHIKV and examining viral loads in saliva at 9 dpi after exposure at 20°C or 28°C, we found that the proportion of mosquitoes with virus in saliva (i.e., transmission efficiency) was lower but the mean number of viral particles in saliva was higher at 20°C compared to 28°C, suggesting that at 20°C, less mosquitoes were able to transmit but the viral loads excreted were highly variable and could reach 380 particles per mosquito. Our data suggest that exposure to cooler temperatures after CHIKV infection affect viral transmission. The temperature of 20°C might have altered mosquito gene expression including genes related to mosquito antiviral responses such as RNA interference (Blair & Olson, 2015) and likely also virus replicative capacity (Aliota & Kramer, 2012). The outcome will depend on a subtle balance between these factors. One scenario would be that lower temperatures affect more negatively virus replication than antiviral immune responses, and then the extrinsic incubation period will extend at lower temperatures lowering transmission efficiencies (Davis, 1932; Watts, Burke, Harrison, Whitmire, & Nisalak, 1987; Wimalasiri-Yapa et al., 2019). Another scenario would be that antiviral immune responses in contrast is more affected than viral replication leading to a higher virus load in mosquitoes and higher transmission efficiencies (Adelman et al., 2013; Kay & Jennings, 2002). Our data lean more for the first scenario that will be explored here after.

We showed that in uninfected mosquitoes, the temperature of 20°C affects significantly the expression of genes related to stress (e.g., oxidative stress, cytoskeleton) and non-specific

immune pathways (e.g., serine proteases). Interestingly, genes expressing isoforms of aquaporin and protein G12, categorized in thermal tolerance were up-regulated. The protein G12, which was described as the most up-regulated transcript at 20°C in *Ae. aegypti* (Ferreira et al., 2020), was the most up-regulated protein (22-fold) in our experiment.

In presence of infection, the effect of temperature on gene expression was deeply altered, both in terms of number of DEGs and gene identities. Despite significant differences in the effect of temperature on uninfected and infected mosquitoes, we identified 37 genes, markedly influenced by temperature, which expressions were altered by temperature regardless of the infectious status of mosquitoes (Table 5). This included two peroxidases, an aquaporin AQPAn.G, a myosin-IIIa and a heat-shock-70 binding protein up-regulated, and a down-regulated glutathione S-transferase D7.

Peroxidase and glutathione S-transferase are enzymes involved in oxidative stress. Oxidative stress in insect can triggered by environmental changes. High levels of oxidative stress have been shown to interfere with pathogen infection (Pan et al., 2012; Shrinet, Bhavesh, & Sunil, 2018).

Aquaporins, are channel proteins that form pores in cell membranes, mainly facilitating transport of water between cells. Studies in insects suggested that aquaporins might contribute to cold tolerance (Clark et al., 2009; Izumi, Sonoda, Yoshida, Danks, & Tsumuki, 2006; Lu et al., 2018). In the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*, increased of aquaporins number, likely improved cells ability to rapidly redistribute water and better protecting themselves against accumulation of osmotic pressures across membrane during freezing in winter (Philip, Kiss, & Lee, 2011; Philip, Yi, Elnitsky, & Lee, 2008).

Myosins are molecular motors best known for their fundamental role in muscle contraction mechanisms. These are proteins associated with the cytoskeleton. Genes of cytoskeleton were strongly up-regulated at 20°C in both uninfected and CHIKV-infected mosquitoes, although different between the two infectious statuses, except the myosin-IIIa. The cytoskeleton is composed of three main kinds of cytoskeletal filaments, microfilaments, microtubules, and intermediate filaments formed by protein polymers such as actin. Some cytoskeletal components play an important function in the survival of organisms at low temperatures. Actin is involved in muscle contraction, cell motility, cytoskeletal structure, cell division, intracellular transport, and cell differentiation (Herman, 1993). Cold tolerance was demonstrated to be associated with the expression of two actins in *Culex pipiens* (Kim, Robich, Rinehart, & Denlinger, 2006). Drastic changes in the arrangement of actin in the midgut in response to

temperature were observed; the polymerized actin becomes more dispersed probably due to the conversion of G-actin, the globular form of actin, to F-actin at low temperatures (Kim et al., 2006). These changes may enhance mosquito survival exposed at low temperatures by consolidating the cytoskeleton and more particularly, of the midgut which is a key organ to facilitate cell entry, transport and egress of viruses in the hemocoel (Naghavi & Walsh, 2017). In our experiment, five actin paralogs were found up-regulated at 20°C in uninfected mosquitoes, whereas in CHIKV-infected mosquitoes actin was not detected as differentially expressed between 20°C and 28°C.

A heat-shock-70 binding protein, were also found up-regulated at 20°C regardless of the infectious status. Analysis of heat-shock binding proteins in mammals suggested their role as negative regulators of heat shock response as it appears to interact with heat-shock factors only during the recovery phase following exposure to heat stress (Satyal, Chen, Fox, Kramer, & Morimoto, 1998).

Heat-shock proteins (Hsps) comprise a highly conserved, ubiquitously expressed family of stress-response proteins. They can function as molecular chaperones, facilitating protein folding, preventing protein aggregation, or targeting improperly folded proteins to degradative pathways (Yeh & Hou, 2013). They can also be induced as a result of stress from temperature, injury and other damaging processes (Sivan, Shriram, Muruganandam, & Thamizhmani, 2017). In this study, Hsp70 cognate 2 was down-regulated while Hsp60 and Hsp10 were up-regulated in response to a temperature of 20°C in unexposed mosquitoes. In CHIKV-infected mosquitoes no Hsp was detected as differentially expressed between 20°C and 28°C.

Among the 37 genes markedly affected by temperature, 13 were differentially regulated according to the infectious status, suggesting that the effect of temperature on these genes is overcome by the effect of CHIKV infection. That includes, a chitinase involved in stress responses, a defensin C antimicrobial peptide, and a cytochrome P450 9f2, down-regulated at 20°C in uninfected mosquitoes and up-regulated in infected mosquitoes, except for the chitinase for which it was the opposite.

Cytochromes P450 (CYPs) are enzymes involved in several cellular functions such as oxidative stress, respiration and apoptosis. They are able to metabolize hormones, chemicals, fatty acids and detoxify xenobiotic substances (Feyereisen, 1999). In mosquitoes, infection with arboviruses results in the altered expression of CYPs transcripts (Behura et al., 2011; Bonizzoni et al., 2012; Colpitts et al., 2011). A decreased expression of CYP in *Ae. aegypti* is associated with reduced DENV infection, probably due to enhancement of ROS and immune factors

(Baron, Ursic-Bedoya, Lowenberger, & Ocampo, 2010). Similarly, a high load of *Wolbachia* endosymbionts may trigger an upregulation of CYP gene expression which could also be associated with increased virus blocking effect (Sinkins, 2013). Thus, disturbances in detoxification caused by symbionts or pathogens could have significant effects on viral immunity and viral transmission.

Importantly, several non-coding RNA genes were differentially expressed in response to temperature in both uninfected and CHIKV-infected mosquitoes. Growing evidence strongly suggests that viruses and their hosts employ non-coding RNAs to modulate the outcome of infection in their own favor (Rajput et al., 2020). In insects, long non-coding RNAs (lncRNAs) are appearing as an important class of regulatory RNAs with a variety of biological functions, especially in the regulation of host–pathogen interactions (Etebari, Asad, Zhang, & Asgari, 2016; Satyavathi, Ghosh, & Subramanian, 2017).

Genes with uncharacterized functions were also identified as very sensitive to temperature, highlighting the importance of continuing genome annotation of *Ae. albopictus*.

The comparison of transcriptomes of CHIKV-infected *versus* uninfected mosquitoes allowed us to describe mosquito responses to infection at 20°C and 28°C, at 9 dpi. Gene expression profiles were quantitatively (more than 3-fold more DEGs at 20°C than at 28°C) and qualitatively very different between 28°C and 20°C. At 20°C, genes examined were massively up-regulated, in particular, for oxidative stress, serine proteases, pathogen sensors and pathogen elimination, these latter belonging to the classical immune pathways. Elements of the small interfering RNA (siRNA) (Dicer and Argonaute-2) and the Toll pathways (Toll-like receptor and its ligand spätzle) were also recruited in response to infection at 20°C. It is now well recognized that Toll and especially siRNA pathways play a substantial role in viral defense (Blair & Olson, 2015; Xi, Ramirez, & Dimopoulos, 2008).

This pattern was not found in the response to infection at 28°C, suggesting that temperature is a key factor in modulating gene expression in response to viral infection. At 28°C, infected mosquitoes were rather similar to uninfected mosquitoes (172 DEGs). Surprisingly, genes of classical immune pathways were not active during infection at 28°C at 9 dpi. This may be due to a timing offset between 28°C and 20°C. Mosquitoes were taken during late stage of infection, may be at a time where mosquitoes regulate their immune responses to facilitate the establishment of viral persistence.

However, all these transcriptional differences at 20°C and 28°C led to similar transmission efficiencies and even to higher mean viral load at 20°C instead of limiting virus replication.

For successful transmission, viruses must penetrate into the midgut epithelial cell and replicate efficiently to escape mosquito tissue barriers. During this journey within the vector, several mechanisms intervene in concert to limit the virus production. Our results suggest that other factors may counteract the effect of temperature on immune responses. Mosquito's microbiota elicits a basal immune activity that appears to act against dengue virus infection. Conversely, the elicitation of the mosquito immune response by dengue virus infection itself influences the microbial load of the mosquito midgut (Ramirez et al., 2012).

Moreover, the efficiency of each molecular pathway may depend on the timing and intensity to trigger an effect. In addition, regulation at the translational level may add another level of complexity in the interpretation of observed phenotypes.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank P. Bousses, D. Jiolle and C. Paupy (IRD, Montpellier) for their help in collecting mosquitoes. Sequencing was outsourced and managed by E. Turc, L. Motreff and L. Lemée, Biomics Platform, C2RT, Institut Pasteur, Paris, France, supported by France Génomique (ANR-10-INBS-09-09) and IBISA.

FUNDING

This study was supported by the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant n°ANR-10-LABX-62-IBEID), the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under ZIKAlliance grant agreement No 734548 and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 731060 (Infravec2, Research Infrastructures for the control of vector-borne diseases; <http://infravec2.eu/>). RB was supported by Infravec2. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Adelman, Z. N., Anderson, M. A., Wiley, M. R., Murreddu, M. G., Samuel, G. H., Morazzani, E. M., & Myles, K. M. (2013). Cooler temperatures destabilize RNA interference and increase susceptibility of disease vector mosquitoes to viral infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(5), e2239. doi:10.1371/journal.pntd.0002239
- Aliota, M. T., & Kramer, L. D. (2012). Replication of West Nile virus, Rabensburg lineage in mammalian cells is restricted by temperature. *Parasit Vectors*, 5, 293. doi:10.1186/1756-3305-5-293
- Baron, O. L., Ursic-Bedoya, R. J., Lowenberger, C. A., & Ocampo, C. B. (2010). Differential gene expression from midguts of refractory and susceptible lines of the mosquito, *Aedes aegypti*, infected with Dengue-2 virus. *J Insect Sci*, 10, 41. doi:10.1673/031.010.4101
- Barzon, L. (2018). Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol*, 107, 38-47. doi:10.1016/j.jcv.2018.08.007
- Behura, S. K., Gomez-Machorro, C., Harker, B. W., deBruyn, B., Lovin, D. D., Hemme, R. R., . . . Severson, D. W. (2011). Global cross-talk of genes of the mosquito *Aedes aegypti* in response to dengue virus infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(11), e1385. doi:10.1371/journal.pntd.0001385
- Bellone, R., & Failloux, A. B. (2020). The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission. *Front Microbiol*, 11, 584846. doi:10.3389/fmicb.2020.584846
- Blair, C. D., & Olson, K. E. (2015). The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses*, 7(2), 820-843. doi:10.3390/v7020820
- Bonizzoni, M., Dunn, W. A., Campbell, C. L., Olson, K. E., Marinotti, O., & James, A. A. (2012). Complex modulation of the *Aedes aegypti* transcriptome in response to dengue virus infection. *PLoS One*, 7(11), e50512. doi:10.1371/journal.pone.0050512
- Calba, C., Guerbois-Galla, M., Franke, F., Jeannin, C., Auzet-Caillaud, M., Gard, G., . . . Leparac-Goffart, I. (2017). Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Euro Surveill*, 22(39). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00647
- Carrington, L. B., Armijos, M. V., Lambrechts, L., & Scott, T. W. (2013). Fluctuations at a low mean temperature accelerate dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(4), e2190. doi:10.1371/journal.pntd.0002190
- Clark, M. S., Thorne, M. A., Purac, J., Burns, G., Hillyard, G., Popovic, Z. D., . . . Worland, M. R. (2009). Surviving the cold: molecular analyses of insect cryoprotective dehydration in the Arctic springtail *Megaphragma arctica* (Tullberg). *BMC Genomics*, 10, 328. doi:10.1186/1471-2164-10-328
- Cokelaer, T., Desvillechabrol, D., Legendre, R., & Cardon, M. (2017). 'Sequana': a Set of Snakemake NGS pipelines. *Journal of Open Source Software*, 2(16), 352.
- Colpitts, T. M., Cox, J., Vanlandingham, D. L., Feitosa, F. M., Cheng, G., Kurscheid, S., . . . Fikrig, E. (2011). Alterations in the *Aedes aegypti* transcriptome during infection with West Nile, dengue and yellow fever viruses. *PLoS Pathog*, 7(9), e1002189. doi:10.1371/journal.ppat.1002189
- Davis, N. C. (1932). The effect of various temperatures in modifying the extrinsic incubation period of the yellow fever virus in *Aedes aegypti*. *American Journal of Hygiene*, 16(1).
- de Lamballerie, X., Leroy, E., Charrel, R. N., Ttsetsarkin, K., Higgs, S., & Gould, E. A. (2008). Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virol J*, 5, 33. doi:10.1186/1743-422X-5-33
- Delisle, E., Rousseau, C., Broche, B., Leparac-Goffart, I., L'Ambert, G., Cochet, A., . . . Golliot, F. (2015). Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill*, 20(17). doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.17.21108

- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., . . . Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15-21. doi:10.1093/bioinformatics/bts635
- Enserink, M. (2007). Infectious diseases. Chikungunya: no longer a third world disease. *Science*, 318(5858), 1860-1861. doi:10.1126/science.318.5858.1860
- Etebari, K., Asad, S., Zhang, G., & Asgari, S. (2016). Identification of *Aedes aegypti* Long Intergenic Non-coding RNAs and Their Association with *Wolbachia* and Dengue Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(10), e0005069. doi:10.1371/journal.pntd.0005069
- Etebari, K., Hegde, S., Saldana, M. A., Widen, S. G., Wood, T. G., Asgari, S., & Hughes, G. L. (2017). Global Transcriptome Analysis of *Aedes aegypti* Mosquitoes in Response to Zika Virus Infection. *mSphere*, 2(6). doi:10.1128/mSphere.00456-17
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Kaller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics*, 32(19), 3047-3048. doi:10.1093/bioinformatics/btw354
- Ferreira, P. G., Tesla, B., Horacio, E. C. A., Nahum, L. A., Brindley, M. A., de Oliveira Mendes, T. A., & Murdock, C. C. (2020). Temperature Dramatically Shapes Mosquito Gene Expression With Consequences for Mosquito-Zika Virus Interactions. *Front Microbiol*, 11, 901. doi:10.3389/fmicb.2020.00901
- Feyereisen, R. (1999). Insect P450 enzymes. *Annu Rev Entomol*, 44, 507-533. doi:10.1146/annurev.ento.44.1.507
- Gubler, D. J. (1996). The global resurgence of arboviral diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90(5), 449-451. doi:10.1016/s0035-9203(96)90286-2
- Gubler, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*, 33(4), 330-342. doi:10.1016/s0188-4409(02)00378-8
- Herman, I. M. (1993). Actin isoforms. *Curr Opin Cell Biol*, 5(1), 48-55. doi:10.1016/s0955-0674(05)80007-9
- Izumi, Y., Sonoda, S., Yoshida, H., Danks, H. V., & Tsumuki, H. (2006). Role of membrane transport of water and glycerol in the freeze tolerance of the rice stem borer, *Chilo suppressalis* Walker (Lepidoptera: Pyralidae). *J Insect Physiol*, 52(2), 215-220. doi:10.1016/j.jinsphys.2005.11.001
- Johnson, L. R., Ben-Horin, T., Lafferty, K. D., McNally, A., Mordecai, E., Paaijmans, K. P., . . . Ryan, S. J. (2015). Understanding uncertainty in temperature effects on vector-borne disease: a Bayesian approach. *Ecology*, 96(1), 203-213. doi:10.1890/13-1964.1
- Kay, B. H., & Jennings, C. D. (2002). Enhancement or modulation of the vector competence of *Ochlerotatus vigilax* (Diptera: Culicidae) for ross river virus by temperature. *J Med Entomol*, 39(1), 99-105. doi:10.1603/0022-2585-39.1.99
- Kilpatrick, A. M., Meola, M. A., Moudy, R. M., & Kramer, L. D. (2008). Temperature, viral genetics, and the transmission of West Nile virus by *Culex pipiens* mosquitoes. *PLoS Pathog*, 4(6), e1000092. doi:10.1371/journal.ppat.1000092
- Kim, M., Robich, R. M., Rinehart, J. P., & Denlinger, D. L. (2006). Upregulation of two actin genes and redistribution of actin during diapause and cold stress in the northern house mosquito, *Culex pipiens*. *J Insect Physiol*, 52(11-12), 1226-1233. doi:10.1016/j.jinsphys.2006.09.007
- Koster, J., & Rahmann, S. (2012). Snakemake--a scalable bioinformatics workflow engine. *Bioinformatics*, 28(19), 2520-2522. doi:10.1093/bioinformatics/bts480
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R. G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., Jarman, R. G., & Scott, T. W. (2009). Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol*, 9, 160. doi:10.1186/1471-2148-9-160

- Lambrechts, L., Halbert, J., Durand, P., Gouagna, L. C., & Koella, J. C. (2005). Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malar J*, *4*, 3. doi:10.1186/1475-2875-4-3
- Liao, Y., Smyth, G. K., & Shi, W. (2014). featureCounts: an efficient general purpose program for assigning sequence reads to genomic features. *Bioinformatics*, *30*(7), 923-930. doi:10.1093/bioinformatics/btt656
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*, *15*(12), 550. doi:10.1186/s13059-014-0550-8
- Lu, M. X., Pan, D. D., Xu, J., Liu, Y., Wang, G. R., & Du, Y. Z. (2018). Identification and Functional Analysis of the First Aquaporin from Striped Stem Borer, *Chilo suppressalis*. *Front Physiol*, *9*, 57. doi:10.3389/fphys.2018.00057
- Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal*, *17*, 10-12. doi:https://doi.org/10.14806/ej.17.1.200.
- Mayer, S. V., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop*, *166*, 155-163. doi:10.1016/j.actatropica.2016.11.020
- Mordecai, E. A., Caldwell, J. M., Grossman, M. K., Lippi, C. A., Johnson, L. R., Neira, M., . . . Villena, O. (2019). Thermal biology of mosquito-borne disease. *Ecol Lett*, *22*(10), 1690-1708. doi:10.1111/ele.13335
- Mordecai, E. A., Cohen, J. M., Evans, M. V., Gudapati, P., Johnson, L. R., Lippi, C. A., . . . Weikel, D. P. (2017). Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. *PLoS Negl Trop Dis*, *11*(4), e0005568. doi:10.1371/journal.pntd.0005568
- Murdock, C. C., Paaijmans, K. P., Bell, A. S., King, J. G., Hillyer, J. F., Read, A. F., & Thomas, M. B. (2012). Complex effects of temperature on mosquito immune function. *Proc Biol Sci*, *279*(1741), 3357-3366. doi:10.1098/rspb.2012.0638
- Murdock, C. C., Paaijmans, K. P., Cox-Foster, D., Read, A. F., & Thomas, M. B. (2012). Rethinking vector immunology: the role of environmental temperature in shaping resistance. *Nat Rev Microbiol*, *10*(12), 869-876. doi:10.1038/nrmicro2900
- Naghavi, M. H., & Walsh, D. (2017). Microtubule Regulation and Function during Virus Infection. *J Virol*, *91*(16). doi:10.1128/JVI.00538-17
- Palatini, U., Masri, R. A., Cosme, L. V., Koren, S., Thibaud-Nissen, F., Biedler, J. K., . . . Bonizzoni, M. (2020). Improved reference genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Genome Biol*, *21*(1), 215. doi:10.1186/s13059-020-02141-w
- Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A. S., & Xi, Z. (2012). Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(1), E23-31. doi:10.1073/pnas.1116932108
- Parola, P., de Lamballerie, X., Jourdan, J., Roveery, C., Vaillant, V., Minodier, P., . . . Charrel, R. N. (2006). Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg Infect Dis*, *12*(10), 1493-1499. doi:10.3201/eid1210.060610
- Paupy, C., Ollomo, B., Kamgang, B., Moutailler, S., Rousset, D., Demanou, M., . . . Simard, F. (2010). Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *10*(3), 259-266. doi:10.1089/vbz.2009.0005
- Philip, B. N., Kiss, A. J., & Lee, R. E., Jr. (2011). The protective role of aquaporins in the freeze-tolerant insect *Eurosta solidaginis*: functional characterization and tissue abundance of EsAQP1. *J Exp Biol*, *214*(Pt 5), 848-857. doi:10.1242/jeb.051276

- Philip, B. N., Yi, S. X., Elnitsky, M. A., & Lee, R. E., Jr. (2008). Aquaporins play a role in desiccation and freeze tolerance in larvae of the goldenrod gall fly, *Eurosta solidaginis*. *J Exp Biol*, *211*(Pt 7), 1114-1119. doi:10.1242/jeb.016758
- Pigliucci, M. (1996). How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends Ecol Evol*, *11*(4), 168-173. doi:10.1016/0169-5347(96)10008-2
- Rajput, R., Sharma, J., Nair, M. T., Khanna, M., Arora, P., & Sood, V. (2020). Regulation of Host Innate Immunity by Non-Coding RNAs During Dengue Virus Infection. *Front Cell Infect Microbiol*, *10*, 588168. doi:10.3389/fcimb.2020.588168
- Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Torres Cosme, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M., & Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl Trop Dis*, *6*(3), e1561. doi:10.1371/journal.pntd.0001561
- Reinhold, J. M., Lazzari, C. R., & Lahondere, C. (2018). Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. *Insects*, *9*(4). doi:10.3390/insects9040158
- Rezza, G. (2012). *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. *BMC Public Health*, *12*, 72. doi:10.1186/1471-2458-12-72
- Samuel, G. H., Adelman, Z. N., & Myles, K. M. (2016). Temperature-dependent effects on the replication and transmission of arthropod-borne viruses in their insect hosts. *Curr Opin Insect Sci*, *16*, 108-113. doi:10.1016/j.cois.2016.06.005
- Satyral, S. H., Chen, D., Fox, S. G., Kramer, J. M., & Morimoto, R. I. (1998). Negative regulation of the heat shock transcriptional response by HSBP1. *Genes Dev*, *12*(13), 1962-1974. doi:10.1101/gad.12.13.1962
- Satyavathi, V., Ghosh, R., & Subramanian, S. (2017). Long Non-Coding RNAs Regulating Immunity in Insects. *Noncoding RNA*, *3*(1). doi:10.3390/ncrna3010014
- Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., . . . Brisse, S. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*, *3*(7), e263. doi:10.1371/journal.pmed.0030263
- Shrinet, J., Bhavesh, N. S., & Sunil, S. (2018). Understanding Oxidative Stress in *Aedes* during Chikungunya and Dengue Virus Infections Using Integromics Analysis. *Viruses*, *10*(6). doi:10.3390/v10060314
- Sinkins, S. P. (2013). Wolbachia and arbovirus inhibition in mosquitoes. *Future Microbiol*, *8*(10), 1249-1256. doi:10.2217/fmb.13.95
- Sivan, A., Shriram, A. N., Muruganandam, N., & Thamizhmani, R. (2017). Expression of heat shock proteins (HSPs) in *Aedes aegypti* (L) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) larvae in response to thermal stress. *Acta Trop*, *167*, 121-127. doi:10.1016/j.actatropica.2016.12.017
- Sorensen, J. G., Manenti, T., Bechsgaard, J. S., Schou, M. F., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2020). Pronounced Plastic and Evolutionary Responses to Unpredictable Thermal Fluctuations in *Drosophila simulans*. *Front Genet*, *11*, 555843. doi:10.3389/fgene.2020.555843
- Tesla, B., Demakovskiy, L. R., Mordecai, E. A., Ryan, S. J., Bonds, M. H., Ngonghala, C. N., . . . Murdock, C. C. (2018). Temperature drives Zika virus transmission: evidence from empirical and mathematical models. *Proc Biol Sci*, *285*(1884). doi:10.1098/rspb.2018.0795
- Tilston, N., Skelly, C., & Weinstein, P. (2009). Pan-European Chikungunya surveillance: designing risk stratified surveillance zones. *Int J Health Geogr*, *8*, 61. doi:10.1186/1476-072X-8-61

- Varet, H., Brillet-Gueguen, L., Coppee, J. Y., & Dillies, M. A. (2016). SARTools: A DESeq2- and EdgeR-Based R Pipeline for Comprehensive Differential Analysis of RNA-Seq Data. *PLoS One*, *11*(6), e0157022. doi:10.1371/journal.pone.0157022
- Vedururu, R. K., Neave, M. J., Sundaramoorthy, V., Green, D., Harper, J. A., Gorry, P. R., . . . Paradkar, P. N. (2019). Whole Transcriptome Analysis of *Aedes albopictus* Mosquito Head and Thorax Post-Chikungunya Virus Infection. *Pathogens*, *8*(3). doi:10.3390/pathogens8030132
- Vedururu, R. K., Neave, M. J., Tachedjian, M., Klein, M. J., Gorry, P. R., Duchemin, J. B., & Paradkar, P. N. (2019). RNASeq Analysis of *Aedes albopictus* Mosquito Midguts after Chikungunya Virus Infection. *Viruses*, *11*(6). doi:10.3390/v11060513
- Vega-Rua, A., Zouache, K., Caro, V., Diancourt, L., Delaunay, P., Grandadam, M., & Failloux, A. B. (2013). High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One*, *8*(3), e59716. doi:10.1371/journal.pone.0059716
- Venturi, G., Di Luca, M., Fortuna, C., Remoli, M. E., Riccardo, F., Severini, F., . . . Rizzo, C. (2017). Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Euro Surveill*, *22*(39). doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00646
- Watts, D. M., Burke, D. S., Harrison, B. A., Whitmire, R. E., & Nisalak, A. (1987). Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *Am J Trop Med Hyg*, *36*(1), 143-152. doi:10.4269/ajtmh.1987.36.143
- Wimalasiri-Yapa, B., Barrero, R. A., Stassen, L., Hafner, L. M., McGraw, E. A., Pyke, A. T., . . . Frentiu, F. D. (2021). Temperature modulates immune gene expression in mosquitoes during arbovirus infection. *Open Biol*, *11*(1), 200246. doi:10.1098/rsob.200246
- Wimalasiri-Yapa, B., Stassen, L., Hu, W., Yakob, L., McGraw, E. A., Pyke, A. T., . . . Frentiu, F. D. (2019). Chikungunya Virus Transmission at Low Temperature by *Aedes albopictus* Mosquitoes. *Pathogens*, *8*(3). doi:10.3390/pathogens8030149
- Xi, Z., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*, *4*(7), e1000098. doi:10.1371/journal.ppat.1000098
- Yactayo, S., Staples, J. E., Millot, V., Cibrelus, L., & Ramon-Pardo, P. (2016). Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *J Infect Dis*, *214*(suppl 5), S441-S445. doi:10.1093/infdis/jiw390
- Yeh, S.-L., & Hou, Y.-C. (2013). *Diabetes: Chapter 12. Glutamine and Antioxidant Potential in Diabetes*: Elsevier Inc. Chapters.
- Zeller, H., Van Bortel, W., & Sudre, B. (2016). Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013-2014. *J Infect Dis*, *214*(suppl 5), S436-S440. doi:10.1093/infdis/jiw391
- Zouache, K., Fontaine, A., Vega-Rua, A., Mousson, L., Thiberge, J. M., Lourenco-De-Oliveira, R., . . . Failloux, A. B. (2014). Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci*, *281*(1792). doi:10.1098/rspb.2014.1078

Supplementary data

Table S1. List of differentially expressed transcripts in uninfected mosquitoes held at 20°C relative to those held at 28°C.

Table S2. Number of differentially expressed transcripts in uninfected mosquitoes held at 20°C relative to those held at 28°C.

Uninfected mosquitoes	Total	Up	Down
Non-coding	60	28	32
Coding : uncharacterized	43	14	29
Coding : characterized	193 (77)	83 (39)	110 (38)
Total	296	125	171

In brackets, number of classified genes.

Table S3. List of differentially expressed transcripts in CHIKV-infected mosquitoes relative to uninfected mosquitoes at 28°C.

Table S4. List of differentially expressed transcripts in CHIKV-infected mosquitoes relative to uninfected mosquitoes at 20°C.

Table S5. Number of differentially expressed transcripts in CHIKV-infected mosquitoes relative to uninfected mosquitoes at 28°C (top) and at 20°C (bottom).

28°C	Total	Up	Down
Non-coding	38	12	26
Coding : uncharacterized	34	15	19
Coding : characterized	100 (25)	30 (11)	70 (14)
Total	172	57	115

20°C	Total	Up	Down
Non-coding	102	88	14
Coding : uncharacterized	115	88	27
Coding : characterized	385 (145)	302 (128)	83 (17)
Total	602	478	124

In brackets, number of classified genes.

Table S6. Differentially expressed transcripts in CHIKV-infected *Ae. albopictus* mosquitoes relative to uninfected mosquitoes, common at 28°C and 20°C.

Non-coding			Log2FoldChange		Fold Change	
Regulation*	Gene ID	Gene description	28°C	20°C	28°C	20°C
Up	LOC109410831		1,962	3,497	4	11
Up/Down	LOC115264302		-2,173	1,614	5	3
Coding: uncharacterized			Log2FoldChange		Fold Change	
Regulation*	Gene ID	Gene description	28°C	20°C	28°C	20°C
Up	LOC109413035	uncharacterized protein	1,926	2,68	4	6
Coding: characterized			Log2FoldChange		Fold Change	
Regulation*	Gene ID	Gene description	28°C	20°C	28°C	20°C
Down	LOC109427406	tyrosine aminotransferase	-1,221	-1,196	2	2
	LOC109410517	putative glutamate synthase	-0,572	0,651	1	2
	LOC109411468	myogenesis-regulating glycosidase-like	-2,285	1,651	5	3
	LOC109415349	histidine-rich glycoprotein-like	-2,949	2,997	8	8
Up/Down	LOC109419968	DNA-directed RNA polymerase II subunit rpb1-like	-4,027	2,755	16	7
	LOC109425677	matrix metalloproteinase-14 isoform X6	-0,703	0,604	2	2
	LOC115261074	extensin-like	-3,253	2,826	10	7

*Regulations are shown for infected mosquitoes

Table S7. List of differentially expressed transcripts in CKIKV-infected mosquitoes held at 20°C relative to those held at 28°C.

Table S8. Number of differentially expressed transcripts in CHIKV-infected mosquitoes held at 20°C relative to those held at 28°C.

CHIKV-infected mosquitoes	Total	Up	Down
Non-coding	155	112	43
Coding : uncharacterized	134	82	52
Coding : characterized	617 (112)	358 (79)	259 (33)
Total	906	552	354

In brackets, number of classified genes.

Table S9. Number of differentially expressed genes identified in each class and subclasses.

Class	Subclass	Number of differentially expressed genes
Classical immune pathways	Pathogen elimination	25
	Pathogen sensors	23
	Specific immune pathways	17
Non-specific immune pathways	Other	15
	Lectins	7
	Lipid related proteins	11
	Serine proteases	47
	Serpins	7
	Ubiquitin related proteins	18
Stress-related pathways	Apoptosis /Autophagy	17
	Cytoskeleton	37
	Lysosome	8
	Oxidative stress	46
	Signaling pathway - Regulation	19
	Stress	16
Other Pathways	Described as salivary proteins	8
	Other	5
	Pathogen interaction	9
	Venom & allergen	17
Thermal tolerance	Thermal tolerance	7

6.3. Effet de la température sur le microbiome bactérien d'*Ae. albopictus*

6.3.1. Objectifs

Cette étude vise à analyser l'impact de la température et de l'infection par le CHIKV sur la composition et l'organisation structurelle des communautés bactériennes du moustique *Ae. albopictus*.

6.3.2. Démarche expérimentale

Nous avons comparé les microbiomes bactériens de moustiques incubés à 20°C et à 28°C. Plus précisément, nous avons évalué comment la composition des populations bactériennes est modifiée par la température au cours de l'infection par le CHIKV.

Pour cela, des lots de moustiques ont été infectés avec le clone infectieux E1-226V du CHIKV puis incubés à 20°C ou 28°C (Figure 45). En parallèle, d'autres lots de moustiques ont reçu un repas de sang non-infectieux et ont ensuite été placés à 20°C ou 28°C (Figure 45). Après 8 jours d'incubation, les salives des moustiques exposés au virus ont été récoltées afin d'identifier les individus capables de transmettre le virus et de calculer les efficacités de transmission du virus à chaque température. Parmi les moustiques exposés au virus, on distingue les moustiques pour lesquelles nous avons détecté du virus dans les salives (salive +) et ceux qui à 8 jour post-infection, ne sont pas parvenus à l'étape de transmission (salive -). Nous avons extrait l'ADN de carcasses de moustiques (moustique entier sans tube digestif) selon les six conditions expérimentales : non-exposés/20°C, non-exposés/28°C, exposé-salive-/20°C, exposé-salive-/28°C, exposé-salive+/20°C et exposé-salive+/28°C (Figure 45). Chaque condition expérimentale est représentée par un « *pool* » de six femelles. Deux contrôles négatifs d'extraction ont été utilisés afin d'exclure les ADN bactériens contaminants de l'environnement (kitomes). L'identification des bactéries présentes dans chacun des échantillons se fait par séquençage du gène de l'ARN ribosomal 16S ; un gène bactérien dont les mutations dans les régions variables de la molécule permettent d'identifier les genres et espèces bactériennes.

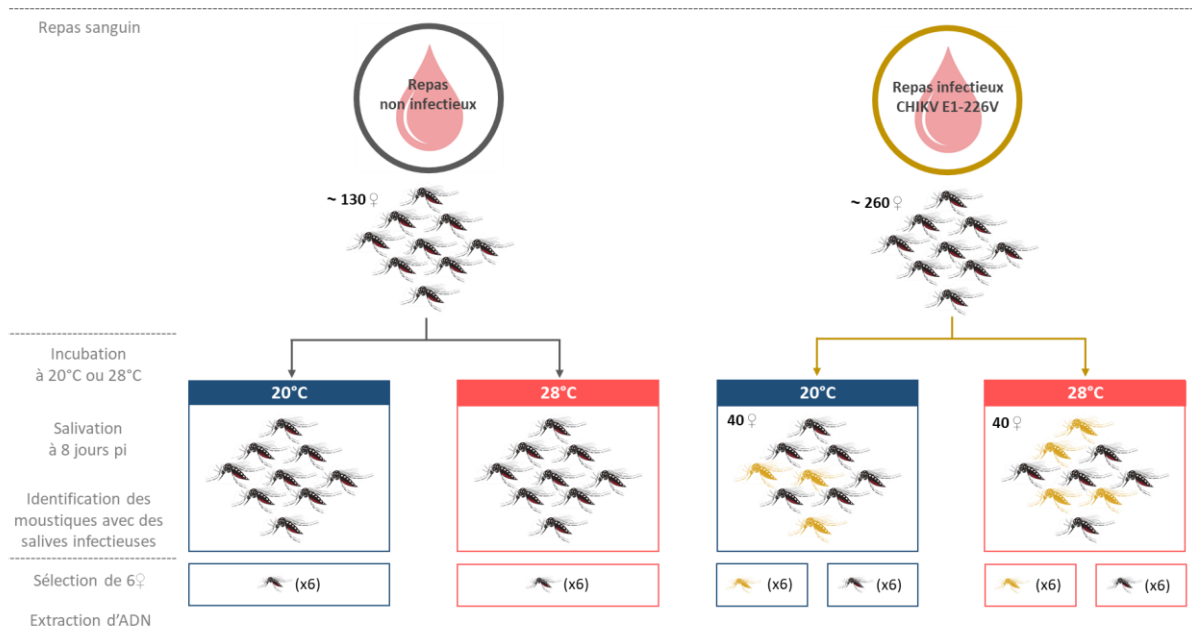


Figure 45. Schéma expérimental d'infection des moustiques pour l'étude du microbiome bactérien. Les moustiques colorés en jaune sont ceux pour lesquels nous avons détecté la présence de CHIKV dans les salives.

6.3.3. Résultats

Notre étude montre que l'infection par le CHIKV modifie le microbiome bactérien d'*Ae. albopictus* différemment en fonction de la température d'incubation. A 28°C, l'infection modifie complètement la composition du microbiome bactérien tandis qu'à 20°C, les changements observés sont plutôt liés à l'abondance relative des bactéries.

Les bactéries du genre *Serratia* sont retrouvées en abondance uniquement lors de l'infection à 28°C.

6.3.4. Conclusion

Dans l'ensemble, nos résultats indiquent qu'il existe une interaction entre les communautés bactériennes, le CHIKV et la température au sein du moustique vecteur *Ae. albopictus*. Bien que des différences dans les microbiomes bactériens de moustiques infectés, incubés à 20°C et 28°C aient été observés, aucun lien n'a pu être fait avec l'efficacité de la transmission virale.

Des études complémentaires seront nécessaires pour savoir dans quel(s) organe(s), la composition de la flore bactérienne est modifiée et par quel(s) mécanisme(s), la présence du virus induit ce changement.

6.3.5. Article

Temperature alters bacterial communities structure in the mosquito *Aedes albopictus* during chikungunya infection

Rachel Bellone,^{1,2} Valentine Gilbert,¹ Laurence Mousson,¹ Jean-Philippe Martinet,³ Catherine Dauga¹ and Anna-Bella Failloux^{1,*,#}

¹ Department of Virology, Institut Pasteur, Arboviruses and Insect Vectors Unit, Paris, France

² Sorbonne Université, Collège Doctoral, F75005 Paris, France

³ Epidémiologie de protozooses à transmission alimentaire et vectorielle (ESCAPE) - EA 7510, UFR Médecine-Pharmacie, Reims, France

#Corresponding author: anna-bella.failloux@pasteur.fr (ABF)

Abstract

Mosquitoes are vectors of arboviruses affecting human and animal health. In addition to participate to mosquito development and reproduction, bacterial communities in mosquitoes intervene in modulating arbovirus transmission. Interestingly, temperature can act in modifying the microbiota composition and distribution in mosquitoes. Using Long Read 16S nanopore sequencing, we proceeded to taxonomic identification of bacterial communities in the mosquito *Aedes albopictus*, unexposed and exposed to a blood meal containing chikungunya virus (CHIKV); samples were examined 8 days after incubation at 20°C or 28°C. We showed that CHIKV infection differently altered *Ae. albopictus* microbiota according to temperature. At 20°C, CHIKV infection led to a slight reduction of *Wolbachia* and an increase of *Asaia* and *Swaminathania* in mosquitoes. More impressively, at 28°C, the composition of bacterial communities changed drastically after CHIKV infection; *Serratia* and other members of the *Enterobacteriaceae* family became the most dominant bacteria. Our data confirm that temperature can modify mosquito bacterial microbiota which may deploy various mechanisms to modify viral replication and transmission. These results may help in developing mosquito control methods based on the use of symbiotically-modified mosquitoes to interfere with pathogen transmission, which must integrate the temperature as a key factor for bacteria establishment and maintenance in the mosquito host.

Keywords: chikungunya virus, temperature, bacterial microbiome, *Ae. albopictus*.

Introduction

Like all eukaryotic organisms, mosquitoes host very complex microbial communities with which they carry durable or transient symbiotic relationships. These micro-organisms, including protozoans, fungi, viruses and bacteria, are in combination with their host referred to as the holobiont (Guegan et al., 2018; Heu & Gendrin, 2018). This concept where macro-organisms and their microbiota are seen as a cooperative unit highlights the strong interactions within the holobiont. Over the last two decades, there has been a growing interest in insect microbiota, which was shown to influence many biological processes of their host (contribution to development, survival, reproduction, immunity and pathogens transmission) (Engel & Moran, 2013; Heu & Gendrin, 2018). Most of the literature focuses on bacteria due to their potential to modulate arboviruses transmission in mosquitoes (Hegde, Rasgon, & Hughes, 2015). Tripartite interactions between arboviruses, mosquito vectors and their bacterial microbiota are such of importance that they became a burgeoning area of research for identifying biological targets and developing novel control strategies (O'Neill, 2018; Ricci et al., 2012). Mosquito bacterial microbiota may employ various mechanisms aiming to alter viral replication and transmission; this includes activation of basal immunity, competition for nutrient resources or production of antiviral factors (Dennison, Jupatanakul, & Dimopoulos, 2014; Hegde et al., 2015).

The composition and the structure of bacterial microbiota vary throughout the mosquito life and depend on dynamic interactions of biological and ecological parameters. Biotic and abiotic factors such as diet (sources of nectars and blood), physicochemical and microbial properties of breeding sites and infection by pathogens can modify the structural organization of mosquitoes bacterial communities (Guegan et al., 2018; Hery et al., 2021; Juma et al., 2021; Minard, Mavingui, & Moro, 2013; Saab et al., 2020; Zouache, Michelland, Failloux, Grundmann, & Mavingui, 2012). Temperature is also known as a substantial factor shaping microbial populations in insects (Kikuchi et al., 2016; Moghadam et al., 2018; Onyango et al., 2020). Precisely how temperature may affect bacterial communities and subsequently, alter arboviruses transmission process by mosquitoes is not well-characterized yet. Deeper understanding of molecular interactions between viruses, vectors and their associated microbiota under different temperatures is especially important for identifying biological constraints on transmission and potential target for vector control measures.

In this study, we examine compositional changes in *Aedes albopictus* mosquitoes bacterial communities associated with chikungunya virus (CHIKV) infection and explore how a low temperature could disturb and modify these changes.

Material and methods

Ethics statement. Animals were housed in the Institut Pasteur animal facilities (Paris) accredited by the French Ministry of Agriculture for performing experiments on live rodents. Work on animals was performed in compliance with French and European regulations on care and protection of laboratory animals (EC Directive 2010/63, French Law 2013-118, February 6th, 2013). All experiments were approved by the Ethics Committee #89 and registered under the reference APAFIS (Autorisation de Projet utilisant des Animaux à des FIns Scientifiques) #6573-2016061412077987 v2.

Mosquitoes. *Aedes albopictus* eggs were sampled in July 2018 in Montpellier, France, using ovitraps (1047 individuals were used to start the colony). The location of Montpellier was chosen as autochthonous CHIKV cases were detected there in 2014 (Delisle et al., 2015). In insectaries, eggs were hatched in 1 L of dechlorinated tap water. Larvae were split in pans of 200 individuals and were fed with yeast tablets (Gayelord Hauser). Water and food were renewed every 2 days. Immature stages were maintained at $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Emerging adults were reared in cages at $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a 12:12 light:dark cycle, 80% relative humidity and fed with a 10% sucrose solution *ad libitum*. To amplify the population, females were blood-fed three times a week on anaesthetized mice (OF1 mice, Charles River laboratories, France).

Chikungunya virus and mosquito infections. Experimental infections of mosquitoes were performed using a CHIKV infectious clone ICRES1, kindly provided by Prof. Andres Merits (Institute of Technology, Tartu, Estonia). The infectious clone was derived from the LR2006-OPY1 CHIKV strain harboring the adaptive E1-A226 V mutation, isolated from the serum of a febrile patient returning from La Réunion Island (La Réunion, ECSA genotype, Accession no. DQ443544.2) (Parola et al., 2006). The infectious clone was produced on BHK-21 cells (Baby Hamster Kidney, ATCC) and store at -80°C prior to its use for mosquito oral infections. The viral titer estimated by focus-forming assay on C6/36 cells (*Ae. albopictus* larval cell line, ATCC) was $10^{9.15}$ focus-forming units per mL (FFU/mL).

Boxes of ~60 10 to 15 day-old females (F5 generation) were sorted and transferred to a biosafety level 3 (BSL-3) insectary ($28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) for a 24 h period of acclimatization and starvation. Mosquitoes were then exposed to a non-infectious or CHIKV-containing blood meal (10^7 FFU/mL). The blood meal contained 2/3 of washed rabbit erythrocytes, 1/3 of media or viral suspension and ATP as a phagostimulant at a final concentration of 10 mM. Engorged females from non-infectious or infectious blood meal were both randomly allocated to two constant temperatures (20°C or $28^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$) in climatic chambers with a 14:10 diurnal cycle and 80 to 90% relative humidity. Mosquitoes were provided 10% sucrose *ad libitum* during the 8 days of incubation.

The temperature of 20°C was chosen as representative of the minimal mean monthly temperature required for CHIKV transmission (Tilston, Skelly, & Weinstein, 2009), whereas 28°C was chosen as a typical average temperature of tropical regions and is commonly used as a standard temperature in CHIKV mosquito infection experiments.

Mosquito salivation. Mosquitoes saliva were collected at 8 days post-infection (dpi) using a protocol of forced salivation described in (Vega-Rua et al., 2013). Briefly, mosquito legs and wings were removed and proboscis were inserted into a micropipette tip filled with 5 μL of fetal bovine serum (FBS). After 45 min, the saliva-containing FBS was expelled in 45 μL of Leibovitz L-15 medium (Invitrogen, CA, USA). Following salivation, saliva samples and mosquito bodies were kept at -80°C until titration and DNA extraction, respectively. In total, 80 saliva from mosquitoes fed on CHIKV infectious blood meal were collected; half were from mosquito incubated at 20°C and the other half came from mosquitoes incubated at 28°C . In order to avoid biases from the salivation step, mosquitoes fed on non-infectious blood meal were processed equally and were thus forced to salivate as mosquitoes fed on CHIKV infectious blood meal.

Virus titration. Mosquitoes able to transmit the CHIKV were identified by titration of saliva samples. Monolayers of C6/36 cells were inoculated with 35 μL of samples in 96-well plates. After an incubation of 1 h at 28°C , cells were overlaid with 1:1 mix of carboxymethyl cellulose and Leibovitz L-15 medium supplemented with 5% FBS and 1.5X of anti-biotic-anti-fungal solution (Life Technologies, CA, USA). Following an incubation period of 3 days at 28°C , cells were fixed with 3.7% formaldehyde, washed 3 times in PBS 1X and stained using a hyper-immune ascetic fluid specific to CHIKV as the primary antibody and an Alexa Fluor 488 goat

anti-mouse IgG as the secondary antibody (Life Technologies, CA, USA). The number of focus-forming units was determined under a fluorescent microscope.

Mosquito samples and DNA extraction. Mosquito bodies were surface sterilized by successive washings in baths of water (1 min), ethanol 70% (2x 5 min), bleach 10% (1 min) and water (1 min). Mosquitoes were then dissected and DNA extraction was performed on pools of six mosquito carcasses (whole bodies without midguts). Samples were homogenized with silica glass beads for 20 sec in 180 μ L of lysis buffer T1 and 25 μ L of proteinase K using a homogenizer (Precellys 24®). Total DNA was extracted from homogenates following instructions of the DNA extraction kit manual (Nucleospin® Tissue, Macherey-Nagel). DNA was eluted in 40 μ L elution buffer and kept at -20°C until analysis. DNA concentration was evaluated on Qubit 4 Fluorometer (ThermoFisher scientific, USA). For each temperature regimens (20°C and 28°C), experimental conditions were comprised of (i) unexposed mosquitoes, and CHIKV-exposed mosquitoes, with either (ii) CHIKV-positive saliva or (iii) CHIKV-negative saliva, giving a total of six samples to analyze. Two negative extraction controls were used to exclude environmental contaminating bacterial DNA (kitome).

Long Read 16S nanopore sequencing. Multiplexed nanopore ligation sequencing libraries were made (two by sample) by using the SQK-16S024 barcode kits, following the 16S Barcoding kit 1-24 protocol (Oxford Nanopore Technologies, Oxford, UK). MinION flow cells (Oxford Nanopore Technologies) were then loaded with 75 μ L of ligation library. The MinION instrument was run for approximately 8 h, until no further sequencing reads could be collected. Then, Fast5 files were preprocessed by base-calling using the High-Accuracy setting on the MinKNOW GUI (v 4.2.8) (Oxford Nanopore Technologies) and output sequence reads were saved as fastq files.

Demultiplexing (barcode assignment) and trimming were then performed with Guppy (v 4.5.2). Reads were filtered to remove sequences shorter than 1250 bp, longer than 1950 bp and those with an average quality score less than 7, using Nanofilt (v 2.8.0) (De Coster, D'Hert, Schultz, Cruets, & Van Broeckhoven, 2018). Filtered reads were, then, corrected with Canu (v 2.1) with a minimum overlap length of 100, as previously described (Lima et al., 2020).

For taxonomic identification, we followed the MiSeq SOP of mothur (v 1.44.3) (Schloss et al., 2009), except for the “make contigs” step, which was skipped. Corrected reads were aligned on Silva.nr v 132, and those classified as Chloroplast, Mitochondria, unknown, Archaea or Eukaryota were removed.

The reads were clustered with the Opticlust algorithm, with a cutoff of 0.05 (Westcott & Schloss, 2017). Finally, the consensus taxonomy for each OTU was computed.

Principal coordinates analysis (PCoA) of data was performed using a matrix of theta Yue & Clayton similarities, based on species proportions in samples. Plots were created using R (v 4.0.3) (R Core Team, 2018) and R packages ggplot2 (v 3.3.3) (Wickham, 2016).

Statistical Analysis. Rates and proportions were compared using Fisher's exact test and viral loads using Kruskal-Wallis non-parametric tests. Tests were conducted using the STATA software (StataCorp LP, Texas, USA). p-values<0.05 were considered statistically significant.

Results

Effect of temperature on CHIKV transmission efficiency.

To determine how temperature influences CHIKV transmission across temperatures, we evaluated mosquitoes transmission efficiencies at 20°C and 28°C by detecting viral particles in saliva of CHIKV-exposed mosquitoes. At 8 dpi, transmission efficiency of mosquitoes held at 20°C (15%) was lower than that of those held at 28°C (22.5%), although no significant statistical difference was found between the two incubation temperatures (Figure 1). Quantification of viral particles in CHIKV-positive saliva revealed that mosquitoes held at 28°C were in average able to deliver 28 viral particles (min - max: 2 - 161), while mosquitoes at 20°C were able to excrete a mean of 7 viral particles (min - max: 2 - 24) (Figure 1). The numbers of excreted particles at 28°C and 20°C were not significantly different (Kruskal-Wallis: p>0.05).

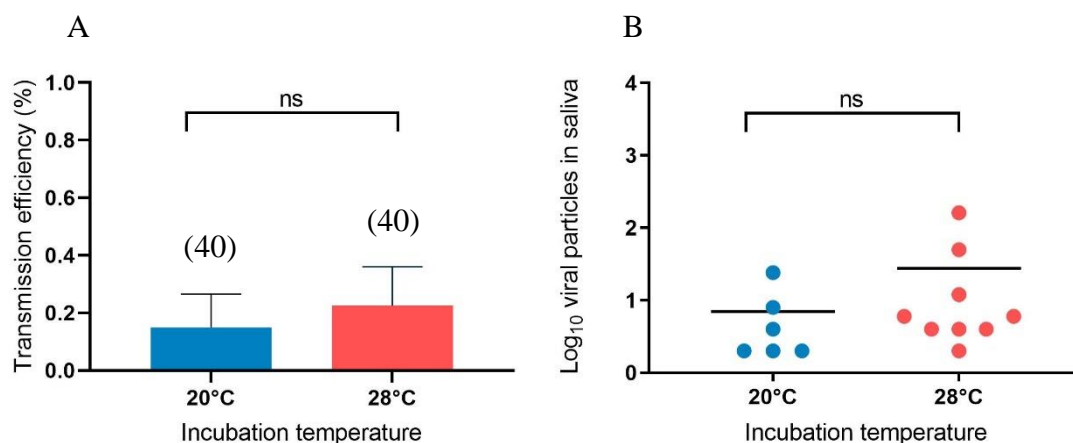


Figure 1. Transmission efficiency of CHIKV (A) and number of viral particles in saliva (B) in *Ae. albopictus* maintained at 20°C and 28°C. In brackets, the number of females analyzed.

CHIKV infection differently altered *Ae. albopictus* microbiota according to temperature.

We performed 16S rRNA gene sequencing on pools of unexposed and CHIKV-exposed (CHIKV saliva-negative or saliva-positive) mosquitoes held at 20°C and 28°C after blood meal. A total of 77 788 sequences of length ranging from 1 244 to 1 474 bp, with a median of 1 395 bp, were clustered. The clustering resulted in 17 732 OTUs, with 17 703 of the OTUs being singletons. OTUs generated in this study belonged almost only to *Proteobacteria* phylum (0.99); other phyla corresponded to *Firmicutes* and *Actinobacteria* (the latter found only in extraction control samples).

At 20°C, microbial communities of unexposed mosquitoes were mainly composed of *Wolbachia* genus bacteria (94% of relative abundance in both libraries). *Asaia* and *Swaminathania* were the two other most abundant genera with a relative abundance of 1% each. The bacterial composition of CHIKV-exposed mosquitoes held at 20°C remained unchanged from that of uninfected mosquitoes. However, the relative abundance of taxa was altered by infection. The relative richness of *Wolbachia* genus was slightly reduced when mosquitoes were exposed to CHIKV while that of *Asaia* and *Swaminathania* were increased. The most significant changes concerned *Asaia* genus and were observed in the pool of mosquitoes that transmitted the virus (10% and 8% for each library) (Figure 2).

At 28°C, the composition and the structural organization of bacterial communities were completely modified by CHIKV infection. Unexposed mosquitoes held at 28°C had a very similar bacterial profile to that of mosquitoes kept at 20°C, with *Wolbachia* (80% and 86%), *Asaia* (12% and 8%) and *Swaminathania* (4% and 3%) being the most represented genera. In contrast, in CHIKV-exposed mosquito pools held at 28°C, the relative abundances of these three taxa were greatly reduced due to the marked presence of *Serratia* and other members of the *Enterobacteriaceae* family. Most notable changes were observed in mosquitoes that transmitted the virus, with relative abundance of *Serratia* reaching 55% and 52% (Figure 2).

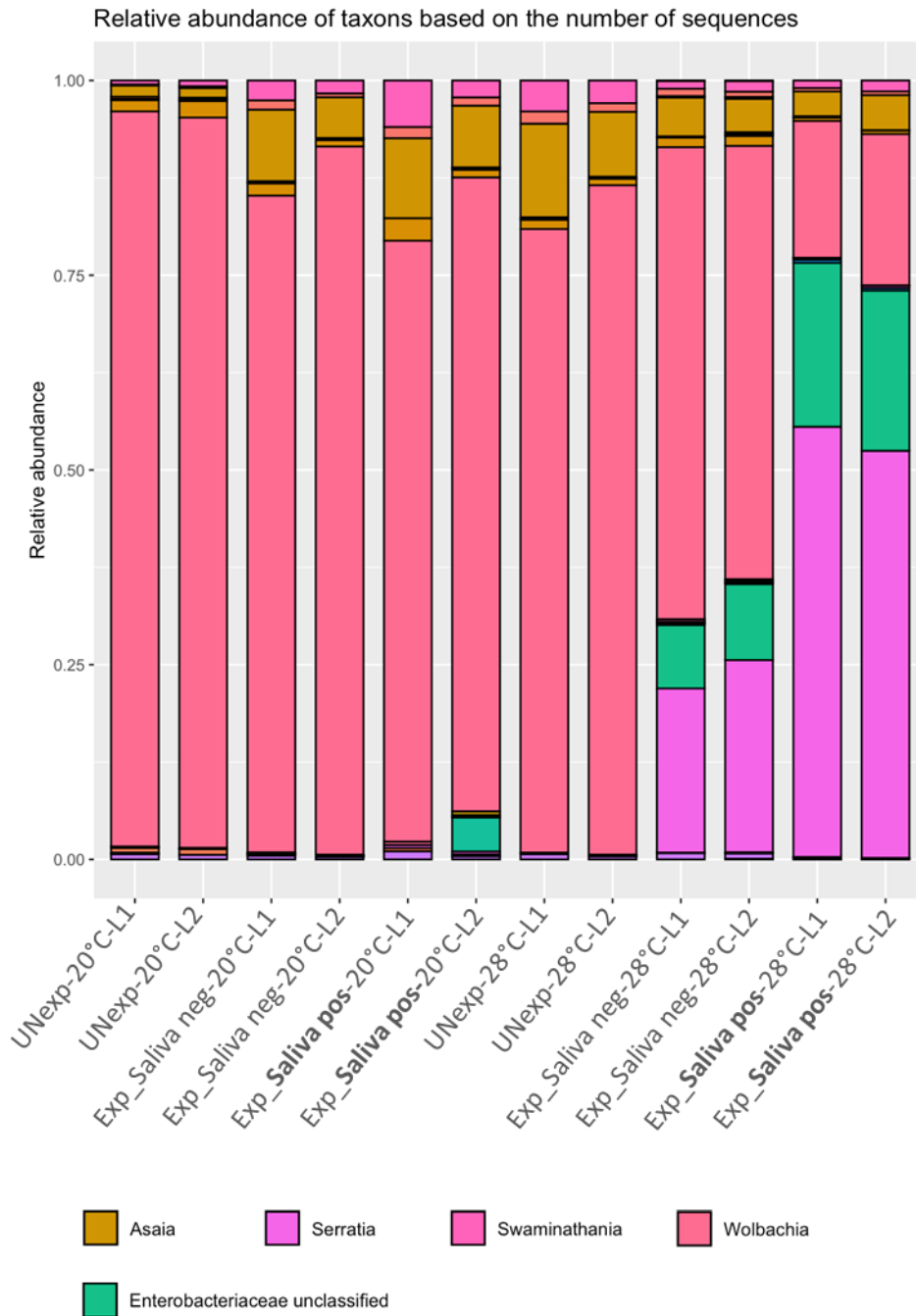


Figure 2. Relative abundance of bacterial genera in unexposed or CHIKV-exposed *Ae. albopictus* carcasses. Each stacked bar illustrates the taxonomic distribution of bacterial genera from pools of six *Ae. albopictus* carcasses. Two libraries were made and sequenced for each sample (L1 and L2 for libraries 1 and 2). Only genera with more than 1% presence in the sample are represented in this plot. Samples were taken at 8 days post blood meal and were comprised of unexposed (UNexp) and CHIKV-exposed mosquitoes (Exp). CHIKV-exposed samples were further split into Exp_Saliva neg (mosquitoes that were exposed to CHIKV but were not able to transmit the virus 8 days post infectious blood meal) and Exp_Saliva pos (mosquitoes that were able to transmit the virus at 8 days after exposure). Each experimental condition was achieved at 20°C and 28°C (incubation temperature after blood-feeding).

The correspondence analysis (PCoA) based on theta Yue & Clayton distances was used to measure dissimilarity between community structures (Figure 3). 75.5% of the variations were explained by the first axis of the PCoA (PC1), and only 8.9% by the second axis (PC2). Samples were distributed into three groups, each representing a different bacterial community structure. Unexposed mosquitoes held at 28°C gathered with mosquitoes held at 20°C along the first axis, while CHIKV-exposed mosquitoes held at 28°C were distantly related (Figure 3). The two libraries built for each sample were closely related to each other (Figure 3).

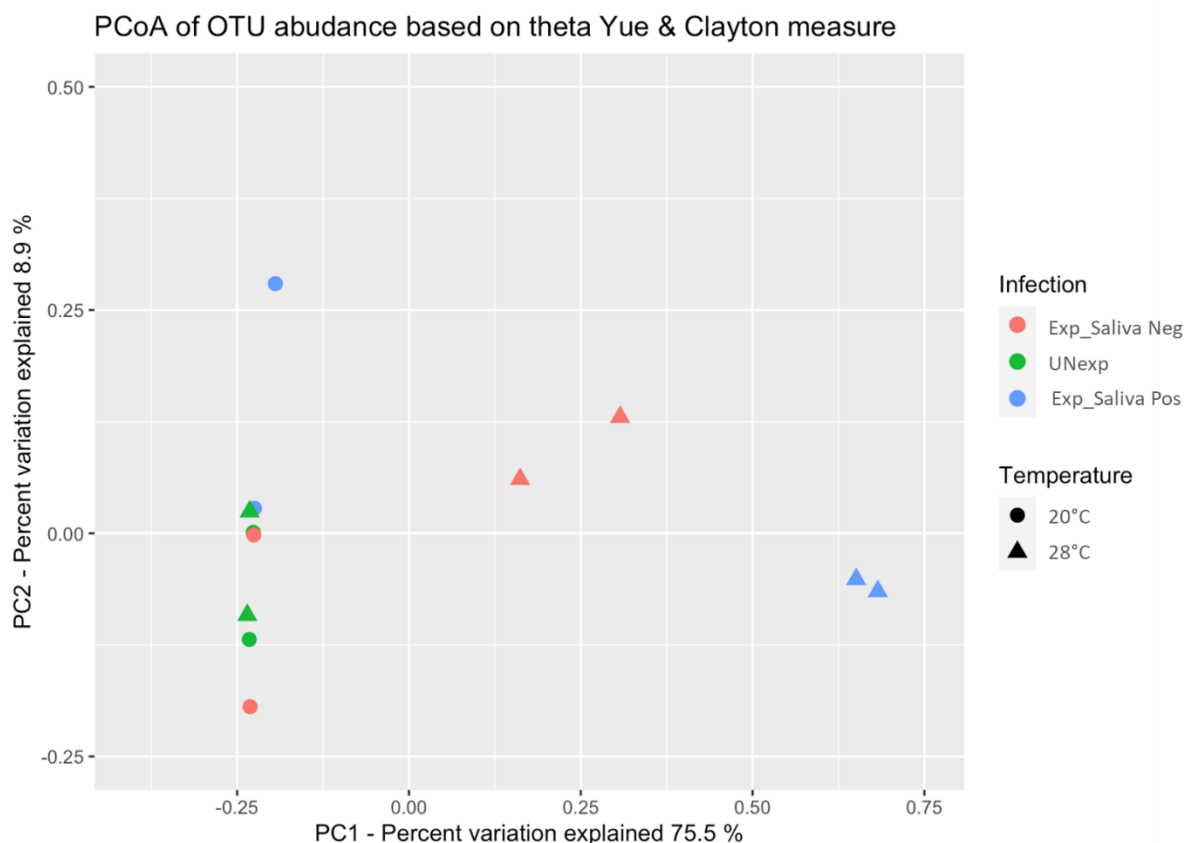


Figure 3. Principal Coordinates Analysis (PCoA) of OTUs abundance to measure dissimilarity between bacterial community structures in *Ae. albopictus*.

Spearman's rank correlation coefficient indicated that OTUs responsible for shifting the samples along the first axis corresponded to two OTUs of *Wolbachia* genus (negative correlation; shift on the left, p-values <0.001) and one OTU of *Serratia* genus (positive correlation; shift on the right, p-value <0.001) (Table S1). The correlation test thus confirmed that samples mainly distinguished to each other according to the *Serratia/Wolbachia* abundance ratio. CHIKV-exposed samples at 28°C were placed on the right with higher proportions of

Serratia while unexposed samples at 28°C and samples at 20°C were on the left with higher proportions of *Wolbachia*.

In this study, we also detected bacterial DNA in negative extraction controls (kitomes). We identified mainly *Acinetobacter* spp. (84% and 78% in libraries of control 1; 73% and 61% in libraries of control 2) (Figure S1). This ‘kitome’ affected interpretation of bacteria at lowest abundance (< 1%).

Discussion

It is becoming increasingly obvious that organisms do not function as isolated entities. The holobiont concept has highlighted the complex and dynamic interactions involved between hosts and their associated microbiota. This study aimed at examining the composition of bacterial communities within *Ae. albopictus* carcasses and exploring how CHIKV infection and temperature could alter bacterial structural organization.

In absence of infection, mosquitoes held at 20°C and 28°C had very similar bacterial composition with *Wolbachia*, *Asaia* and *Swaminathania* being the dominant genera. However, it was noted that taxa relative abundances were somewhat different between 20°C and 28°C. At 28°C, the relative abundance of *Wolbachia* was reduced by about 10% for the benefice of *Asaia*, demonstrating that temperature alone was able to modify proportions of bacteria within the microbial community.

CHIKV infection had a completely different effect on bacterial structural organization at 20°C and 28°C. At 20°C, modifications induced by infection corresponded to minor changes in relative abundances of bacteria already present in unexposed mosquitoes. In contrast, at 28°C bacterial microbiota composition and distribution was greatly altered by infection; we observed a substantial decrease of *Wolbachia* relative abundance concomitantly to an increase of *Serratia* abundance. It had already been demonstrated that at 28°C the abundance of bacteria from the *Enterobacteriaceae* family, to which *Serratia* belongs, increased with CHIKV infection, whereas the abundance of *Wolbachia* genus bacteria decreased (Zouache et al., 2012). However, our data indicate that these changes induced by CHIKV infection can be altered at a lower incubation temperature.

A study in *Ae. aegypti* showed that the gut commensal bacterium *Serratia marcescens* facilitated dengue virus (DENV) infection through the secretion of *SmEnhancin*, a protein that digests membrane-bound mucins on the mosquito gut epithelia (Wu et al., 2019). Furthermore,

they demonstrated that *Serratia*-positive *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes were caught in DENV-endemic regions and had enhanced vector competence compared to *Serratia*-negative mosquitoes that were mainly obtained from non-DENV-endemic regions (Wu et al., 2019). These data support the idea that mosquito microbiota may play an important role in defining differences in mosquito vector competence and suggest that *Serratia* bacteria are potential candidates for novel bacteria-mediated disease control. Nevertheless, as temperature on the field may alter microbiota composition during infection, the relevance and robustness of such methods should be evaluated at different temperatures.

In our study, despite an increased presence of *Serratia* bacteria in infected mosquitoes held at 28°C, the higher transmission efficiency of mosquitoes at 28°C was not significantly different from that of mosquitoes at 20°C. However, beyond the direct or indirect effects on vector competence, the bacterial microbiota can also affect other mosquito phenotypes that can influence vectorial capacity at the population level (Hegde et al., 2015). These phenotypes include physiology, behavior, survival, reproduction and adaptation capacity. For instance, endosymbiotic bacteria of the oriental fruit fly, *Bactrocera dorsalis* were, were found to promote survival under varied thermal stresses (Ayyasamy, Kempraj, & Pagadala Damodaram, 2021).

Overall, our results indicate that there is an interplay between resident bacterial communities, CHIKV and temperature within the mosquito vector *Ae. albopictus*. In order to have a greater insight into complex relationships between invading pathogens, vectors and their associated microbiota, interactions with insect-specific virus and fungal communities needs also to be addressed.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Philippe Bousses, Davy Jiolle and Christophe Paupy (IRD, Montpellier) for their help in collecting mosquitoes and Julie Reveillaud (INRAE) for invaluable discussions on mosquito bacterial microbiota.

FUNDING

This study was supported by the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant n° ANR-10-LABX-62-IBEID), the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under ZIKAlliance grant agreement No 734548 and the European Union's Horizon 2020 research and innovation programme under grant agreement No 731060 (Infravec2, Research Infrastructures for the control of vector-borne diseases; <http://infravec2.eu/>). RB was supported by Infravec2. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

References

- Ayyasamy, A., Kempraj, V., & Pagadala Damodaram, K. J. (2021). Endosymbiotic Bacteria Aid to Overcome Temperature Induced Stress in the Oriental Fruit Fly, *Bactrocera dorsalis*. *Microb Ecol*. doi:10.1007/s00248-021-01682-2
- De Coster, W., D'Hert, S., Schultz, D. T., Cruts, M., & Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics*, *34*(15), 2666-2669. doi:10.1093/bioinformatics/bty149
- Delisle, E., Rousseau, C., Broche, B., Leparç-Goffart, I., L'Ambert, G., Cochet, A., . . . Golliot, F. (2015). Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill*, *20*(17). doi:10.2807/1560-7917.es2015.20.17.21108
- Dennison, N. J., Jupatanakul, N., & Dimopoulos, G. (2014). The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci*, *3*, 6-13. doi:10.1016/j.cois.2014.07.004
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects - diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*, *37*(5), 699-735. doi:10.1111/1574-6976.12025
- Guegan, M., Zouache, K., Demichel, C., Minard, G., Tran Van, V., Potier, P., . . . Valiente Moro, C. (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*, *6*(1), 49. doi:10.1186/s40168-018-0435-2
- Hegde, S., Rasgon, J. L., & Hughes, G. L. (2015). The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Curr Opin Virol*, *15*, 97-102. doi:10.1016/j.coviro.2015.08.011
- Hery, L., Guidez, A., Durand, A. A., Delannay, C., Normandeau-Guimond, J., Reynaud, Y., . . . Vega-Rua, A. (2021). Natural Variation in Physicochemical Profiles and Bacterial Communities Associated with *Aedes aegypti* Breeding Sites and Larvae on Guadeloupe and French Guiana. *Microb Ecol*, *81*(1), 93-109. doi:10.1007/s00248-020-01544-3
- Heu, K., & Gendrin, M. (2018). [Mosquito microbiota and its influence on disease vectorial transmission]. *Biol Aujourd'hui*, *212*(3-4), 119-136. doi:10.1051/jbio/2019003
- Juma, E. O., Allan, B. F., Kim, C. H., Stone, C., Dunlap, C., & Muturi, E. J. (2021). The larval environment strongly influences the bacterial communities of *Aedes triseriatus* and *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). *Sci Rep*, *11*(1), 7910. doi:10.1038/s41598-021-87017-0
- Kikuchi, Y., Tada, A., Musolin, D. L., Hari, N., Hosokawa, T., Fujisaki, K., & Fukatsu, T. (2016). Collapse of Insect Gut Symbiosis under Simulated Climate Change. *mBio*, *7*(5). doi:10.1128/mBio.01578-16
- Lima, L., Marchet, C., Caboche, S., Da Silva, C., Istace, B., Aury, J. M., . . . Chikhi, R. (2020). Comparative assessment of long-read error correction software applied to Nanopore RNA-sequencing data. *Brief Bioinform*, *21*(4), 1164-1181. doi:10.1093/bib/bbz058
- Minard, G., Mavingui, P., & Moro, C. V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors*, *6*, 146. doi:10.1186/1756-3305-6-146
- Moghadam, N. N., Thorshauge, P. M., Kristensen, T. N., de Jonge, N., Bahrndorff, S., Kjeldal, H., & Nielsen, J. L. (2018). Strong responses of *Drosophila melanogaster* microbiota to developmental temperature. *Fly (Austin)*, *12*(1), 1-12. doi:10.1080/19336934.2017.1394558
- O'Neill, S. L. (2018). The Use of *Wolbachia* by the World Mosquito Program to Interrupt Transmission of *Aedes aegypti* Transmitted Viruses. *Adv Exp Med Biol*, *1062*, 355-360. doi:10.1007/978-981-10-8727-1_24

- Onyango, G. M., Bialosuknia, M. S., Payne, F. A., Mathias, N., Ciota, T. A., & Kramer, D. L. (2020). Increase in temperature enriches heat tolerant taxa in *Aedes aegypti* midguts. *Sci Rep*, *10*(1), 19135. doi:10.1038/s41598-020-76188-x
- Parola, P., de Lamballerie, X., Jourdan, J., Rovery, C., Vaillant, V., Minodier, P., . . . Charrel, R. N. (2006). Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg Infect Dis*, *12*(10), 1493-1499. doi:10.3201/eid1210.060610
- R Core Team (2018). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. Available online at <https://www.R-project.org/>.
- Ricci, I., Damiani, C., Capone, A., DeFreece, C., Rossi, P., & Favia, G. (2012). Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. *Curr Opin Microbiol*, *15*(3), 278-284. doi:10.1016/j.mib.2012.03.004
- Saab, S. A., Dohna, H. Z., Nilsson, L. K. J., Onorati, P., Nakhleh, J., Terenius, O., & Osta, M. A. (2020). The environment and species affect gut bacteria composition in laboratory co-cultured *Anopheles gambiae* and *Aedes albopictus* mosquitoes. *Sci Rep*, *10*(1), 3352. doi:10.1038/s41598-020-60075-6
- Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., . . . Weber, C. F. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, *75*(23), 7537-7541. doi:10.1128/AEM.01541-09
- Tilston, N., Skelly, C., & Weinstein, P. (2009). Pan-European Chikungunya surveillance: designing risk stratified surveillance zones. *Int J Health Geogr*, *8*, 61. doi:10.1186/1476-072X-8-61
- Vega-Rua, A., Zouache, K., Caro, V., Diancourt, L., Delaunay, P., Grandadam, M., & Failloux, A. B. (2013). High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One*, *8*(3), e59716. doi:10.1371/journal.pone.0059716
- Westcott, S. L., & Schloss, P. D. (2017). OptiClust, an Improved Method for Assigning Amplicon-Based Sequence Data to Operational Taxonomic Units. *mSphere*, *2*(2). doi:10.1128/mSphereDirect.00073-17
- Wickham, H. (2016). ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. New York. Retrieved from <https://ggplot2.tidyverse.org>
- Wu, P., Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Shi, M., Xiao, C., . . . Cheng, G. (2019). A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness to Arboviruses. *Cell Host Microbe*, *25*(1), 101-112 e105. doi:10.1016/j.chom.2018.11.004
- Zouache, K., Michelland, R. J., Failloux, A. B., Grundmann, G. L., & Mavingui, P. (2012). Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Mol Ecol*, *21*(9), 2297-2309. doi:10.1111/j.1365-294X.2012.05526.x

Supplementary Data

Table S1. Spearman's rank correlation coefficient (axis 1)

OTU	Correlation coefficient axis1	p-value associated	Identified genus
Otu00001	-0.896674	0.000078	<i>Wolbachia</i>
Otu00002	-0.921192	0.000021	<i>Wolbachia</i>
Otu00003	0.962587	0.000001	<i>Serratia</i>

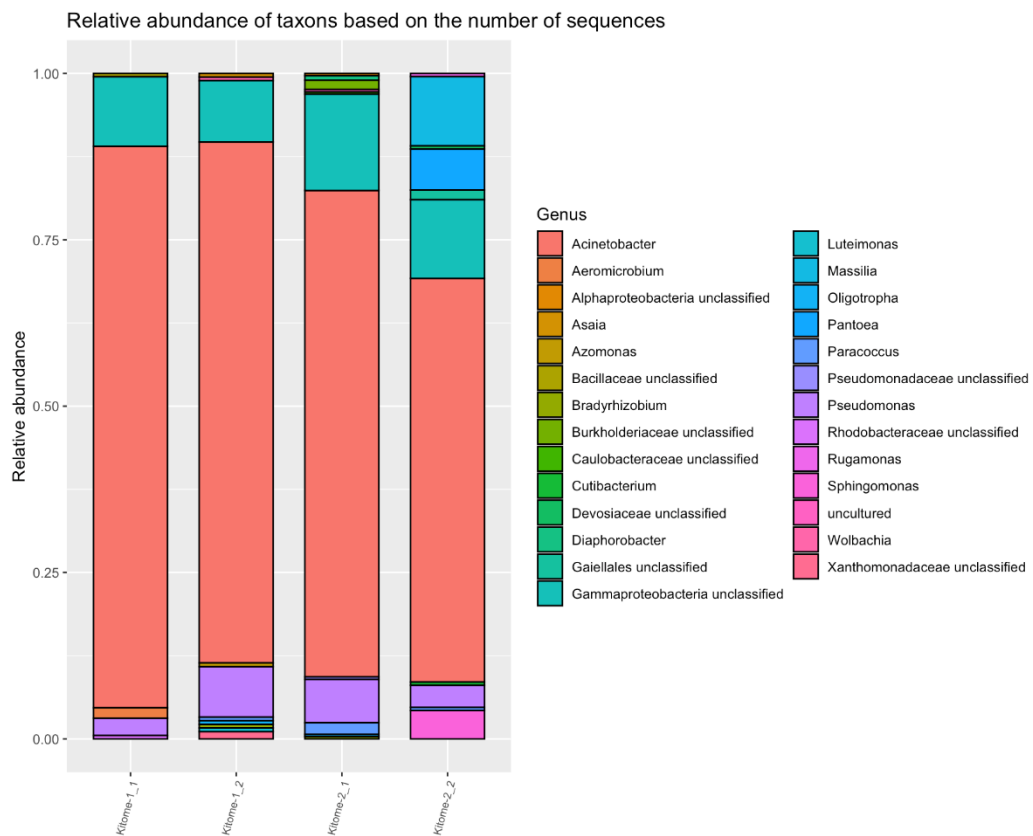


Figure S1. Relative abundance of bacterial genera in negative extraction controls.

Discussion Générale

Au cours des dernières décennies, nous avons été témoins d'une recrudescence des épidémies d'arboviroses. Des arbovirus tels que le ZIKV, le DENV ou encore le CHIKV n'ont cessé d'étendre leur répartition géographique au travers d'épidémies de plus en plus importantes et fréquentes (Mayer et al., 2017). La perturbation des écosystèmes et l'intensification des échanges internationaux à l'origine de l'expansion des espèces vectrices *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* ont largement contribué à la dissémination mondiale de ces virus. L'exemple du CHIKV illustre parfaitement l'émergence d'un arbovirus. À peine connu il y a une vingtaine d'années, le CHIKV est aujourd'hui l'un des arbovirus le mieux décrit. Longtemps resté cantonné à quelques pays d'Afrique et d'Asie du Sud-Est, il a en à peine dix ans, émergé sur les cinq continents.

En Europe, l'arrivée en 1990 du moustique *Ae. albopictus* faisait déjà craindre la circulation des virus pour lesquels il est un vecteur compétent. Néanmoins, la détection des premiers cas de transmission locale du CHIKV en 2007 a été perçue comme une onde de choc et a suscité de nombreuses interrogations quant à l'influence du climat tempéré sur la transmission du virus. De façon générale, l'émergence des arboviroses est liée à la convergence d'un ensemble complexe de facteurs intrinsèques et extrinsèques affectant le vecteur, l'agent pathogène et l'hôte vertébré. Le moustique étant un organisme ectotherme, dont la température interne varie avec celle de l'environnement, il est très sensible aux variations de température du milieu ambiant. De nombreux paramètres, importants pour la transmission, tel que la reproduction, le développement, la survie, le taux de piqûres et la période d'incubation extrinsèque, dépendent de la température (Caldwell et al., 2021; Mordecai et al., 2017; Tesla, Demakovsky, Mordecai, et al., 2018). Il est communément admis que l'augmentation de la température conduit à la diminution de la période d'incubation extrinsèque et à l'augmentation de la compétence vectorielle. Toutefois, il semblerait que l'effet de la température sur la compétence vectorielle soit bien plus complexe. Des expériences menées au laboratoire ont mis en évidence l'existence d'interactions tripartites entre le génotype du moustique, celui du virus et la température (interactions G x G x Environnement) (Zouache et al., 2014). Cependant, la compréhension des bases moléculaires de l'influence de la température sur les différents cycles de transmission des arbovirus reste encore parcellaire (Adelman et al., 2013).

Ce projet vise à améliorer nos connaissances concernant l'influence de la température sur les interactions virus-moustique au niveau moléculaire. Pour cela, nous avons utilisé comme modèle expérimental le CHIKV et le moustique *Ae. albopictus*, vecteur du virus en Europe.

Nos résultats démontrent que la température affecte d'une part l'évolution du CHIKV et d'autre part, l'expression génétique et la composition microbienne du moustique, notamment en réponse à l'infection. Ces données apportent des informations importantes sur la manière dont les systèmes vectoriels peuvent être affectés par la température. Plus généralement, elles améliorent notre compréhension du processus d'émergence des arbovirus en identifiant les facteurs moléculaires de la transmission. Ces informations sont cruciales afin d'anticiper l'efficacité et la pertinence de nouvelles méthodes de lutte antivectorielle (en particulier celle manipulant les mécanismes physiologiques et immunologiques des moustiques pour limiter l'infection virale) dans divers contextes environnementaux.

Le CHIKV, comme la plupart des virus à ARN, présente un taux élevé de mutation du fait de l'absence d'activité correctrice de la polymérase virale (ARN polymérase ARN-dépendante) et de la rapidité de la réplication. Ces caractéristiques confèrent au CHIKV une distribution sous la forme de quasi-espèces, lui offrant une facilité à s'adapter aux environnements changeants par sélection de variants viraux préexistants dans la population virale. Un tel phénomène d'adaptation virale a été observé lors de l'épidémie de chikungunya sur l'île de La Réunion en 2005. Au cours de cette épidémie, la présence exclusive d'*Ae. albopictus* sur l'île a favorisé la sélection d'une substitution d'acides aminés dans la glycoprotéine E1 de l'enveloppe virale (E1-A226V) conduisant à une meilleure transmission du virus par *Ae. albopictus* (Tsetsarkin et al., 2007; Vazeille et al., 2007). D'origine africaine, le CHIKV était auparavant principalement transmis par le moustique *Ae. aegypti*. Son émergence dans les îles de l'Océan Indien lui a imposé comme vecteur *Ae. albopictus*, longtemps considéré comme vecteur secondaire du CHIKV. Ce changement de vecteur a donc été à l'origine de la sélection du variant E1-226V qui est aujourd'hui largement présent dans les régions où *Ae. albopictus* prédomine. Cet exemple illustre bien que la combinaison virus-vecteur suit un processus dynamique en réponse aux changements biotiques de l'environnement. Une question majeure est de savoir si les facteurs abiotiques de l'environnement peuvent également mener à la sélection de variants mieux adaptés à la transmission. Par exemple, la réplication des arbovirus à basse température pourrait-elle favoriser l'émergence de variants mieux adaptés à la transmission à basse température ?

En utilisant un système expérimental de sélection virale, reposant sur des passages viraux successifs sur cellules de moustiques maintenues à 20°C ou à 28°C, nous avons démontré que le CHIKV empruntait des trajectoires évolutives distinctes en fonction du virus, du type cellulaire et de la température. Des mutations spécifiques de la température ont été identifiées à 28°C sur cellules U4.4 d'*Ae. albopictus*, et à 20°C et 28°C sur cellules Aag2 d'*Ae. aegypti*. Les performances répliquatives des variants sélectionnés sur cellules U4.4 ont été évaluées en réalisant des infections expérimentales sur moustiques. Il s'avère que les virus obtenus au terme des 30 passages n'étaient pas mieux transmis par *Ae. albopictus* à 20°C ou à 28°C en comparaison aux clones viraux initiaux. Les virus semblent s'être adaptés aux conditions de répliquaison *in vitro* et ont perdu leurs capacités répliquatives chez le moustique. Il conviendrait d'évaluer les performances répliquatives des variants sélectionnés (P30/U4.4 et P30/Aag2) en réalisant des cinétiques de répliquaison des virus sur cellules, à 20°C et à 28°C. De plus, la construction de clones infectieux intégrant les mutations fixées, suite à la sélection par la température, permettrait d'évaluer plus finement le rôle de ces mutations dans l'adaptation à la température. Les performances répliquatives de ces nouveaux clones infectieux pourraient être testées sur cellules, mais également chez le moustique, en comparant respectivement, la répliquaison et la transmission des clones infectieux avec ou sans les mutations, à 20°C et à 28°C. Cette approche a été utilisée pour démontrer que la mutation E1-A226V du CHIKV était directement responsable de la meilleure transmission du CHIKV par le moustique *Ae. albopictus* (Tsetsarkin et al., 2007).

Concernant, nos expériences d'évolution du CHIKV *in vivo*, les premiers résultats indiquent qu'au bout de cinq passages chez le moustique *Ae. albopictus*, les virus ne subissent pas de changements génétiques significatifs, ce qui signifie que la sélection expérimentale sur moustiques pourrait limiter la diversification virale et l'adaptation à la température. Néanmoins, cela pourrait également être lié au temps nécessaire pour la sélection de variants. En effet, nous nous sommes limités à cinq passages de moustiques (1 passage par mois), mais nous pourrions tout à fait poursuivre ces passages et analyser l'évolution du virus sur une période plus longue.

Par ailleurs, notre approche de sélection expérimentale ne reflète pas le cycle naturel du CHIKV et exclut complètement la phase de répliquaison chez l'hôte vertébré. Il a été suggéré que l'alternance d'hôtes (invertébré et vertébré) imposerait un compromis adaptatif où les variants porteurs de mutations bénéfiques pour un hôte et délétères pour l'autre hôte, sont éliminés. Les arbovirus seraient alors contraints à un champ d'exploration génétique limité afin d'assurer une répliquaison optimale au sein de deux systèmes métaboliquement et physiologiquement

différents (Weaver, 2006). Le maintien exclusif sur cellules de moustiques ou sur le moustique lui-même, permet au virus d'explorer de plus larges régions de son génome et de sélectionner des variants viraux plus adaptés aux conditions expérimentales. Cette approche a permis d'identifier à plusieurs reprises des mutations favorisant une meilleure transmission virale par le moustique *Ae. albopictus* : une mutation dans la région 3' non codante du génome du DENV (Bellone et al., 2020) ou encore une mutation dans le gène NS1 du YFV (Amraoui et al., 2018). Dans la continuité de notre projet, il serait important de vérifier si les variants viraux sélectionnés ont gardé leur capacité à infecter des cellules humaines. En effet, notre schéma expérimental se focalisant exclusivement sur l'hôte vecteur, nous prive des effets des variants sélectionnés sur l'hôte vertébré ; il est possible que les variants soient moins performants pour infecter des cellules de vertébrés. Dans le cas où les variants viraux seraient toujours en mesure d'infecter des cellules humaines, il serait particulièrement important d'évaluer la pathogénicité liée à la réplication des variants dans des modèles animaux (Arias-Goeta et al., 2014; Moutailler et al., 2011).

Dans les deux dernières parties du projet, nous avons mis en évidence des changements majeurs dans l'expression génétique et la composition de la flore microbienne du moustique en réponse à la température et à l'infection par le CHIKV. Les profils d'expression génétique liés à l'infection sont complètement différents à 20°C et à 28°C, avec une forte proportion de gènes de l'immunité et du stress surexprimés à 20°C. De même, des différences très marquées sont observées dans la structure et la composition du microbiome bactérien du moustique à 20°C et à 28°C. Les bactéries du genre *Serratia* sont retrouvées en abondance uniquement lors de l'infection à 28°C.

Différentes espèces du genre *Serratia* ont été décrites comme favorisant l'infection par le DENV (P. Wu et al., 2019) et le CHIKV (Apte-Deshpande, Paingankar, Gokhale, & Deobagkar, 2014) chez le moustique *Ae. aegypti*. La combinaison de la présence de bactéries du genre *Serratia* et la faible activation des réponses immunitaires à 28°C devraient pencher en faveur d'une meilleure réplication et transmission à 28°C plutôt qu'à 20°C. Cependant, nos expériences démontrent que la combinaison des effets de la température n'entraîne pas de différences significatives dans les efficacités de transmission du virus à 20°C et à 28°C. On suppose que d'autres facteurs contrebalancent ces effets afin de favoriser la transmission à 20°C. Des études complémentaires seront nécessaires pour savoir à quel stade de l'infection, dans quel(s) organe(s) et par quel(s) mécanisme(s) ces changements transcriptionnels et microbiens sont induits.

Un aspect de la réponse immunitaire qui n'a pas été abordé dans notre étude du transcriptome est la voie des ARN interférents (ARNi). Chez les insectes, l'ARNi est la défense antivirale la plus efficace actuellement décrite. Trois voies de l'ARNi ont été identifiées : la voie des siRNA (small interfering RNA), la voie des piRNA (PIWI-interacting RNA) et la voie des miRNA (micro RNA) (Blair, 2011). La mise en place de la réponse ARNi repose principalement sur la reconnaissance et le clivage de molécules d'ARN double brin en petits segments d'ARN de 20 à 30 nucléotides de long. Certaines protéines impliquées dans ces voies de défense immunitaire ont été identifiées dans notre expérience (Dicer, Aubergine et Argonaute-2), comme étant différenciellement exprimées en fonction de la température et/ou de l'infection par le CHIKV. Une étude portant sur l'expression et la régulation des petits ARNi nous donnera une idée plus précise de l'effet de la température et de l'infection sur la réponse antivirale du moustique.

Enfin, à la question existe-t-il un risque épidémique majeur du CHIKV en France, nous répondrions, qu'à priori non, car bien que les populations locales d'*Ae. albopictus* semblent être très compétentes pour le CHIKV (Vega-Rua et al., 2013), la courte durée des périodes favorables à la transmission du virus réduit fortement les chances de propagation. Néanmoins, rien n'est figé ; les composantes de la triade vectorielle, incluant le virus, le moustique et l'Homme, évoluent dans une constante dynamique au sein d'un environnement lui-même changeant. Le processus d'établissement d'un cycle de transmission pourrait être rapide et brusque comme avec le ZIKV et *Ae. aegypti* ou alors plus graduel, passant par divers mécanismes d'adaptation comme cela a été observé avec le WNV dans plusieurs régions tempérées (D. Fontenille & Powell, 2020).

L'évolution et le potentiel adaptatif du moustique en tant que vecteur pourraient en ce sens faire l'objet d'une étude. Cette étude consisterait à élever des moustiques sur plusieurs générations à différents régimes de température (température basse/élevée, constante/fluctuante). Après plusieurs générations d'évolution expérimentale, nous examinerions les profils transcriptomiques, protéomiques et microbiens des moustiques selon chaque régime de température, comme cela a été en partie fait chez la drosophile (Sorensen et al., 2020). A cela, nous pourrions ajouter des expériences d'infections de moustique afin d'évaluer si un moustique adapté à une certaine température présente de meilleures capacités de transmission lorsqu'il est incubé à cette même température. Par ailleurs, d'autres paramètres tels que la survie, la fécondité, le comportement de piqûre, très importants d'un point de vue épidémiologique, pourraient être évalués à l'issue du processus d'adaptation à la température des moustiques.

Par ailleurs, il est à noter qu'une même espèce de moustique est présente dans son aire de distribution géographique sous la forme d'une mosaïque de populations génétiquement différenciées (Vazeille et al., 2016). Il serait intéressant de reproduire les expériences réalisées dans ce projet en utilisant d'autres populations de moustiques issues de régions tempérées et tropicales.

Pour répondre à la question plus globale de l'impact du changement climatique sur la dynamique et la distribution des maladies à transmission vectorielle, les réponses sont multiples et souvent contradictoires. Nous avons abordé la question sous le prisme de l'adaptation des agents pathogènes et des vecteurs à la température. La température a une influence majeure sur la croissance et le développement des espèces ectothermes. La biologie et physiologie des vecteurs incluant les réponses immunitaires sont influencées par la température. Ainsi, les effets de la température sur le phénotype (dans notre cas, la transmission vectorielle) dépendraient de la génétique du vecteur et de l'agent pathogène ; l'exemple des *Anopheles*, vecteur de *Plasmodium* est emblématique avec l'existence de populations d'une même espèce présentant des inversions chromosomiques en réponse aux contraintes d'habitat et des profils de transmission très contrastée (Coluzzi, Sabatini, Petrarca, & Di Deco, 1979). Les réponses à la température ne sont donc pas linéaires, car nous avons affaire à une mosaïque de populations vectrices qui subissent par leur distribution spatiale et temporelle des pressions sélectives différentes à l'origine à des adaptations locales spécifiques. Les conséquences en termes de transmission vectorielle sont de ce fait complexes et nécessiteraient davantage de données expérimentales à confronter avec des modèles conceptuels pour comprendre comment l'adaptation locale peut moduler les effets du changement climatique sur les maladies à transmission vectorielle (Sternberg & Thomas, 2014).

Références bibliographiques

- Ministère des solidarités et de la santé. (2021a, 15 feb. 2021). Retrieved from <https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/moustiques>
- . (2021b, 18 janv. 2021). Retrieved from <https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/article/cartes-de-presence-du-moustique-tigre-aedes-albopictus-en-france-metropolitaine>
- Abdelnabi, R., Neyts, J., & Delang, L. (2015). Towards antivirals against chikungunya virus. *Antiviral Res*, *121*, 59-68. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.017
- Adelman, Z. N., Anderson, M. A., Wiley, M. R., Murreddu, M. G., Samuel, G. H., Morazzani, E. M., & Myles, K. M. (2013). Cooler temperatures destabilize RNA interference and increase susceptibility of disease vector mosquitoes to viral infection. *PLoS Negl Trop Dis*, *7*(5), e2239. doi:10.1371/journal.pntd.0002239
- Adhami, J., & Reiter, P. (1998). Introduction and establishment of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc*, *14*(3), 340-343.
- Adouchief, S., Smura, T., Sane, J., Vapalahti, O., & Kurkela, S. (2016). Sindbis virus as a human pathogen-epidemiology, clinical picture and pathogenesis. *Rev Med Virol*, *26*(4), 221-241. doi:10.1002/rmv.1876
- Agarwal, A., Parida, M., & Dash, P. K. (2017). Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Rev Med Virol*. doi:10.1002/rmv.1941
- Ahmad Zaki, Z., Che Dom, N., & Ahmed Alhothily, I. (2020). Efficacy of *Bacillus thuringiensis* Treatment on *Aedes* Population Using Different Applications at High-Rise Buildings. *Trop Med Infect Dis*, *5*(2). doi:10.3390/tropicalmed5020067
- Ahola, T., & Kaariainen, L. (1995). Reaction in alphavirus mRNA capping: formation of a covalent complex of nonstructural protein nsP1 with 7-methyl-GMP. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *92*(2), 507-511. doi:10.1073/pnas.92.2.507
- Akahata, W., Yang, Z. Y., Andersen, H., Sun, S., Holdaway, H. A., Kong, W. P., . . . Nabel, G. J. (2010). A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection. *Nat Med*, *16*(3), 334-338. doi:10.1038/nm.2105
- Althouse, B. M., Guerbois, M., Cummings, D. A. T., Diop, O. M., Faye, O., Faye, A., . . . Hanley, K. A. (2018). Role of monkeys in the sylvatic cycle of chikungunya virus in Senegal. *Nat Commun*, *9*(1), 1046. doi:10.1038/s41467-018-03332-7
- Althouse, B. M., & Hanley, K. A. (2015). The tortoise or the hare? Impacts of within-host dynamics on transmission success of arthropod-borne viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, *370*(1675). doi:10.1098/rstb.2014.0299
- Altizer, S., Dobson, A., Hosseini, P., Hudson, P., Pascual, M., & Rohani, P. (2006). Seasonality and the dynamics of infectious diseases. *Ecol Lett*, *9*(4), 467-484. doi:10.1111/j.1461-0248.2005.00879.x
- Amraoui, F., Pain, A., Piorkowski, G., Vazeille, M., Couto-Lima, D., de Lamballerie, X., . . . Failloux, A. B. (2018). Experimental Adaptation of the Yellow Fever Virus to the Mosquito *Aedes albopictus* and Potential risk of urban epidemics in Brazil, South America. *Sci Rep*, *8*(1), 14337. doi:10.1038/s41598-018-32198-4

- Amraoui, F., Vazeille, M., & Failloux, A. B. (2016). French *Aedes albopictus* are able to transmit yellow fever virus. *Euro Surveill*, *21*(39). doi:10.2807/1560-7917.ES.2016.21.39.30361
- Anders, K. L., Indriani, C., Ahmad, R. A., Tantowijoyo, W., Arguni, E., Andari, B., . . . Utarini, A. (2018). The AWED trial (Applying Wolbachia to Eliminate Dengue) to assess the efficacy of Wolbachia-infected mosquito deployments to reduce dengue incidence in Yogyakarta, Indonesia: study protocol for a cluster randomised controlled trial. *Trials*, *19*(1), 302. doi:10.1186/s13063-018-2670-z
- Anez, G., Chancey, C., Grinev, A., & Rios, M. (2012). Dengue virus and other arboviruses: a global view of risks. *ISBT Science Series*, *7*(1), 274-282.
- Angelini, R., Finarelli, A. C., Angelini, P., Po, C., Petropulacos, K., Macini, P., . . . Cassone, A. (2007). An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill*, *12*(9), E070906 070901. doi:10.2807/esw.12.36.03260-en
- Anyamba, A., Chretien, J. P., Britch, S. C., Soebiyanto, R. P., Small, J. L., Jepsen, R., . . . Linthicum, K. J. (2019). Global Disease Outbreaks Associated with the 2015-2016 El Nino Event. *Sci Rep*, *9*(1), 1930. doi:10.1038/s41598-018-38034-z
- Anyamba, A., Chretien, J. P., Small, J., Tucker, C. J., Formenty, P. B., Richardson, J. H., . . . Linthicum, K. J. (2009). Prediction of a Rift Valley fever outbreak. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *106*(3), 955-959. doi:10.1073/pnas.0806490106
- Apte-Deshpande, A. D., Paingankar, M. S., Gokhale, M. D., & Deobagkar, D. N. (2014). *Serratia odorifera* mediated enhancement in susceptibility of *Aedes aegypti* for chikungunya virus. *Indian J Med Res*, *139*(5), 762-768.
- Aranda, C., Eritja, R., & Roiz, D. (2006). First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med Vet Entomol*, *20*(1), 150-152. doi:10.1111/j.1365-2915.2006.00605.x
- Arankalle, V. A., Shrivastava, S., Cherian, S., Gunjekar, R. S., Walimbe, A. M., Jadhav, S. M., . . . Mishra, A. C. (2007). Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *J Gen Virol*, *88*(Pt 7), 1967-1976. doi:10.1099/vir.0.82714-0
- Arias-Goeta, C., Moutailler, S., Mousson, L., Zouache, K., Thiberge, J. M., Caro, V., . . . Failloux, A. B. (2014). Chikungunya virus adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein. *Infect Genet Evol*, *24*, 116-126. doi:10.1016/j.meegid.2014.03.015
- Armbruster, P. A. (2016). Photoperiodic Diapause and the Establishment of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in North America. *J Med Entomol*, *53*(5), 1013-1023. doi:10.1093/jme/tjw037
- Armistead, J. S., Arias, J. R., Nishimura, N., & Lounibos, L. P. (2008). Interspecific larval competition between *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae) in northern Virginia. *J Med Entomol*, *45*(4), 629-637. doi:10.1603/0022-2585(2008)45[629:ilcbaa]2.0.co;2
- Barbieri, R., & Drancourt, M. (2018). Two thousand years of epidemics in Marseille and the Mediterranean Basin. *New Microbes New Infect*, *26*, S4-S9. doi:10.1016/j.nmni.2018.08.009
- Barletta, A. B., Nascimento-Silva, M. C., Talyuli, O. A., Oliveira, J. H., Pereira, L. O., Oliveira, P. L., & Sorgine, M. H. (2017). Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors*, *10*(1), 103. doi:10.1186/s13071-017-2040-9
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, *116*(2), 281-297. doi:10.1016/s0092-8674(04)00045-5

- Barzon, L. (2018). Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe. *J Clin Virol*, *107*, 38-47. doi:10.1016/j.jcv.2018.08.007
- Bellini, R., Medici, A., Puggioli, A., Balestrino, F., & Carrieri, M. (2013). Pilot field trials with *Aedes albopictus* irradiated sterile males in Italian urban areas. *J Med Entomol*, *50*(2), 317-325. doi:10.1603/me12048
- Bellone, R., Lequime, S., Jupille, H., Goertz, G. P., Aubry, F., Mousson, L., . . . Failloux, A. B. (2020). Experimental adaptation of dengue virus 1 to *Aedes albopictus* mosquitoes by in vivo selection. *Sci Rep*, *10*(1), 18404. doi:10.1038/s41598-020-75042-4
- 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*(1), 76-85. doi:10.1089/vbz.2006.0562
- Bernard, E., Solignat, M., Gay, B., Chazal, N., Higgs, S., Devaux, C., & Briant, L. (2010). Endocytosis of chikungunya virus into mammalian cells: role of clathrin and early endosomal compartments. *PLoS One*, *5*(7), e11479. doi:10.1371/journal.pone.0011479
- 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*(4), e1000833. doi:10.1371/journal.ppat.1000833
- Blagrove, M. S., Arias-Goeta, C., Di Genua, C., Failloux, A. B., & Sinkins, S. P. (2013). A *Wolbachia* wMel transinfection in *Aedes albopictus* is not detrimental to host fitness and inhibits Chikungunya virus. *PLoS Negl Trop Dis*, *7*(3), e2152. doi:10.1371/journal.pntd.0002152
- Blagrove, M. S., Arias-Goeta, C., Failloux, A. B., & Sinkins, S. P. (2012). *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *109*(1), 255-260. doi:10.1073/pnas.1112021108
- Blagrove, M. S. C., Caminade, C., Diggle, P. J., Patterson, E. I., Sherlock, K., Chapman, G. E., . . . Baylis, M. (2020). Potential for Zika virus transmission by mosquitoes in temperate climates. *Proc Biol Sci*, *287*(1930), 20200119. doi:10.1098/rspb.2020.0119
- Blair, C. D. (2011). Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol*, *6*(3), 265-277. doi:10.2217/fmb.11.11
- Blair, C. D., & Olson, K. E. (2015). The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses*, *7*(2), 820-843. doi:10.3390/v7020820
- Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., & James, A. A. (2013). The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol*, *29*(9), 460-468. doi:10.1016/j.pt.2013.07.003
- Bosio, C. F., Fulton, R. E., Salasek, M. L., Beaty, B. J., & Black, W. C. t. (2000). Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, *156*(2), 687-698.
- Brackney, D. E., Scott, J. C., Sagawa, F., Woodward, J. E., Miller, N. A., Schilkey, F. D., . . . Ebel, G. D. (2010). C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Negl Trop Dis*, *4*(10), e856. doi:10.1371/journal.pntd.0000856
- Braks, M., Honório, N., Lounibos, L., Lourenço-de-Oliveira, R., & Juliano, S. (2004). Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*, *97*(1), 130-139.
- Bres, P., Camicas, J. L., Cornet, M., Robin, Y., & Taufflieb, R. (1969). [Epidemiology of arbovirus diseases in Senegal]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, *62*(2), 253-259.
- Brustolin, M., Talavera, S., Nunez, A., Santamaria, C., Rivas, R., Pujol, N., . . . Busquets, N. (2017). Rift Valley fever virus and European mosquitoes: vector competence of *Culex*

- pipiens and *Stegomyia albopicta* (= *Aedes albopictus*). *Med Vet Entomol*, 31(4), 365-372. doi:10.1111/mve.12254
- Burt, F. J., Chen, W., Miner, J. J., Lenschow, D. J., Merits, A., Schnettler, E., . . . Mahalingam, S. (2017). Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. *Lancet Infect Dis*, 17(4), e107-e117. doi:10.1016/S1473-3099(16)30385-1
- Caldwell, J. M., LaBeaud, A. D., Lambin, E. F., Stewart-Ibarra, A. M., Ndenga, B. A., Mutuku, F. M., . . . Mordecai, E. A. (2021). Climate predicts geographic and temporal variation in mosquito-borne disease dynamics on two continents. *Nat Commun*, 12(1), 1233. doi:10.1038/s41467-021-21496-7
- Calisher, C. H., Childs, J. E., Field, H. E., Holmes, K. V., & Schountz, T. (2006). Bats: important reservoir hosts of emerging viruses. *Clin Microbiol Rev*, 19(3), 531-545. doi:10.1128/CMR.00017-06
- Calistri, P., Giovannini, A., Hubalek, Z., Ionescu, A., Monaco, F., Savini, G., & Lelli, R. (2010). Epidemiology of west nile in europe and in the mediterranean basin. *Open Virol J*, 4, 29-37. doi:10.2174/1874357901004020029
- Caminade, C., Medlock, J. M., Ducheyne, E., McIntyre, K. M., Leach, S., Baylis, M., & Morse, A. P. (2012). Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *J R Soc Interface*, 9(75), 2708-2717. doi:10.1098/rsif.2012.0138
- Caminade, C., Turner, J., Metelmann, S., Hesson, J. C., Blagrove, M. S., Solomon, T., . . . Baylis, M. (2017). Global risk model for vector-borne transmission of Zika virus reveals the role of El Nino 2015. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(1), 119-124. doi:10.1073/pnas.1614303114
- Cancrini, G., Frangipane di Regalbono, A., Ricci, I., Tessarin, C., Gabrielli, S., & Pietrobelli, M. (2003). *Aedes albopictus* is a natural vector of *Dirofilaria immitis* in Italy. *Vet Parasitol*, 118(3-4), 195-202. doi:10.1016/j.vetpar.2003.10.011
- Cardona-Correa, S. E., Castano-Jaramillo, L. M., & Quevedo-Velez, A. (2017). [Vertical transmission of chikungunya virus infection. Case Report]. *Rev Chil Pediatr*, 88(2), 285-288. doi:10.4067/S0370-41062017000200015
- Carey, D. E. (1971). Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci*, 26(3), 243-262. doi:10.1093/jhmas/xxvi.3.243
- Carnevale, P., & Robert, V. (2017). *Les anophèles: biologie, transmission du Plasmodium et lutte antivectorielle*: IRD éditions.
- Carvajal-Lago, L., Ruiz-Lopez, M. J., Figuerola, J., & Martinez-de la Puente, J. (2021). Implications of diet on mosquito life history traits and pathogen transmission. *Environ Res*, 195, 110893. doi:10.1016/j.envres.2021.110893
- Casal, P. E., Chouhy, D., Bolatti, E. M., Perez, G. R., Stella, E. J., & Giri, A. A. (2015). Evidence for homologous recombination in Chikungunya Virus. *Mol Phylogenet Evol*, 85, 68-75. doi:10.1016/j.ympev.2015.01.016
- Cassadou, S., Boucau, S., Petit-Sinturel, M., Huc, P., Leparç-Goffart, I., & Ledrans, M. (2014). Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. *Euro Surveill*, 19(13). doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.13.20752
- Chan, M., & Johansson, M. A. (2012). The incubation periods of Dengue viruses. *PLoS One*, 7(11), e50972. doi:10.1371/journal.pone.0050972
- Cheng, R. H., Kuhn, R. J., Olson, N. H., Rossmann, M. G., Choi, H. K., Smith, T. J., & Baker, T. S. (1995). Nucleocapsid and glycoprotein organization in an enveloped virus. *Cell*, 80(4), 621-630. doi:10.1016/0092-8674(95)90516-2
- Chiong, M. A. (1989). Dr. Carlos Finlay and yellow fever. *CMAJ*, 141(11), 1126.

- Chouin-Carneiro, T., & dos Santos, F. B. (2017). Transmission of major arboviruses in Brazil: the role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* vectors. *Biological Control of Pest and Vector Insects*, 2.
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., . . . Failloux, A. B. (2016). Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(3), e0004543. doi:10.1371/journal.pntd.0004543
- Churcher, T. S., Sinden, R. E., Edwards, N. J., Poulton, I. D., Rampling, T. W., Brock, P. M., . . . Blagborough, A. M. (2017). Probability of Transmission of Malaria from Mosquito to Human Is Regulated by Mosquito Parasite Density in Naive and Vaccinated Hosts. *PLoS Pathog*, 13(1), e1006108. doi:10.1371/journal.ppat.1006108
- Ciota, A. T., Bialosuknia, S. M., Zink, S. D., Brecher, M., Ehrbar, D. J., Morrissette, M. N., & Kramer, L. D. (2017). Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. *Emerg Infect Dis*, 23(7), 1110-1117. doi:10.3201/eid2307.161633
- Clem, R. J. (2016). Arboviruses and apoptosis: the role of cell death in determining vector competence. *J Gen Virol*, 97(5), 1033-1036. doi:10.1099/jgv.0.000429
- Clements, A. N., & Harbach, R. E. (2017). History of the discovery of the mode of transmission of yellow fever virus. *J Vector Ecol*, 42(2), 208-222. doi:10.1111/jvec.12261
- Coffey, L. L., Forrester, N., Tsetsarkin, K., Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2013). Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol*, 8(2), 155-176. doi:10.2217/fmb.12.139
- Coluzzi, M., Sabatini, A., Petrarca, V., & Di Deco, M. A. (1979). Chromosomal differentiation and adaptation to human environments in the *Anopheles gambiae* complex. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 73(5), 483-497. doi:10.1016/0035-9203(79)90036-1
- Conway, M. J., Watson, A. M., Colpitts, T. M., Dragovic, S. M., Li, Z., Wang, P., . . . Fikrig, E. (2014). Mosquito saliva serine protease enhances dissemination of dengue virus into the mammalian host. *J Virol*, 88(1), 164-175. doi:10.1128/JVI.02235-13
- Cornel, A. J., & Hunt, R. H. (1991). *Aedes albopictus* in Africa? First records of live specimens in imported tires in Cape Town. *J Am Mosq Control Assoc*, 7(1), 107-108.
- Costanzo, K. S., Mormann, K., & Juliano, S. A. (2005). Asymmetrical competition and patterns of abundance of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 42(4), 559-570. doi:10.1093/jmedent/42.4.559
- Costanzo, K. S., Schelble, S., Jerz, K., & Keenan, M. (2015). The effect of photoperiod on life history and blood-feeding activity in *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Vector Ecol*, 40(1), 164-171. doi:10.1111/jvec.12146
- Couderc, T., Khandoudi, N., Grandadam, M., Visse, C., Gangneux, N., Bagot, S., . . . Lecuit, M. (2009). Prophylaxis and therapy for Chikungunya virus infection. *J Infect Dis*, 200(4), 516-523. doi:10.1086/600381
- Cunha, R. V. D., & Trinta, K. S. (2017). Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 112(8), 523-531. doi:10.1590/0074-02760170044
- Dalla Pozza, G. L., Romi, R., & Severini, C. (1994). Source and spread of *Aedes albopictus* in the Veneto region of Italy. *J Am Mosq Control Assoc*, 10(4), 589-592.
- Darriet, F. (2014). Des moustiques et des hommes. *Chronique d'une pullulation annoncée. IRD Éditions. collection Didactiques, Marseille, France.*
- de Andrade, G. C., Ventura, C. V., Mello Filho, P. A., Maia, M., Vianello, S., & Rodrigues, E. B. (2017). Arboviruses and the eye. *Int J Retina Vitreous*, 3, 4. doi:10.1186/s40942-016-0057-4
- de Lamballerie, X., Leroy, E., Charrel, R. N., Tsetsarkin, K., Higgs, S., & Gould, E. A. (2008). Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virol J*, 5, 33. doi:10.1186/1743-422X-5-33

- Delatte, H., Desvars, A., Bouetard, A., Bord, S., Gimonneau, G., Vourc'h, G., & Fontenille, D. (2010). Blood-feeding behavior of *Aedes albopictus*, a vector of Chikungunya on La Reunion. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *10*(3), 249-258. doi:10.1089/vbz.2009.0026
- Delaunay, P., Jeannin, C., Schaffner, F., & Marty, P. (2009). [News on the presence of the tiger mosquito *Aedes albopictus* in metropolitan France]. *Arch Pediatr*, *16 Suppl 2*, S66-71. doi:10.1016/S0929-693X(09)75304-7
- Dennison, N. J., Jupatanakul, N., & Dimopoulos, G. (2014). The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci*, *3*, 6-13. doi:10.1016/j.cois.2014.07.004
- Diallo, M., Thonnon, J., Traore-Lamizana, M., & Fontenille, D. (1999). Vectors of Chikungunya virus in Senegal: current data and transmission cycles. *Am J Trop Med Hyg*, *60*(2), 281-286. doi:10.4269/ajtmh.1999.60.281
- Dieng, H., Boots, M., Tuno, N., Tsuda, Y., & Takagi, M. (2002). A laboratory and field evaluation of *Macrocyclops distinctus*, *Megacyclops viridis* and *Mesocyclops pehpeiensis* as control agents of the dengue vector *Aedes albopictus* in a peridomestic area in Nagasaki, Japan. *Med Vet Entomol*, *16*(3), 285-291. doi:10.1046/j.1365-2915.2002.00377.x
- Diniz, D. F. A., de Albuquerque, C. M. R., Oliva, L. O., de Melo-Santos, M. A. V., & Ayres, C. F. J. (2017). Diapause and quiescence: dormancy mechanisms that contribute to the geographical expansion of mosquitoes and their evolutionary success. *Parasit Vectors*, *10*(1), 310. doi:10.1186/s13071-017-2235-0
- Dobson, S. L., Marsland, E. J., & Rattanadechakul, W. (2001). Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility in single- and superinfected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, *38*(3), 382-387. doi:10.1603/0022-2585-38.3.382
- Domingo, E., & Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genet*, *15*(10), e1008271. doi:10.1371/journal.pgen.1008271
- Dubrulle, M., Mousson, L., Moutailler, S., Vazeille, M., & Failloux, A. B. (2009). Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS One*, *4*(6), e5895. doi:10.1371/journal.pone.0005895
- Dupont-Rouzeyrol, M., Caro, V., Guillaumot, L., Vazeille, M., D'Ortenzio, E., Thiberge, J. M., . . . Failloux, A. B. (2012). Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne Zoonotic Dis*, *12*(12), 1036-1041. doi:10.1089/vbz.2011.0937
- Dusfour, I., Vontas, J., David, J. P., Weetman, D., Fonseca, D. M., Corbel, V., . . . Chandre, F. (2019). Management of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses: Advances and challenges. *PLoS Negl Trop Dis*, *13*(10), e0007615. doi:10.1371/journal.pntd.0007615
- Dutra, H. L., Rocha, M. N., Dias, F. B., Mansur, S. B., Caragata, E. P., & Moreira, L. A. (2016). Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe*, *19*(6), 771-774. doi:10.1016/j.chom.2016.04.021
- Duvallet, G., Fontenille, D., & Robert, V. (2017). *Entomologie médicale et vétérinaire*: IRD éditions.
- ECDC. (2009). Development of *Aedes albopictus* Risk Maps. Retrieved from https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/media/en/publications/Publications/0905_TER_Development_of_Aedes_Alboipictus_Risk_Maps.pdf
- ECDC. (2018, 14 dec. 2018). Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2018. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/news-events/epidemiological-update-west-nile-virus-transmission-season-europe-2018>
- ECDC. (2019, 31 oct 2019). Epidemiological update: third case of locally acquired Zika virus disease in Hyères, France. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/news->

- [events/epidemiological-update-third-case-locally-acquired-zika-virus-disease-hyeres-france](#)
- ECDC. (2020a, 12 Jun. 2020). Aedes albopictus - current known distribution: May 2020. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/aedes-albopictus-current-known-distribution-may-2020>
- ECDC. (2020b, 17 Aug. 2020). Autochthonous transmission of chikungunya virus in EU/EEA, 2007–present. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/chikungunya-virus-disease/surveillance-threats-and-outbreaks/autochthonous>
- ECDC. (2020c, 27 oct 2020). Autochthonous transmission of dengue virus in EU/EEA, 2010-present. Retrieved from <https://www.ecdc.europa.eu/en/all-topics-z/dengue/surveillance-and-disease-data/autochthonous-transmission-dengue-virus-eueea>
- Economopoulou, A., Dominguez, M., Helynck, B., Sissoko, D., Wichmann, O., Quenel, P., . . . Quatresous, I. (2009). Atypical Chikungunya virus infections: clinical manifestations, mortality and risk factors for severe disease during the 2005-2006 outbreak on Reunion. *Epidemiol Infect*, 137(4), 534-541. doi:10.1017/S0950268808001167
- Etebari, K., Osei-Amo, S., Blomberg, S. P., & Asgari, S. (2015). Dengue virus infection alters post-transcriptional modification of microRNAs in the mosquito vector Aedes aegypti. *Sci Rep*, 5, 15968. doi:10.1038/srep15968
- Fansiri, T., Fontaine, A., Diancourt, L., Caro, V., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., . . . Lambrechts, L. (2013). Genetic mapping of specific interactions between Aedes aegypti mosquitoes and dengue viruses. *PLoS Genet*, 9(8), e1003621. doi:10.1371/journal.pgen.1003621
- Fischer, D., Thomas, S. M., Neteler, M., Tjaden, N. B., & Beierkuhnlein, C. (2014). Climatic suitability of Aedes albopictus in Europe referring to climate change projections: comparison of mechanistic and correlative niche modelling approaches. *Euro Surveill*, 19(6). doi:10.2807/1560-7917.es2014.19.6.20696
- Fischer, D., Thomas, S. M., Suk, J. E., Sudre, B., Hess, A., Tjaden, N. B., . . . Semenza, J. C. (2013). Climate change effects on Chikungunya transmission in Europe: geospatial analysis of vector's climatic suitability and virus' temperature requirements. *Int J Health Geogr*, 12, 51. doi:10.1186/1476-072X-12-51
- Flacio, E., Lüthy, P., Patocchi, N., Guidotti, F., Tonolla, M., & Peduzzi, R. (2004). Primo ritrovamento di Aedes albopictus in Svizzera. *Boll Della Soc Ticinese Sci Nat*, 92, 141-142.
- Fong, S. W., Kini, R. M., & Ng, L. F. P. (2018). Mosquito Saliva Reshapes Alphavirus Infection and Immunopathogenesis. *J Virol*, 92(12). doi:10.1128/JVI.01004-17
- Fongsaran, C., Jirakanwisal, K., Kuadkitkan, A., Wikan, N., Wintachai, P., Thepparit, C., . . . Smith, D. R. (2014). Involvement of ATP synthase beta subunit in chikungunya virus entry into insect cells. *Arch Virol*, 159(12), 3353-3364. doi:10.1007/s00705-014-2210-4
- Fontenille, D., Lagneau, C., Lecollinet, S., & Robin, R. L. (2009). *La lutte antivectorielle en France*: IRD Orstom.
- Fontenille, D., & Powell, J. R. (2020). From Anonymous to Public Enemy: How Does a Mosquito Become a Feared Arbovirus Vector? *Pathogens*, 9(4). doi:10.3390/pathogens9040265
- Forattini, O. P. (1986). Identificação de Aedes (stegomyia) Albopictus (skuse) no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 20, 244-245.
- Forrester, N. L., Coffey, L. L., & Weaver, S. C. (2014). Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*, 6(10), 3991-4004. doi:10.3390/v6103991

- Fouque, F., & Reeder, J. C. (2019). Impact of past and on-going changes on climate and weather on vector-borne diseases transmission: a look at the evidence. *Infect Dis Poverty*, 8(1), 51. doi:10.1186/s40249-019-0565-1
- Fragkoudis, R., Chi, Y., Siu, R. W., Barry, G., Attarzadeh-Yazdi, G., Merits, A., . . . Kohl, A. (2008). Semliki Forest virus strongly reduces mosquito host defence signaling. *Insect Mol Biol*, 17(6), 647-656. doi:10.1111/j.1365-2583.2008.00834.x
- Frierson, J. G. (2010). The yellow fever vaccine: a history. *Yale J Biol Med*, 83(2), 77-85.
- Gallegos, K. M., Drusano, G. L., DZ, D. A., & Brown, A. N. (2016). Chikungunya Virus: In Vitro Response to Combination Therapy With Ribavirin and Interferon Alfa 2a. *J Infect Dis*, 214(8), 1192-1197. doi:10.1093/infdis/jiw358
- Gatt, P., Deeming, J. C., & Schaffner, F. (2009). First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) in Malta. *European Mosquito Bulletin*(27), 56-64.
- Gerardin, P., Barau, G., Michault, A., Bintner, M., Randrianaivo, H., Choker, G., . . . Robillard, P. Y. (2008). Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Reunion. *PLoS Med*, 5(3), e60. doi:10.1371/journal.pmed.0050060
- Githeko, A. K., Lindsay, S. W., Confalonieri, U. E., & Patz, J. A. (2000). Climate change and vector-borne diseases: a regional analysis. *Bull World Health Organ*, 78(9), 1136-1147.
- Gjenero-Margan, I., Aleraj, B., Krajcar, D., Lesnikar, V., Klobucar, A., Pem-Novosel, I., . . . Mlinaric-Galinovic, G. (2011). Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill*, 16(9).
- Goenaga, S., Goenaga, J., Boaglio, E. R., Enria, D. A., & Levis, S. D. C. (2020). Superinfection exclusion studies using West Nile virus and *Culex flavivirus* strains from Argentina. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 115, e200012. doi:10.1590/0074-02760200012
- Goic, B., Stapleford, K. A., Frangeul, L., Doucet, A. J., Gausson, V., Blanc, H., . . . Saleh, M. C. (2016). Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nat Commun*, 7, 12410. doi:10.1038/ncomms12410
- Gould, E., Pettersson, J., Higgs, S., Charrel, R., & de Lamballerie, X. (2017). Emerging arboviruses: Why today? *One Health*, 4, 1-13. doi:10.1016/j.onehlt.2017.06.001
- Gould, E. A., & Higgs, S. (2009). Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 103(2), 109-121. doi:10.1016/j.trstmh.2008.07.025
- Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S., Thiberge, J. M., Souares, Y., Failloux, A. B., . . . Despres, P. (2011). Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis*, 17(5), 910-913. doi:10.3201/eid1705.101873
- Grard, G., Caron, M., Mombo, I. M., Nkoghe, D., Mboui Ondo, S., Jiolle, D., . . . Leroy, E. M. (2014). Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl Trop Dis*, 8(2), e2681. doi:10.1371/journal.pntd.0002681
- Grassly, N. C., & Fraser, C. (2006). Seasonal infectious disease epidemiology. *Proc Biol Sci*, 273(1600), 2541-2550. doi:10.1098/rspb.2006.3604
- Gratz, N. G. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol*, 18(3), 215-227. doi:10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x
- Gubler, D. J. (1996). The global resurgence of arboviral diseases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 90(5), 449-451. doi:10.1016/s0035-9203(96)90286-2
- Gubler, D. J. (2001). Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci*, 951, 13-24. doi:10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x
- Gubler, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*, 33(4), 330-342. doi:10.1016/s0188-4409(02)00378-8

- Guegan, M., Zouache, K., Demichel, C., Minard, G., Tran Van, V., Potier, P., . . . Valiente Moro, C. (2018). The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*, 6(1), 49. doi:10.1186/s40168-018-0435-2
- Guerrero, D., Cantaert, T., & Misse, D. (2020). Aedes Mosquito Salivary Components and Their Effect on the Immune Response to Arboviruses. *Front Cell Infect Microbiol*, 10, 407. doi:10.3389/fcimb.2020.00407
- Hales, S., de Wet, N., Maindonald, J., & Woodward, A. (2002). Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. *Lancet*, 360(9336), 830-834. doi:10.1016/S0140-6736(02)09964-6
- Hardy, J. L., Houk, E. J., Kramer, L. D., & Reeves, W. C. (1983). Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol*, 28, 229-262. doi:10.1146/annurev.en.28.010183.001305
- Hawley, W. A. (1988). The biology of Aedes albopictus. *J Am Mosq Control Assoc Suppl*, 1, 1-39.
- Hershey, A. L., GA.; Chaloner, DT.; Northington, RM. (2010). Aquatic Insect Ecology. In A. P. C. James H. Thorp (Ed.), *Ecology and Classification of North American Freshwater Invertebrates (Third Edition)*, Academic Press, (pp. 659-694).
- Hery, L., Guidez, A., Durand, A. A., Delannay, C., Normandeau-Guimond, J., Reynaud, Y., . . . Vega-Rua, A. (2021). Natural Variation in Physicochemical Profiles and Bacterial Communities Associated with Aedes aegypti Breeding Sites and Larvae on Guadeloupe and French Guiana. *Microb Ecol*, 81(1), 93-109. doi:10.1007/s00248-020-01544-3
- Heu, K., & Gendrin, M. (2018). [Mosquito microbiota and its influence on disease vectorial transmission]. *Biol Aujourd'hui*, 212(3-4), 119-136. doi:10.1051/jbio/2019003
- Ho, B. C., Chan, K. L., & Chan, Y. C. (1971). Aedes aegypti (L.) and Aedes albopictus (Skuse) in Singapore City. 3. Population fluctuations. *Bull World Health Organ*, 44(5), 635-641.
- Hoffmann, A. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Callahan, A. G., Phillips, B. L., Billington, K., Axford, J. K., . . . O'Neill, S. L. (2014). Stability of the wMel Wolbachia Infection following invasion into Aedes aegypti populations. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(9), e3115. doi:10.1371/journal.pntd.0003115
- Honorio, N. A., Silva Wda, C., Leite, P. J., Goncalves, J. M., Lounibos, L. P., & Lourenco-de-Oliveira, R. (2003). Dispersal of Aedes aegypti and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae) in an urban endemic dengue area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(2), 191-198. doi:10.1590/s0074-02762003000200005
- Houe, V., Bonizzoni, M., & Failloux, A. B. (2019). Endogenous non-retroviral elements in genomes of Aedes mosquitoes and vector competence. *Emerg Microbes Infect*, 8(1), 542-555. doi:10.1080/22221751.2019.1599302
- Huber, J. H., Childs, M. L., Caldwell, J. M., & Mordecai, E. A. (2018). Seasonal temperature variation influences climate suitability for dengue, chikungunya, and Zika transmission. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(5), e0006451. doi:10.1371/journal.pntd.0006451
- Hufnagel, L., Brockmann, D., & Geisel, T. (2004). Forecast and control of epidemics in a globalized world. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(42), 15124-15129. doi:10.1073/pnas.0308344101
- Igarashi, A. (1978). Isolation of a Singh's Aedes albopictus cell clone sensitive to Dengue and Chikungunya viruses. *J Gen Virol*, 40(3), 531-544. doi:10.1099/0022-1317-40-3-531
- Inoue, S., Morita, K., Matias, R. R., Tuplano, J. V., Resuello, R. R., Candelario, J. R., . . . Natividad, F. F. (2003). Distribution of three arbovirus antibodies among monkeys (Macaca fascicularis) in the Philippines. *J Med Primatol*, 32(2), 89-94. doi:10.1034/j.1600-0684.2003.00015.x

- ISSG. View 100 of the World's Worst Invasive Alien Species. Retrieved from http://www.issg.org/worst100_species.html
- Jeanrenaud, A., Brooke, B. D., & Oliver, S. V. (2020). Second generation effects of larval metal pollutant exposure on reproduction, longevity and insecticide tolerance in the major malaria vector *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors*, *13*(1), 4. doi:10.1186/s13071-020-3886-9
- Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., & Soderhall, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology*, *211*(4), 213-236. doi:10.1016/j.imbio.2005.10.015
- Jobling, B. (1987). *Anatomical drawings of biting flies*: British Museum (Natural History).
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., & Daszak, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature*, *451*(7181), 990-993. doi:10.1038/nature06536
- Jupp, P. G., & McIntosh, B. M. (1990). *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at Mica, northeastern Transvaal, South Africa. *J Am Mosq Control Assoc*, *6*(3), 415-420.
- Kamgang, B., Nchoutpouen, E., Simard, F., & Paupy, C. (2012). Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasit Vectors*, *5*, 57. doi:10.1186/1756-3305-5-57
- Kariuki Njenga, M., Nderitu, L., Ledermann, J. P., Ndirangu, A., Logue, C. H., Kelly, C. H. L., . . . Powers, A. M. (2008). Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *J Gen Virol*, *89*(Pt 11), 2754-2760. doi:10.1099/vir.0.2008/005413-0
- Keene, K. M., Foy, B. D., Sanchez-Vargas, I., Beaty, B. J., Blair, C. D., & Olson, K. E. (2004). RNA interference acts as a natural antiviral response to O'nyong-nyong virus (Alphavirus; Togaviridae) infection of *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(49), 17240-17245. doi:10.1073/pnas.0406983101
- Kelly, S. A., Panhuis, T. M., & Stoehr, A. M. (2012). Phenotypic plasticity: molecular mechanisms and adaptive significance. *Compr Physiol*, *2*(2), 1417-1439. doi:10.1002/cphy.c110008
- Khan, A. H., Morita, K., Parquet, M. D. C., Hasebe, F., Mathenge, E. G. M., & Igarashi, A. (2002). Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *J Gen Virol*, *83*(Pt 12), 3075-3084. doi:10.1099/0022-1317-83-12-3075
- Khan, M., Dhanwani, R., Rao, P. V., & Parida, M. (2012). Subunit vaccine formulations based on recombinant envelope proteins of Chikungunya virus elicit balanced Th1/Th2 response and virus-neutralizing antibodies in mice. *Virus Res*, *167*(2), 236-246. doi:10.1016/j.virusres.2012.05.004
- Khan, M., Santhosh, S. R., Tiwari, M., Lakshmana Rao, P. V., & Parida, M. (2010). Assessment of in vitro prophylactic and therapeutic efficacy of chloroquine against Chikungunya virus in vero cells. *J Med Virol*, *82*(5), 817-824. doi:10.1002/jmv.21663
- Khoo, C. C., Piper, J., Sanchez-Vargas, I., Olson, K. E., & Franz, A. W. (2010). The RNA interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol*, *10*, 130. doi:10.1186/1471-2180-10-130
- Kibuthu, T. W., Njenga, S. M., Mbugua, A. K., & Muturi, E. J. (2016). Agricultural chemicals: life changer for mosquito vectors in agricultural landscapes? *Parasit Vectors*, *9*, 500. doi:10.1186/s13071-016-1788-7
- Kilpatrick, A. M., & Randolph, S. E. (2012). Drivers, dynamics, and control of emerging vector-borne zoonotic diseases. *Lancet*, *380*(9857), 1946-1955. doi:10.1016/S0140-6736(12)61151-9

- Kobayashi, M., Nihei, N., & Kurihara, T. (2002). Analysis of northern distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Japan by geographical information system. *J Med Entomol*, 39(1), 4-11. doi:10.1603/0022-2585-39.1.4
- Kraemer, M. U., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q., Shearer, F. M., Barker, C. M., . . . Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*, 4, e08347. doi:10.7554/eLife.08347
- Kraemer, M. U. G., Reiner, R. C., Jr., Brady, O. J., Messina, J. P., Gilbert, M., Pigott, D. M., . . . Golding, N. (2019). Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol*, 4(5), 854-863. doi:10.1038/s41564-019-0376-y
- Kumar, A., Srivastava, P., Sirisena, P., Dubey, S. K., Kumar, R., Shrinet, J., & Sunil, S. (2018). Mosquito Innate Immunity. *Insects*, 9(3). doi:10.3390/insects9030095
- La Ruche, G., Souares, Y., Armengaud, A., Peloux-Petiot, F., Delaunay, P., Despres, P., . . . Gastellu-Etchegorry, M. (2010). First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill*, 15(39), 19676.
- Labadie, K., Larcher, T., Joubert, C., Mannioui, A., Delache, B., Brochard, P., . . . Roques, P. (2010). Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *J Clin Invest*, 120(3), 894-906. doi:10.1172/JCI40104
- Lacey, L. A. (2007). *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc*, 23(2 Suppl), 133-163. doi:10.2987/8756-971X(2007)23[133:BTSIAB]2.0.CO;2
- Lambrechts, L. (2011). Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol*, 27(3), 111-114. doi:10.1016/j.pt.2010.12.001
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R. G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., Jarman, R. G., & Scott, T. W. (2009). Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol*, 9, 160. doi:10.1186/1471-2148-9-160
- Lambrechts, L., Quillery, E., Noel, V., Richardson, J. H., Jarman, R. G., Scott, T. W., & Chevillon, C. (2013). Specificity of resistance to dengue virus isolates is associated with genotypes of the mosquito antiviral gene Dicer-2. *Proc Biol Sci*, 280(1751), 20122437. doi:10.1098/rspb.2012.2437
- Lambrechts, L., Scott, T. W., & Gubler, D. J. (2010). Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(5), e646. doi:10.1371/journal.pntd.0000646
- Lapied, B., Darriet, F., Delorme, R., Deparis, X., Devillers, J., Jaeger, J.-P., . . . Yébakima, A. (2011). *Recherche d'insecticides potentiellement utilisables en lute anti-vectorielle*. Retrieved from
- Laras, K., Sukri, N. C., Larasati, R. P., Bangs, M. J., Kosim, R., Djauzi, . . . Corwin, A. L. (2005). Tracking the re-emergence of epidemic chikungunya virus in Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 99(2), 128-141. doi:10.1016/j.trstmh.2004.03.013
- Ledermann, J. P., Borland, E. M., & Powers, A. M. (2017). Minimum infectious dose for chikungunya virus in *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes. *Rev Panam Salud Publica*, 41, e65.
- Lee, J. Y., Woo, R. M., Choi, C. J., Shin, T. Y., Gwak, W. S., & Woo, S. D. (2019). *Beauveria bassiana* for the simultaneous control of *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* mosquito adults shows high conidia persistence and productivity. *AMB Express*, 9(1), 206. doi:10.1186/s13568-019-0933-z
- Lee, W. S., Webster, J. A., Madzokere, E. T., Stephenson, E. B., & Herrero, L. J. (2019). Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity

- and persistent viral infection. *Parasit Vectors*, 12(1), 165. doi:10.1186/s13071-019-3433-8
- Leger, P., Lara, E., Jagla, B., Sismeiro, O., Mansuroglu, Z., Coppee, J. Y., . . . Bouloy, M. (2013). Dicer-2- and Piwi-mediated RNA interference in Rift Valley fever virus-infected mosquito cells. *J Virol*, 87(3), 1631-1648. doi:10.1128/JVI.02795-12
- Leisnham, P. T., & Juliano, S. A. (2012). Impacts of climate, land use, and biological invasion on the ecology of immature Aedes mosquitoes: implications for La Crosse emergence. *Ecohealth*, 9(2), 217-228. doi:10.1007/s10393-012-0773-7
- Leparc-Goffart, I., Nougairede, A., Cassadou, S., Prat, C., & de Lamballerie, X. (2014). Chikungunya in the Americas. *Lancet*, 383(9916), 514. doi:10.1016/S0140-6736(14)60185-9
- Lequime, S., & Lambrechts, L. (2014). Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infect Genet Evol*, 28, 681-690. doi:10.1016/j.meegid.2014.07.025
- Leroy, E. M., Nkoghe, D., Ollomo, B., Nze-Nkogue, C., Becquart, P., Grard, G., . . . De-Lamballerie, X. (2009). Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg Infect Dis*, 15(4), 591-593. doi:10.3201/eid1504.080664
- Levitt, N. H., Ramsburg, H. H., Hasty, S. E., Repik, P. M., Cole, F. E., Jr., & Lupton, H. W. (1986). Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine*, 4(3), 157-162. doi:10.1016/0264-410x(86)90003-4
- Lew, R. J., Tsai, W. Y., & Wang, W. K. (2018). Dengue outbreaks in Hawai'i After WWII - A Review of Public Health Response and Scientific Literature. *Hawaii J Med Public Health*, 77(12), 315-318.
- Lim, E. X. Y., Lee, W. S., Madzokere, E. T., & Herrero, L. J. (2018). Mosquitoes as Suitable Vectors for Alphaviruses. *Viruses*, 10(2). doi:10.3390/v10020084
- Lin, C. C., Chou, C. M., Hsu, Y. L., Lien, J. C., Wang, Y. M., Chen, S. T., . . . Huang, C. J. (2004). Characterization of two mosquito STATs, AaSTAT and CtSTAT. Differential regulation of tyrosine phosphorylation and DNA binding activity by lipopolysaccharide treatment and by Japanese encephalitis virus infection. *J Biol Chem*, 279(5), 3308-3317. doi:10.1074/jbc.M309749200
- Lord, C. C. (2004). Seasonal population dynamics and behaviour of insects in models of vector-borne pathogens. *Physiol Entomol*, 29(3), 214-222. doi:10.1111/j.0307-6962.2004.00411.x
- Lounibos, L. P., O'Meara, G. F., Juliano, S. A., Nishimura, N., Escher, R. L., Reiskind, M. H., . . . Greene, K. (2010). Differential Survivorship of Invasive Mosquito Species in South Florida Cemeteries: Do Site-Specific Microclimates Explain Patterns of Coexistence and Exclusion? *Ann Entomol Soc Am*, 103(5), 757-770. doi:10.1603/AN09142
- Lukashev, A. N. (2005). Evidence for recombination in Crimean-Congo hemorrhagic fever virus. *J Gen Virol*, 86(Pt 8), 2333-2338. doi:10.1099/vir.0.80974-0
- Lum, F. M., & Ng, L. F. (2015). Cellular and molecular mechanisms of chikungunya pathogenesis. *Antiviral Res*, 120, 165-174. doi:10.1016/j.antiviral.2015.06.009
- Lum, F. M., Teo, T. H., Lee, W. W., Kam, Y. W., Renia, L., & Ng, L. F. (2013). An essential role of antibodies in the control of Chikungunya virus infection. *J Immunol*, 190(12), 6295-6302. doi:10.4049/jimmunol.1300304
- 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(1), 33-57. doi:10.1016/0035-9203(55)90081-x

- Maha, M. S., Susilarini, N. K., Hariastuti, N. I., & Subangkit. (2015). Chikungunya virus mutation, Indonesia, 2011. *Emerg Infect Dis*, 21(2), 379-381. doi:10.3201/eid2102.141121
- Mallilankaraman, K., Shedlock, D. J., Bao, H., Kawalekar, O. U., Fagone, P., Ramanathan, A. A., . . . Weiner, D. B. (2011). A DNA vaccine against chikungunya virus is protective in mice and induces neutralizing antibodies in mice and nonhuman primates. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(1), e928. doi:10.1371/journal.pntd.0000928
- Marchette, N. J., Rudnick, A., Garcia, R., & MacVean, D. W. (1978). Alphaviruses in Peninsular Malaysia: I. Virus isolations and animal serology. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 9(3), 317-329.
- Matthews, B. J., Younger, M. A., & Vosshall, L. B. (2019). The ion channel ppk301 controls freshwater egg-laying in the mosquito *Aedes aegypti*. *Elife*, 8. doi:10.7554/eLife.43963
- Mayer, S. V., Tesh, R. B., & Vasilakis, N. (2017). The emergence of arthropod-borne viral diseases: A global prospective on dengue, chikungunya and zika fevers. *Acta Trop*, 166, 155-163. doi:10.1016/j.actatropica.2016.11.020
- McFarlane, M., Arias-Goeta, C., Martin, E., O'Hara, Z., Lulla, A., Mousson, L., . . . Failloux, A. B. (2014). Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7), e2994. doi:10.1371/journal.pntd.0002994
- McGraw, E. A., & O'Neill, S. L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol*, 11(3), 181-193. doi:10.1038/nrmicro2968
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W., Sidhu, M., Wang, Y. F., & O'Neill, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323(5910), 141-144. doi:10.1126/science.1165326
- McMichael, A. J., Woodruff, R. E., & Hales, S. (2006). Climate change and human health: present and future risks. *Lancet*, 367(9513), 859-869. doi:10.1016/S0140-6736(06)68079-3
- Medeiros-Sousa, A. R., de Oliveira-Christe, R., Camargo, A. A., Scinachi, C. A., Milani, G. M., Urbinatti, P. R., . . . Marrelli, M. T. (2020). Influence of water's physical and chemical parameters on mosquito (Diptera: Culicidae) assemblages in larval habitats in urban parks of Sao Paulo, Brazil. *Acta Trop*, 205, 105394. doi:10.1016/j.actatropica.2020.105394
- Medlock, J. M., Avenell, D., Barrass, I., & Leach, S. (2006). Analysis of the potential for survival and seasonal activity of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the United Kingdom. *J Vector Ecol*, 31(2), 292-304. doi:10.3376/1081-1710(2006)31[292:aotpfs]2.0.co;2
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., & Van Bortel, W. (2012). A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(6), 435-447. doi:10.1089/vbz.2011.0814
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Versteirt, V., Cull, B., Kampen, H., Fontenille, D., . . . Schaffner, F. (2015). An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bull Entomol Res*, 105(6), 637-663. doi:10.1017/S0007485315000103
- Miesen, P., Girardi, E., & van Rij, R. P. (2015). Distinct sets of PIWI proteins produce arbovirus and transposon-derived piRNAs in *Aedes aegypti* mosquito cells. *Nucleic Acids Res*, 43(13), 6545-6556. doi:10.1093/nar/gkv590
- Minard, G., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Hellard, E., Ravelonandro, P., Mavingui, P., & Valiente Moro, C. (2013). Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol*, 83(1), 63-73. doi:10.1111/j.1574-6941.2012.01455.x

- Mitchell, C. J., Miller, B. R., & Gubler, D. J. (1987). Vector competence of *Aedes albopictus* from Houston, Texas, for dengue serotypes 1 to 4, yellow fever and Ross River viruses. *J Am Mosq Control Assoc*, 3(3), 460-465.
- Moore, C. G., & Mitchell, C. J. (1997). *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg Infect Dis*, 3(3), 329-334. doi:10.3201/eid0303.970309
- Morazzani, E. M., Wiley, M. R., Murreddu, M. G., Adelman, Z. N., & Myles, K. M. (2012). Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. *PLoS Pathog*, 8(1), e1002470. doi:10.1371/journal.ppat.1002470
- Mordecai, E. A., Caldwell, J. M., Grossman, M. K., Lippi, C. A., Johnson, L. R., Neira, M., . . . Villena, O. (2019). Thermal biology of mosquito-borne disease. *Ecol Lett*, 22(10), 1690-1708. doi:10.1111/ele.13335
- Mordecai, E. A., Cohen, J. M., Evans, M. V., Gudapati, P., Johnson, L. R., Lippi, C. A., . . . Weikel, D. P. (2017). Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(4), e0005568. doi:10.1371/journal.pntd.0005568
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., . . . O'Neill, S. L. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268-1278. doi:10.1016/j.cell.2009.11.042
- Morillon, M., Mafart, B., & Matton, T. (2002). Yellow fever in Europe during 19th century. *Ecological Aspects of Past Settlement in Europe*.
- Moro, M. L., Grilli, E., Corvetta, A., Silvi, G., Angelini, R., Mascella, F., . . . Study Group "Infezioni da Chikungunya in, E.-R. (2012). Long-term chikungunya infection clinical manifestations after an outbreak in Italy: a prognostic cohort study. *J Infect*, 65(2), 165-172. doi:10.1016/j.jinf.2012.04.005
- Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., & Failloux, A. B. (2012). The native *Wolbachia* symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis*, 6(12), e1989. doi:10.1371/journal.pntd.0001989
- Moutailler, S., Roche, B., Thiberge, J. M., Caro, V., Rougeon, F., & Failloux, A. B. (2011). Host alternation is necessary to maintain the genome stability of rift valley fever virus. *PLoS Negl Trop Dis*, 5(5), e1156. doi:10.1371/journal.pntd.0001156
- Moy, R. H., Gold, B., Molleston, J. M., Schad, V., Yanger, K., Salzano, M. V., . . . Cherry, S. (2014). Antiviral autophagy restricts Rift Valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity*, 40(1), 51-65. doi:10.1016/j.immuni.2013.10.020
- Muthumani, K., Lankaraman, K. M., Laddy, D. J., Sundaram, S. G., Chung, C. W., Sako, E., . . . Weiner, D. B. (2008). Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine*, 26(40), 5128-5134. doi:10.1016/j.vaccine.2008.03.060
- Nawrocki, S. J., & Hawley, W. A. (1987). Estimation of the northern limits of distribution of *Aedes albopictus* in North America. *J Am Mosq Control Assoc*, 3(2), 314-317.
- Nazni, W. A., Hoffmann, A. A., NoorAfizah, A., Cheong, Y. L., Mancini, M. V., Golding, N., . . . Sinkins, S. P. (2019). Establishment of *Wolbachia* Strain wAlbB in Malaysian Populations of *Aedes aegypti* for Dengue Control. *Curr Biol*, 29(24), 4241-4248 e4245. doi:10.1016/j.cub.2019.11.007
- Nguyet, M. N., Duong, T. H., Trung, V. T., Nguyen, T. H., Tran, C. N., Long, V. T., . . . Simmons, C. P. (2013). Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(22), 9072-9077. doi:10.1073/pnas.1303395110

- Nhan, T. X., & Musso, D. (2015). The burden of chikungunya in the Pacific. *Clin Microbiol Infect*, 21(6), e47-48. doi:10.1016/j.cmi.2015.02.018
- Nignan, C., Niang, A., Maiga, H., Sawadogo, S. P., Poda, B. S., Gnankine, O., . . . Diabate, A. (2020). Comparison of swarming, mating performance and longevity of males *Anopheles coluzzii* between individuals fed with different natural fruit juices in laboratory and semi-field conditions. *Malar J*, 19(1), 173. doi:10.1186/s12936-020-03248-y
- Nikolay, B. (2015). A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 109(10), 609-618. doi:10.1093/trstmh/trv066
- Nomikou, K., Hughes, J., Wash, R., Kellam, P., Breard, E., Zientara, S., . . . Mertens, P. (2015). Widespread Reassortment Shapes the Evolution and Epidemiology of Bluetongue Virus following European Invasion. *PLoS Pathog*, 11(8), e1005056. doi:10.1371/journal.ppat.1005056
- O'Neill, S. L. (2018). The Use of Wolbachia by the World Mosquito Program to Interrupt Transmission of *Aedes aegypti* Transmitted Viruses. *Adv Exp Med Biol*, 1062, 355-360. doi:10.1007/978-981-10-8727-1_24
- OMS. (2020, 15 September 2020). Chikungunya. Retrieved from <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
- Ortega-Morales, A. I., Bond, G., Mendez-Lopez, R., Garza-Hernandez, J. A., Hernandez-Triana, L. M., & Casas-Martinez, M. (2018). First Record of Invasive Mosquito *Aedes albopictus* in Tabasco and Yucatan, Mexico. *J Am Mosq Control Assoc*, 34(2), 120-123. doi:10.2987/18-6736.1
- Pachauri, R. K., Allen, M. R., Barros, V. R., Broome, J., Cramer, W., Christ, R., . . . Dasgupta, P. (2014). *Climate change 2014: synthesis report. Contribution of Working Groups I, II and III to the fifth assessment report of the Intergovernmental Panel on Climate Change*: Ipcc.
- PAHO. Chikungunya: Data, Maps and statistics. Retrieved from https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=rdmore&cid=5927&Itemid=40931&lang=en
- Paradkar, P. N., Trinidad, L., Voysey, R., Duchemin, J. B., & Walker, P. J. (2012). Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(46), 18915-18920. doi:10.1073/pnas.1205231109
- Parola, P., de Lamballerie, X., Jourdan, J., Rovey, C., Vaillant, V., Minodier, P., . . . Charrel, R. N. (2006). Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg Infect Dis*, 12(10), 1493-1499. doi:10.3201/eid1210.060610
- Pastorino, B., Muyembe-Tamfum, J. J., Bessaud, M., Tock, F., Tolou, H., Durand, J. P., & Peyrefitte, C. N. (2004). Epidemic resurgence of Chikungunya virus in democratic Republic of the Congo: identification of a new central African strain. *J Med Virol*, 74(2), 277-282. doi:10.1002/jmv.20168
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., & Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect*, 11(14-15), 1177-1185. doi:10.1016/j.micinf.2009.05.005
- Paupy, C., Ollomo, B., Kamgang, B., Moutailler, S., Rousset, D., Demanou, M., . . . Simard, F. (2010). Comparative role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the emergence of Dengue and Chikungunya in central Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis*, 10(3), 259-266. doi:10.1089/vbz.2009.0005

- Pereira-Dos-Santos, T., Roiz, D., Lourenco-de-Oliveira, R., & Paupy, C. (2020). A Systematic Review: Is *Aedes albopictus* an Efficient Bridge Vector for Zoonotic Arboviruses? *Pathogens*, *9*(4). doi:10.3390/pathogens9040266
- Pereira Dos Santos, T., Roiz, D., Santos de Abreu, F. V., Luz, S. L. B., Santalucia, M., Jiolle, D., . . . Paupy, C. (2018). Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. *Emerg Microbes Infect*, *7*(1), 191. doi:10.1038/s41426-018-0194-y
- Perez-Ramirez, G., Diaz-Badillo, A., Camacho-Nuez, M., Cisneros, A., & Munoz Mde, L. (2009). Multiple recombinants in two dengue virus, serotype-2 isolates from patients from Oaxaca, Mexico. *BMC Microbiol*, *9*, 260. doi:10.1186/1471-2180-9-260
- Pichler, V., Bellini, R., Veronesi, R., Arnoldi, D., Rizzoli, A., Lia, R. P., . . . Caputo, B. (2018). First evidence of resistance to pyrethroid insecticides in Italian *Aedes albopictus* populations 26 years after invasion. *Pest Manag Sci*, *74*(6), 1319-1327. doi:10.1002/ps.4840
- Pigliucci, M. (1996). How organisms respond to environmental changes: from phenotypes to molecules (and vice versa). *Trends Ecol Evol*, *11*(4), 168-173. doi:10.1016/0169-5347(96)10008-2
- Plante, K., Wang, E., Partidos, C. D., Weger, J., Gorchakov, R., Tsetsarkin, K., . . . Weaver, S. C. (2011). Novel chikungunya vaccine candidate with an IRES-based attenuation and host range alteration mechanism. *PLoS Pathog*, *7*(7), e1002142. doi:10.1371/journal.ppat.1002142
- Pluskota, B., Storch, V., Braunbeck, T., Beck, M., & Becker, N. (2008). First record of *Stegomyia albopicta* (Skuse)(Diptera: Culicidae) in Germany. *Eur Mosq Bull*, *26*, 1-5.
- Ponlawat, A., Scott, J. G., & Harrington, L. C. (2005). Insecticide susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* across Thailand. *J Med Entomol*, *42*(5), 821-825. doi:10.1603/0022-2585(2005)042[0821:ISOAAA]2.0.CO;2
- Powers, A. M. (2018). Vaccine and Therapeutic Options To Control Chikungunya Virus. *Clin Microbiol Rev*, *31*(1). doi:10.1128/CMR.00104-16
- Powers, A. M., Brault, A. C., Tesh, R. B., & Weaver, S. C. (2000). Re-emergence of Chikungunya and O'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *J Gen Virol*, *81*(Pt 2), 471-479. doi:10.1099/0022-1317-81-2-471
- Powers, A. M., & Logue, C. H. (2007). Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol*, *88*(Pt 9), 2363-2377. doi:10.1099/vir.0.82858-0
- Prado Acosta, M., Geoghegan, E. M., Lepenies, B., Ruzal, S., Kielian, M., & Martinez, M. G. (2019). Surface (S) Layer Proteins of *Lactobacillus acidophilus* Block Virus Infection via DC-SIGN Interaction. *Front Microbiol*, *10*, 810. doi:10.3389/fmicb.2019.00810
- Quintero-Herrera, L. L., Ramirez-Jaramillo, V., Bernal-Gutierrez, S., Cardenas-Giraldo, E. V., Guerrero-Matituy, E. A., Molina-Delgado, A. H., . . . Rodriguez-Morales, A. J. (2015). Potential impact of climatic variability on the epidemiology of dengue in Risaralda, Colombia, 2010-2011. *J Infect Public Health*, *8*(3), 291-297. doi:10.1016/j.jiph.2014.11.005
- Rahman, M., Yamagishi, J., Rahim, R., Hasan, A., & Sobhan, A. (2019). East/Central/South African Genotype in a Chikungunya Outbreak, Dhaka, Bangladesh, 2017. *Emerg Infect Dis*, *25*(2), 370-372. doi:10.3201/eid2502.180188
- Ramchurn, S. K., Moheput, K., & Goorah, S. S. (2009). An analysis of a short-lived outbreak of dengue fever in Mauritius. *Euro Surveill*, *14*(34). doi:10.2807/ese.14.34.19314-en
- Reinhold, J. M., Lazzari, C. R., & Lahondere, C. (2018). Effects of the Environmental Temperature on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Mosquitoes: A Review. *Insects*, *9*(4). doi:10.3390/insects9040158

- Reiter, P. (1998). *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? *J Am Mosq Control Assoc*, 14(1), 83-94.
- Reiter, P. (2008). Climate change and mosquito-borne disease: knowing the horse before hitching the cart. *Rev Sci Tech*, 27(2), 383-398.
- Reiter, P., & Darsie JR, R. F. (1984). *Aedes albopictus* in Memphis, Tennessee (USA): an achievement of modern transportation? *Mosquito News*, 44(3), 396-399.
- Reiter, P., Fontenille, D., & Paupy, C. (2006). *Aedes albopictus* as an epidemic vector of chikungunya virus: another emerging problem? *Lancet Infect Dis*, 6(8), 463-464. doi:10.1016/S1473-3099(06)70531-X
- Renault, P., Solet, J. L., Sissoko, D., Balleydier, E., Larrieu, S., Filleul, L., . . . Pierre, V. (2007). A major epidemic of chikungunya virus infection on Reunion Island, France, 2005-2006. *Am J Trop Med Hyg*, 77(4), 727-731.
- Rezza, G. (2018). Chikungunya is back in Italy: 2007-2017. *J Travel Med*, 25(1). doi:10.1093/jtm/tay004
- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A. C., Panning, M., . . . group, C. s. (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*, 370(9602), 1840-1846. doi:10.1016/S0140-6736(07)61779-6
- Richards, S. L., Ponnusamy, L., Unnasch, T. R., Hassan, H. K., & Apperson, C. S. (2006). Host-feeding patterns of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in relation to availability of human and domestic animals in suburban landscapes of central North Carolina. *J Med Entomol*, 43(3), 543-551. doi:10.1603/0022-2585(2006)43[543:hpoaad]2.0.co;2
- Robinson, M. C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. Clinical features. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 49(1), 28-32. doi:10.1016/0035-9203(55)90080-8
- Romi, R. (1995). History and updating on the spread of *Aedes albopictus* in Italy. *Parassitologia*, 37(2-3), 99-103.
- Romi, R. (2001). [*Aedes albopictus* in Italy: an underestimated health problem]. *Ann Ist Super Sanita*, 37(2), 241-247.
- Romi, R., Severini, F., & Toma, L. (2006). Cold acclimation and overwintering of female *Aedes albopictus* in Roma. *J Am Mosq Control Assoc*, 22(1), 149-151. doi:10.2987/8756-971X(2006)22[149:CAAOOF]2.0.CO;2
- Rosen, L. (1986). Dengue in Greece in 1927 and 1928 and the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever: new data and a different conclusion. *Am J Trop Med Hyg*, 35(3), 642-653. doi:10.4269/ajtmh.1986.35.642
- Ross, R. W. (1956). The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *J Hyg (Lond)*, 54(2), 177-191. doi:10.1017/s0022172400044442
- Roundy, C. M., Azar, S. R., Rossi, S. L., Huang, J. H., Leal, G., Yun, R., . . . Vasilakis, N. (2017). Variation in *Aedes aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission. *Emerg Infect Dis*, 23(4), 625-632. doi:10.3201/eid2304.161484
- Rubing Chen, S. M., Andres Merits, Bethany Bolling, Farooq Nasar, Lark L. Coffey, Ann Powers and Scott C. Weaver. (2018). ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. *Journal of General Virology*, 99, 761-762.
- Sabatini, A., Raineri, V., Trovato, G., & Coluzzi, M. (1990). [*Aedes albopictus* in Italy and possible diffusion of the species into the Mediterranean area]. *Parassitologia*, 32(3), 301-304.
- Saldana, M. A., Etebari, K., Hart, C. E., Widen, S. G., Wood, T. G., Thangamani, S., . . . Hughes, G. L. (2017). Zika virus alters the microRNA expression profile and elicits an RNAi response in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(7), e0005760. doi:10.1371/journal.pntd.0005760

- Sall, A. A., Zanotto, P. M., Sene, O. K., Zeller, H. G., Digoutte, J. P., Thiongane, Y., & Bouloy, M. (1999). Genetic reassortment of Rift Valley fever virus in nature. *J Virol*, 73(10), 8196-8200. doi:10.1128/JVI.73.10.8196-8200.1999
- Samuel, G. H., Adelman, Z. N., & Myles, K. M. (2016). Temperature-dependent effects on the replication and transmission of arthropod-borne viruses in their insect hosts. *Curr Opin Insect Sci*, 16, 108-113. doi:10.1016/j.cois.2016.06.005
- Sanchez-Vargas, I., Scott, J. C., Poole-Smith, B. K., Franz, A. W., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., . . . Blair, C. D. (2009). Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog*, 5(2), e1000299. doi:10.1371/journal.ppat.1000299
- Sardelis, M. R., Turell, M. J., O'Guinn, M. L., Andre, R. G., & Roberts, D. R. (2002). Vector competence of three North American strains of *Aedes albopictus* for West Nile virus. *J Am Mosq Control Assoc*, 18(4), 284-289.
- Savage, H. M., Ezike, V. I., Nwankwo, A. C., Spiegel, R., & Miller, B. R. (1992). First record of breeding populations of *Aedes albopictus* in continental Africa: implications for arboviral transmission. *J Am Mosq Control Assoc*, 8(1), 101-103.
- Schaffner, F., & Karch, S. (2000). [First report of *Aedes albopictus* (Skuse, 1984) in metropolitan France]. *C R Acad Sci III*, 323(4), 373-375. doi:10.1016/s0764-4469(00)00143-8
- Schaffner, F., & Mathis, A. (2014). Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect Dis*, 14(12), 1271-1280. doi:10.1016/S1473-3099(14)70834-5
- Schaffner, F., Van Bortel, W., & Coosemans, M. (2004). First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in Belgium. *J Am Mosq Control Assoc*, 20(2), 201-203.
- Schilte, C., Staikowsky, F., Couderc, T., Madec, Y., Carpentier, F., Kassab, S., . . . Michault, A. (2013). Chikungunya virus-associated long-term arthralgia: a 36-month prospective longitudinal study. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(3), e2137. doi:10.1371/journal.pntd.0002137
- Schmidt, C. A., Comeau, G., Monaghan, A. J., Williamson, D. J., & Ernst, K. C. (2018). Effects of desiccation stress on adult female longevity in *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae): results of a systematic review and pooled survival analysis. *Parasit Vectors*, 11(1), 267. doi:10.1186/s13071-018-2808-6
- Schnettler, E., Donald, C. L., Human, S., Watson, M., Siu, R. W. C., McFarlane, M., . . . Fragkoudis, R. (2013). Knockdown of piRNA pathway proteins results in enhanced Semliki Forest virus production in mosquito cells. *J Gen Virol*, 94(Pt 7), 1680-1689. doi:10.1099/vir.0.053850-0
- Schnierle, B. S. (2019). Cellular Attachment and Entry Factors for Chikungunya Virus. *Viruses*, 11(11). doi:10.3390/v11111078
- Scholte, E.-J., Jacobs, F., Linton, Y.-M., Dijkstra, E., Fransen, J., & Takken, W. (2007). First record of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in the Netherlands. *Eur Mosq Bull*, 22(5), 9.
- Scholte, E., & Schaffner, F. (2007). Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe In: Takken W, Knols B, editors. Emerging pests and vector-borne diseases in Europe: Wageningen Academic Publishers.
- Schrama, M., Hunting, E. R., Beechler, B. R., Guarido, M. M., Govender, D., Nijland, W., . . . Gorsich, E. E. (2020). Human practices promote presence and abundance of disease-transmitting mosquito species. *Sci Rep*, 10(1), 13543. doi:10.1038/s41598-020-69858-3
- Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., . . . Brisse, S. (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*, 3(7), e263. doi:10.1371/journal.pmed.0030263

- Schurch, N. J., Schofield, P., Gierlinski, M., Cole, C., Sherstnev, A., Singh, V., . . . Barton, G. J. (2016). How many biological replicates are needed in an RNA-seq experiment and which differential expression tool should you use? *RNA*, 22(6), 839-851. doi:10.1261/rna.053959.115
- Schwameis, M., Buchtele, N., Wadowski, P. P., Schoergenhofer, C., & Gilma, B. (2016). Chikungunya vaccines in development. *Hum Vaccin Immunother*, 12(3), 716-731. doi:10.1080/21645515.2015.1101197
- Semenza, J. C., & Suk, J. E. (2018). Vector-borne diseases and climate change: a European perspective. *FEMS Microbiol Lett*, 365(2). doi:10.1093/femsle/fnx244
- Septfons A, N. H., Leparac-Goffart I, Giron S, Delisle E, Chappert JL, et al. . (2015). Surveillance du chikungunya et de la dengue en France métropolitaine, 2014. *Bull Epidémiol Hebd.*, (13-14):204-11.
- Sergon, K., Njuguna, C., Kalani, R., Ofula, V., Onyango, C., Konongoi, L. S., . . . Breiman, R. F. (2008). Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *Am J Trop Med Hyg*, 78(2), 333-337.
- Shalan, E. A., & Canyon, D. V. (2009). Aquatic insect predators and mosquito control. *Trop Biomed*, 26(3), 223-261.
- Shelly, S., Lukinova, N., Bambina, S., Berman, A., & Cherry, S. (2009). Autophagy is an essential component of *Drosophila* immunity against vesicular stomatitis virus. *Immunity*, 30(4), 588-598. doi:10.1016/j.immuni.2009.02.009
- Shil, P., Kothawale, D. R., & Sudeep, A. B. (2018). Rainfall and Chikungunya incidences in India during 2010-2014. *Virusdisease*, 29(1), 46-53. doi:10.1007/s13337-018-0428-6
- Silva, L. A., & Dermody, T. S. (2017). Chikungunya virus: epidemiology, replication, disease mechanisms, and prospective intervention strategies. *J Clin Invest*, 127(3), 737-749. doi:10.1172/JCI84417
- Sim, S., & Dimopoulos, G. (2010). Dengue virus inhibits immune responses in *Aedes aegypti* cells. *PLoS One*, 5(5), e10678. doi:10.1371/journal.pone.0010678
- Siomi, M. C., Sato, K., Pezic, D., & Aravin, A. A. (2011). PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 12(4), 246-258. doi:10.1038/nrm3089
- Sivan, A., Shriram, A. N., Sunish, I. P., & Vidhya, P. T. (2015). Host-feeding pattern of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in heterogeneous landscapes of South Andaman, Andaman and Nicobar Islands, India. *Parasitol Res*, 114(9), 3539-3546. doi:10.1007/s00436-015-4634-5
- Skalsky, R. L., Vanlandingham, D. L., Scholle, F., Higgs, S., & Cullen, B. R. (2010). Identification of microRNAs expressed in two mosquito vectors, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*. *BMC Genomics*, 11, 119. doi:10.1186/1471-2164-11-119
- Skuse, F. A. A. (1899). *The banded mosquito of Bengal*.
- Smith, E. C. (2017). The not-so-infinite malleability of RNA viruses: Viral and cellular determinants of RNA virus mutation rates. *PLoS Pathog*, 13(4), e1006254. doi:10.1371/journal.ppat.1006254
- Smith, L. B., Kasai, S., & Scott, J. G. (2016). Pyrethroid resistance in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: Important mosquito vectors of human diseases. *Pestic Biochem Physiol*, 133, 1-12. doi:10.1016/j.pestbp.2016.03.005
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L., & Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*, 393(2), 183-197. doi:10.1016/j.virol.2009.07.024
- Son, K. N., Liang, Z., & Lipton, H. L. (2015). Double-Stranded RNA Is Detected by Immunofluorescence Analysis in RNA and DNA Virus Infections, Including Those by

- Negative-Stranded RNA Viruses. *J Virol*, 89(18), 9383-9392. doi:10.1128/JVI.01299-15
- Soper, F. L. (1965). The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. *Am J Trop Med Hyg*, 14(6), 887-891. doi:10.4269/ajtmh.1965.14.887
- Sorensen, J. G., Manenti, T., Bechsgaard, J. S., Schou, M. F., Kristensen, T. N., & Loeschcke, V. (2020). Pronounced Plastic and Evolutionary Responses to Unpredictable Thermal Fluctuations in *Drosophila simulans*. *Front Genet*, 11, 555843. doi:10.3389/fgene.2020.555843
- Souza-Neto, J. A., Powell, J. R., & Bonizzoni, M. (2019). *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect Genet Evol*, 67, 191-209. doi:10.1016/j.meegid.2018.11.009
- Souza-Neto, J. A., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(42), 17841-17846. doi:10.1073/pnas.0905006106
- Steinhauer, D. A., Domingo, E., & Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene*, 122(2), 281-288. doi:10.1016/0378-1119(92)90216-c
- Sternberg, E. D., & Thomas, M. B. (2014). Local adaptation to temperature and the implications for vector-borne diseases. *Trends Parasitol*, 30(3), 115-122. doi:10.1016/j.pt.2013.12.010
- Strand, M. R. (2018). Composition and functional roles of the gut microbiota in mosquitoes. *Curr Opin Insect Sci*, 28, 59-65. doi:10.1016/j.cois.2018.05.008
- Su, G. L. (2008). Correlation of climatic factors and dengue incidence in Metro Manila, Philippines. *Ambio*, 37(4), 292-294. doi:10.1579/0044-7447(2008)37[292:cocfad]2.0.co;2
- Suk, J. E., & Semenza, J. C. (2011). Future infectious disease threats to Europe. *Am J Public Health*, 101(11), 2068-2079. doi:10.2105/AJPH.2011.300181
- Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Liu, Y., Wu, P., Liu, Z., . . . Cheng, G. (2020). A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy. *Nat Commun*, 11(1), 260. doi:10.1038/s41467-019-14115-z
- Sutherst, R. W. (2004). Global change and human vulnerability to vector-borne diseases. *Clin Microbiol Rev*, 17(1), 136-173. doi:10.1128/cmr.17.1.136-173.2004
- Sy, A. K., Saito-Obata, M., Medado, I. A., Tohma, K., Dapat, C., Segubre-Mercado, E., . . . Oshitani, H. (2016). Molecular Characterization of Chikungunya Virus, Philippines, 2011-2013. *Emerg Infect Dis*, 22(5), 887-890. doi:10.3201/eid2205.151268
- Tabachnick, W. J. (2016). Climate Change and the Arboviruses: Lessons from the Evolution of the Dengue and Yellow Fever Viruses. *Annu Rev Virol*, 3(1), 125-145. doi:10.1146/annurev-virology-110615-035630
- Tan, A. W., Loke, S. R., Benjamin, S., Lee, H. L., Chooi, K. H., & Sofian-Azirun, M. (2012). Spray application of *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti strain AM65-52) against *Aedes aegypti* (L.) and *Ae. albopictus* Skuse populations and impact on dengue transmission in a dengue endemic residential site in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 43(2), 296-310.
- Terenius, O., Marinotti, O., Sieglaff, D., & James, A. A. (2008). Molecular genetic manipulation of vector mosquitoes. *Cell Host Microbe*, 4(5), 417-423. doi:10.1016/j.chom.2008.09.002
- Tesla, B., Demakovskiy, L. R., Mordecai, E. A., Ryan, S. J., Bonds, M. H., Ngonghala, C. N., . . . Murdock, C. C. (2018). Temperature drives Zika virus transmission: evidence from empirical and mathematical models. *Proc Biol Sci*, 285(1884). doi:10.1098/rspb.2018.0795

- Tesla, B., Demakovsky, L. R., Packiam, H. S., Mordecai, E. A., Rodriguez, A. D., Bonds, M. H., . . . Murdock, C. C. (2018). Estimating the effects of variation in viremia on mosquito susceptibility, infectiousness, and R0 of Zika in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, *12*(8), e0006733. doi:10.1371/journal.pntd.0006733
- Tilston, N., Skelly, C., & Weinstein, P. (2009). Pan-European Chikungunya surveillance: designing risk stratified surveillance zones. *Int J Health Geogr*, *8*, 61. doi:10.1186/1476-072X-8-61
- Timmermann, A., An, S. I., Kug, J. S., Jin, F. F., Cai, W., Capotondi, A., . . . Zhang, X. (2018). El Nino-Southern Oscillation complexity. *Nature*, *559*(7715), 535-545. doi:10.1038/s41586-018-0252-6
- Tiwari, M., Parida, M., Santhosh, S. R., Khan, M., Dash, P. K., & Rao, P. V. (2009). Assessment of immunogenic potential of Vero adapted formalin inactivated vaccine derived from novel ECSA genotype of Chikungunya virus. *Vaccine*, *27*(18), 2513-2522. doi:10.1016/j.vaccine.2009.02.062
- To, K. K., & Yuen, K. Y. (2012). In memory of Patrick Manson, founding father of tropical medicine and the discovery of vector-borne infections. *Emerg Microbes Infect*, *1*(10), e31. doi:10.1038/emi.2012.32
- Torres, J. R., Falleiros-Arlant, L. H., Duenas, L., Pleitez-Navarrete, J., Salgado, D. M., & Castillo, J. B. (2016). Congenital and perinatal complications of chikungunya fever: a Latin American experience. *Int J Infect Dis*, *51*, 85-88. doi:10.1016/j.ijid.2016.09.009
- Trewin, B. J., Kay, B. H., Darbro, J. M., & Hurst, T. P. (2013). Increased container-breeding mosquito risk owing to drought-induced changes in water harvesting and storage in Brisbane, Australia. *Int Health*, *5*(4), 251-258. doi:10.1093/inthealth/iht023
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E., & Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog*, *3*(12), e201. doi:10.1371/journal.ppat.0030201
- Urbanelli, S., Bellini, R., Carrieri, M., Sallicandro, P., & Celli, G. (2000). Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity (Edinb)*, *84* (Pt 3), 331-337. doi:10.1046/j.1365-2540.2000.00676.x
- Vaidyanathan, R., Fleisher, A. E., Minnick, S. L., Simmons, K. A., & Scott, T. W. (2008). Nutritional stress affects mosquito survival and vector competence for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *8*(6), 727-732. doi:10.1089/vbz.2007.0189
- Vairo, F., Haider, N., Kock, R., Ntoumi, F., Ippolito, G., & Zumla, A. (2019). Chikungunya: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Features, Management, and Prevention. *Infect Dis Clin North Am*, *33*(4), 1003-1025. doi:10.1016/j.idc.2019.08.006
- Valiente Moro, C., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Ravelonandro, P., & Mavingui, P. (2013). Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiol*, *13*, 70. doi:10.1186/1471-2180-13-70
- van Duijl-Richter, M. K., Hoornweg, T. E., Rodenhuis-Zybert, I. A., & Smit, J. M. (2015). Early Events in Chikungunya Virus Infection-From Virus Cell Binding to Membrane Fusion. *Viruses*, *7*(7), 3647-3674. doi:10.3390/v7072792
- Vanlandingham, D. L., Hong, C., Klingler, K., Tsetsarkin, K., McElroy, K. L., Powers, A. M., . . . Higgs, S. (2005). Differential infectivities of o'nyong-nyong and chikungunya virus isolates in *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, *72*(5), 616-621.
- Vanlandingham, D. L., Tsetsarkin, K., Klingler, K. A., Hong, C., McElroy, K. L., Lehane, M. J., & Higgs, S. (2006). Determinants of vector specificity of o'nyong nyong and chikungunya viruses in *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg*, *74*(4), 663-669.

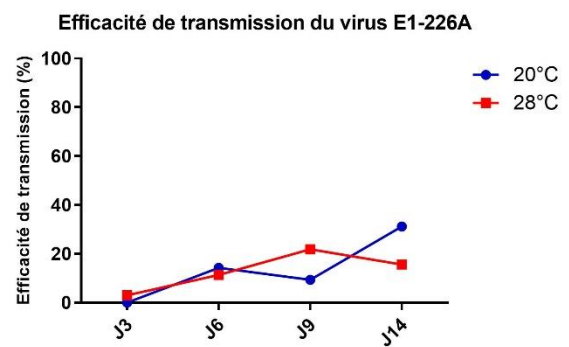
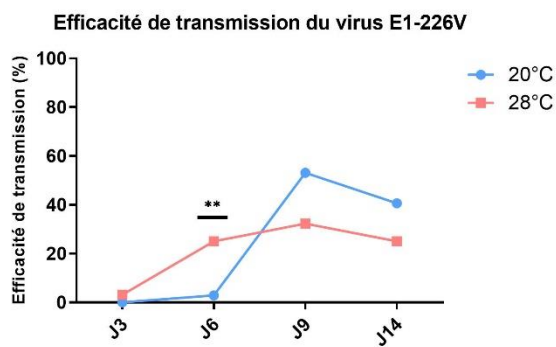
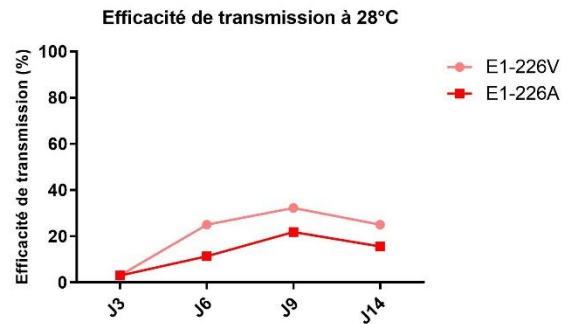
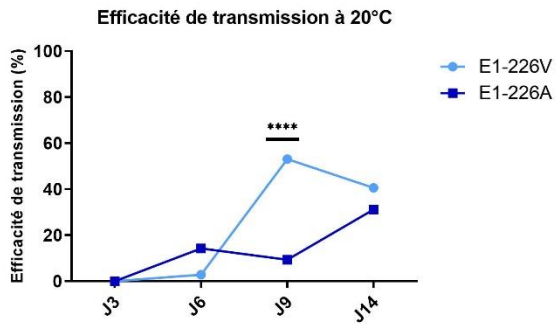
- Vasilakis, N., & Tesh, R. B. (2015). Insect-specific viruses and their potential impact on arbovirus transmission. *Curr Opin Virol*, *15*, 69-74. doi:10.1016/j.coviro.2015.08.007
- Vazeille, M., Madec, Y., Mousson, L., Bellone, R., Barre-Cardi, H., Sousa, C. A., . . . Failloux, A. B. (2019). Zika virus threshold determines transmission by European *Aedes albopictus* mosquitoes. *Emerg Microbes Infect*, *8*(1), 1668-1678. doi:10.1080/22221751.2019.1689797
- Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., . . . Failloux, A. B. (2007). Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One*, *2*(11), e1168. doi:10.1371/journal.pone.0001168
- Vazeille, M., Moutailler, S., Pages, F., Jarjaval, F., & Failloux, A. B. (2008). Introduction of *Aedes albopictus* in Gabon: what consequences for dengue and chikungunya transmission? *Trop Med Int Health*, *13*(9), 1176-1179. doi:10.1111/j.1365-3156.2008.02123.x
- Vazeille, M., Zouache, K., Vega-Rua, A., Thiberge, J. M., Caro, V., Yebakima, A., . . . Failloux, A. B. (2016). Importance of mosquito "quasispecies" in selecting an epidemic arthropod-borne virus. *Sci Rep*, *6*, 29564. doi:10.1038/srep29564
- Vega-Rua, A., Lourenco-de-Oliveira, R., Mousson, L., Vazeille, M., Fuchs, S., Yebakima, A., . . . Failloux, A. B. (2015). Chikungunya virus transmission potential by local *Aedes* mosquitoes in the Americas and Europe. *PLoS Negl Trop Dis*, *9*(5), e0003780. doi:10.1371/journal.pntd.0003780
- Vega-Rua, A., Marconcini, M., Madec, Y., Manni, M., Carraretto, D., Gomulski, L. M., . . . Malacrida, A. R. (2020). Vector competence of *Aedes albopictus* populations for chikungunya virus is shaped by their demographic history. *Commun Biol*, *3*(1), 326. doi:10.1038/s42003-020-1046-6
- Vega-Rua, A., Zouache, K., Caro, V., Diancourt, L., Delaunay, P., Grandadam, M., & Failloux, A. B. (2013). High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One*, *8*(3), e59716. doi:10.1371/journal.pone.0059716
- Vega-Rua, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A. B., & Lourenco-de-Oliveira, R. (2014). High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J Virol*, *88*(11), 6294-6306. doi:10.1128/JVI.00370-14
- Vijaykrishna, D., Mukerji, R., & Smith, G. J. (2015). RNA Virus Reassortment: An Evolutionary Mechanism for Host Jumps and Immune Evasion. *PLoS Pathog*, *11*(7), e1004902. doi:10.1371/journal.ppat.1004902
- Villamil-Gomez, W., Alba-Silvera, L., Menco-Ramos, A., Gonzalez-Vergara, A., Molinares-Palacios, T., Barrios-Corrales, M., & Rodriguez-Morales, A. J. (2015). Congenital Chikungunya Virus Infection in Sincelejo, Colombia: A Case Series. *J Trop Pediatr*, *61*(5), 386-392. doi:10.1093/tropej/fmv051
- Volk, S. M., Chen, R., Tsetsarkin, K. A., Adams, A. P., Garcia, T. I., Sall, A. A., . . . Weaver, S. C. (2010). Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol*, *84*(13), 6497-6504. doi:10.1128/JVI.01603-09
- Wahid, B., Ali, A., Rafique, S., & Idrees, M. (2017). Global expansion of chikungunya virus: mapping the 64-year history. *Int J Infect Dis*, *58*, 69-76. doi:10.1016/j.ijid.2017.03.006
- Waldock, J., Chandra, N. L., Lelieveld, J., Proestos, Y., Michael, E., Christophides, G., & Parham, P. E. (2013). The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathog Glob Health*, *107*(5), 224-241. doi:10.1179/2047773213Y.0000000100

- Wang, E., Volkova, E., Adams, A. P., Forrester, N., Xiao, S. Y., Frolov, I., & Weaver, S. C. (2008). Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine*, *26*(39), 5030-5039. doi:10.1016/j.vaccine.2008.07.054
- Wang, H., Gort, T., Boyle, D. L., & Clem, R. J. (2012). Effects of manipulating apoptosis on Sindbis virus infection of *Aedes aegypti* mosquitoes. *J Virol*, *86*(12), 6546-6554. doi:10.1128/JVI.00125-12
- Watts, A. G., Miniota, J., Joseph, H. A., Brady, O. J., Kraemer, M. U. G., Grills, A. W., . . . Cetron, M. (2017). Elevation as a proxy for mosquito-borne Zika virus transmission in the Americas. *PLoS One*, *12*(5), e0178211. doi:10.1371/journal.pone.0178211
- Weaver, S. C. (2006). Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, *299*, 285-314. doi:10.1007/3-540-26397-7_10
- Weaver, S. C., Chen, R., & Diallo, M. (2020). Chikungunya Virus: Role of Vectors in Emergence from Enzootic Cycles. *Annu Rev Entomol*, *65*, 313-332. doi:10.1146/annurev-ento-011019-025207
- Weaver, S. C., Kang, W., Shirako, Y., Rumenapf, T., Strauss, E. G., & Strauss, J. H. (1997). Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J Virol*, *71*(1), 613-623. doi:10.1128/JVI.71.1.613-623.1997
- Weber, C., Berberich, E., von Rhein, C., Henss, L., Hildt, E., & Schnierle, B. S. (2017). Identification of Functional Determinants in the Chikungunya Virus E2 Protein. *PLoS Negl Trop Dis*, *11*(1), e0005318. doi:10.1371/journal.pntd.0005318
- Weng, M. H., Lien, J. C., Wang, Y. M., Wu, H. L., & Chin, C. (1997). Susceptibility of three laboratory strains of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to Japanese encephalitis virus from Taiwan. *J Med Entomol*, *34*(6), 745-747. doi:10.1093/jmedent/34.6.745
- Wintachai, P., Wikan, N., Kuadkitkan, A., Jaimipuk, T., Ubol, S., Pulmanusahakul, R., . . . Smith, D. R. (2012). Identification of prohibitin as a Chikungunya virus receptor protein. *J Med Virol*, *84*(11), 1757-1770. doi:10.1002/jmv.23403
- Wu, F., Liu, Q., Lu, L., Wang, J., Song, X., & Ren, D. (2011). Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in northwestern China. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *11*(8), 1181-1186. doi:10.1089/vbz.2010.0032
- Wu, P., Sun, P., Nie, K., Zhu, Y., Shi, M., Xiao, C., . . . Cheng, G. (2019). A Gut Commensal Bacterium Promotes Mosquito Permissiveness to Arboviruses. *Cell Host Microbe*, *25*(1), 101-112 e105. doi:10.1016/j.chom.2018.11.004
- Xi, Z., Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*, *4*(7), e1000098. doi:10.1371/journal.ppat.1000098
- Xuan le, T. T., Van Hau, P., Thu do, T., & Toan do, T. T. (2014). Estimates of meteorological variability in association with dengue cases in a coastal city in northern Vietnam: an ecological study. *Glob Health Action*, *7*, 23119. doi:10.3402/gha.v7.23119
- Yoeli, M., & Mer, G. G. (1938). The relation of blood feeds to the maturation of ova in *Anopheles elutus*. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, *31*(4), 437-444. doi:10.1016/s0035-9203(38)90126-9
- Young, P. R. (2018). Arboviruses: A Family on the Move. *Adv Exp Med Biol*, *1062*, 1-10. doi:10.1007/978-981-10-8727-1_1
- Zabalou, S., Riegler, M., Theodorakopoulou, M., Stauffer, C., Savakis, C., & Bourtzis, K. (2004). Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *101*(42), 15042-15045. doi:10.1073/pnas.0403853101
- Zannoli, S., & Sambri, V. (2019). West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms*, *7*(7). doi:10.3390/microorganisms7070184

- Zeller, H., Van Bortel, W., & Sudre, B. (2016). Chikungunya: Its History in Africa and Asia and Its Spread to New Regions in 2013-2014. *J Infect Dis*, 214(suppl 5), S436-S440. doi:10.1093/infdis/jiw391
- Zeller, H. G., & Schuffenecker, I. (2004). West Nile virus: an overview of its spread in Europe and the Mediterranean basin in contrast to its spread in the Americas. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 23(3), 147-156. doi:10.1007/s10096-003-1085-1
- Zhang, J., Lan, Y., Li, M. Y., Lamers, M. M., Fusade-Boyer, M., Klemm, E., . . . Sanyal, S. (2018). Flaviviruses Exploit the Lipid Droplet Protein AUP1 to Trigger Lipophagy and Drive Virus Production. *Cell Host Microbe*, 23(6), 819-831 e815. doi:10.1016/j.chom.2018.05.005
- Zhang, R., Kim, A. S., Fox, J. M., Nair, S., Basore, K., Klimstra, W. B., . . . Diamond, M. S. (2018). Mxra8 is a receptor for multiple arthritogenic alphaviruses. *Nature*, 557(7706), 570-574. doi:10.1038/s41586-018-0121-3
- Zheng, J., Han, W., Jiang, B., Ma, W., & Zhang, Y. (2017). Infectious Diseases and Tropical Cyclones in Southeast China. *Int J Environ Res Public Health*, 14(5). doi:10.3390/ijerph14050494
- Zouache, K., Fontaine, A., Vega-Rua, A., Mousson, L., Thiberge, J. M., Lourenco-De-Oliveira, R., . . . Failloux, A. B. (2014). Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci*, 281(1792). doi:10.1098/rspb.2014.1078
- Zouache, K., Raharimalala, F. N., Raquin, V., Tran-Van, V., 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(3), 377-389. doi:10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x
- Zouache, K., Voronin, D., Tran-Van, V., Mousson, L., Failloux, A. B., & Mavingui, P. (2009). Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One*, 4(7), e6388. doi:10.1371/journal.pone.0006388
- Zuharah, W. F., & Lester, P. J. (2010). The influence of aquatic predators on mosquito abundance in animal drinking troughs in New Zealand. *J Vector Ecol*, 35(2), 347-353. doi:10.1111/j.1948-7134.2010.00093.x
- Zwart, M. P., & Elena, S. F. (2015). Matters of Size: Genetic Bottlenecks in Virus Infection and Their Potential Impact on Evolution. *Annu Rev Virol*, 2(1), 161-179. doi:10.1146/annurev-virology-100114-055135

Annexes

Annexe 1. Cinétique de transmission des clones infectieux du CHIKV E1-226A et E1-226V (P0) chez le moustique *Ae. albopictus*.



Annexe 2. Récapitulatif du nombre de femelles analysées lors des infections orales de moustiques pour l'évaluation des performances de transmission par *Ae. albopictus* des variants générés *in vitro* (P30).

Virus	Réplicat viral	Temperature d'incubation du moustique	Jour post-infection	Nombre de femelles analysées	Nombre de salives positives	Efficacité de transmission (%)
P30-V-20°C	1	20°C	6	24	0	0,0
P30-V-20°C	1	20°C	9	24	4	16,7
P30-V-20°C	1	28°C	6	24	0	0,0
P30-V-20°C	1	28°C	9	23	3	13,0
P30-V-20°C	2	20°C	6	24	2	8,3
P30-V-20°C	2	20°C	9	24	3	12,5
P30-V-20°C	2	28°C	6	24	1	4,2
P30-V-20°C	2	28°C	9	24	2	8,3
P30-V-28°C	1	20°C	6	24	2	8,3
P30-V-28°C	1	20°C	9	24	1	4,2
P30-V-28°C	1	28°C	6	24	0	0,0
P30-V-28°C	1	28°C	9	24	1	4,2
P30-V-28°C	2	20°C	6	24	0	0,0
P30-V-28°C	2	20°C	9	24	3	12,5
P30-V-28°C	2	28°C	6	24	1	4,2
P30-V-28°C	2	28°C	9	24	2	8,3
P0-V	–	20°C	6	24	3	12,5
P0-V	–	20°C	9	24	4	16,7
P0-V	–	28°C	6	24	8	33,3
P0-V	–	28°C	9	24	6	25,0
P30-A-20°C	1	20°C	6	24	0	0,0
P30-A-20°C	1	20°C	9	24	0	0,0
P30-A-20°C	1	28°C	6	24	0	0,0
P30-A-20°C	1	28°C	9	24	0	0,0
P30-A-20°C	2	20°C	6	24	0	0,0
P30-A-20°C	2	20°C	9	24	1	4,2
P30-A-20°C	2	28°C	6	24	1	4,2
P30-A-20°C	2	28°C	9	24	1	4,2
P30-A-28°C	1	20°C	6	24	0	0,0
P30-A-28°C	1	20°C	9	24	2	8,3
P30-A-28°C	1	28°C	6	24	0	0,0
P30-A-28°C	1	28°C	9	24	2	8,3
P30-A-28°C	2	20°C	6	24	0	0,0
P30-A-28°C	2	20°C	9	24	0	0,0
P30-A-28°C	2	28°C	6	24	0	0,0
P30-A-28°C	2	28°C	9	24	2	8,3
P0-A	–	20°C	6	24	0	0,0
P0-A	–	20°C	9	24	6	25,0
P0-A	–	28°C	6	24	5	20,8
P0-A	–	28°C	9	24	5	20,8

Annexe 3. Récapitulatif du nombre de femelles analysées lors des infections orales de moustiques pour l'évaluation des performances de transmission par *Ae. albopictus* des variants générés *in vivo* (P5 et P30_{U4.4}+P5).

Virus	Réplicat viral	Temperature d'incubation du moustique	Jour post-infection	Nombre de femelles analysées	Nombre de salives positives	Efficacité de transmission (%)
P30+P5-V-20°C	1	20°C	6	15	0	0,0
P30+P5-V-20°C	1	20°C	9	22	0	0,0
P30+P5-V-20°C	1	28°C	6	18	0	0,0
P30+P5-V-20°C	1	28°C	9	21	7	33,3
P30+P5-V-20°C	2	20°C	6	16	0	0,0
P30+P5-V-20°C	2	20°C	9	21	1	4,8
P30+P5-V-20°C	2	28°C	6	18	3	16,7
P30+P5-V-20°C	2	28°C	9	28	4	14,3
P30+P5-V-28°C	1	20°C	6	11	0	0,0
P30+P5-V-28°C	1	20°C	9	15	2	13,3
P30+P5-V-28°C	1	28°C	6	11	0	0,0
P30+P5-V-28°C	1	28°C	9	17	3	17,6
P30+P5-V-28°C	2	20°C	6	19	2	10,5
P30+P5-V-28°C	2	20°C	9	26	5	19,2
P30+P5-V-28°C	2	28°C	6	23	2	8,7
P30+P5-V-28°C	2	28°C	9	27	13	48,1
P5-V-20°C	1	20°C	6	13	0	0,0
P5-V-20°C	1	20°C	9	26	5	19,2
P5-V-20°C	1	28°C	6	14	2	14,3
P5-V-20°C	1	28°C	9	20	5	25,0
P5-V-20°C	2	20°C	6	16	1	6,3
P5-V-20°C	2	20°C	9	18	3	16,7
P5-V-20°C	2	28°C	6	16	4	25,0
P5-V-20°C	2	28°C	9	17	3	17,6
P5-V-28°C	1	20°C	6	15	2	13,3
P5-V-28°C	1	20°C	9	30	5	16,7
P5-V-28°C	1	28°C	6	16	2	12,5
P5-V-28°C	1	28°C	9	20	2	10,0
P5-V-28°C	2	20°C	6	14	0	0,0
P5-V-28°C	2	20°C	9	20	9	45,0
P5-V-28°C	2	28°C	6	12	2	16,7
P5-V-28°C	2	28°C	9	22	5	22,7
P0-V	–	20°C	6	23	0	0,0
P0-V	–	20°C	9	24	6	25,0
P0-V	–	28°C	6	22	3	13,6
P0-V	–	28°C	9	24	2	8,3

Communications scientifiques

Publications scientifiques :

1. **Bellone R**, Lequime S, Jupille H, Göertz GP, Aubry F, Mousson L, Piorkowski G, Yen PS, Gabiane G, Vazeille M, Sakuntabhai A, Pijlman GP, de Lamballerie X, Lambrechts L, Failloux AB. 2020. Experimental adaptation of dengue virus 1 to *Aedes albopictus* mosquitoes by in vivo selection. *Scientific Reports* 2020 Oct 27;10(1):18404. doi: 10.1038/s41598-020-75042-4. PMID: 33110109.
2. **Bellone R**, Failloux AB. The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission. *Frontiers in Microbiology* 2020 Sep 25;11:584846. doi: 10.3389/fmicb.2020.584846. PMID: 33101259.
3. Vazeille M, Madec Y, Mousson L, **Bellone R**, Barré-Cardi H, Sousa CA, Jiolle D, Yébakima A, de Lamballerie X, Failloux AB. 2019. Zika virus threshold determines transmission by European *Aedes albopictus* mosquitoes. *Emerging Microbes & Infections* 8(1):1668-1678. doi: 10.1080/22221751.2019.1689797.

Autres communications scientifiques :

Décembre 2020 - Virology afternoons, Institut Pasteur, Paris (Oral de 15 min)

Octobre 2019 - Club Viro, Institut Pasteur, Paris (Oral de 20 min)

Avril 2019 - European Congress of Virology, Rotterdam (Poster)

Juin 2019 - Journées Départementales de Virologie, Institut Pasteur, Paris (Poster)

Mai 2018 - Virology afternoons, Institut Pasteur, Paris (Oral de 15 min)

Octobre 2017 - Rentrée de l'école doctorale ED515, UPMC, Paris (Poster)

Travaux collaboratifs

Projet InfraVec2 : Caractérisation du microbiome du moustique *Ae. albopictus* pendant le processus de colonisation. (Analyse des données en cours)

Projet RNA Vacci-Code : Ré-encodage de virus à ARN pour la production de vaccins candidats vivants atténués. (Rédaction de la publication en cours)

Projet DENFREE : Adaptation expérimentale du virus de la dengue au moustique *Ae. albopictus* par sélection de variants chez le moustique. (Travaux publiés en octobre 2020)