



HAL
open science

**Transmission des virus de la dengue de La Réunion par
les moustiques *Aedes albopictus* de La Réunion et
d'autres îles du Sud-Ouest de l'océan Indien : rester au
plus proche du terrain pour une meilleure
compréhension de ces interactions**

Sarah Hafsia

► **To cite this version:**

Sarah Hafsia. Transmission des virus de la dengue de La Réunion par les moustiques *Aedes albopictus* de La Réunion et d'autres îles du Sud-Ouest de l'océan Indien : rester au plus proche du terrain pour une meilleure compréhension de ces interactions. Sciences du Vivant [q-bio]. Université de la Réunion, 2024. Français. NNT : 2024LARE0009 . tel-04750242

HAL Id: tel-04750242

<https://theses.hal.science/tel-04750242v1>

Submitted on 23 Oct 2024

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.

Université de La Réunion
Ecole doctorale « Science Technologies et Santé » E.D.542
Présentée en vue de l'obtention du grade :
Docteur en Microbiologie et Entomologie Médicale

Transmission des virus de la dengue de La Réunion par les moustiques *Aedes albopictus* réunionnais et d'autres îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien : rester au plus proche du terrain pour une meilleure compréhension de ces interactions.

Présentée par **Sarah HAFSIA**
Soutenance publique le jeudi 04 juillet 2024

Composition du jury

Anna COHUET	Directrice de Recherche, IRD	Rapporteuse
Myrielle DUPONT ROUZEYROL	Chargée de Recherche PhD-HDR, IPNC	Rapporteuse
Thierry BALDET	Cadre de la Recherche, PhD, ASTRE CIRAD	Président du jury et Examineur
Hélène DELATTE	Chercheuse, PhD-HDR, CIRAD	Examineur
Romain PIGEALT	MCU, Université de Poitiers	Examinatrice
Célestine ATYAME NTEN	MCU-HDR, Université de La Réunion	Co-directrice de thèse
Patrick MAVINGUI	Directeur de Recherche, CNRS	Directeur de thèse

Cette thèse a reçu le soutien financier de la Région Réunion et de l'Union Européenne-Fonds européen de développement régional (FEDER) 2014-2020 ; DIREC/20181189.



Remerciements

A Mélissa,

*Je tiens à dédier cette thèse à mon amie **Mélissa Houeto**. Ton souvenir m'aide à toujours trouver la force de me relever et d'avancer. Je ne suis pas devenue médecin comme on se l'était promis, je ne guérirai peut-être pas cette fichue maladie, mais je continuerai à te faire vivre chacune de mes aventures au travers de mes pensées. Le temps passe mais ton sourire, lui, est éternel.*

J'adresse mes remerciements aux membres du jury **DR Anna COHUET, Dr Myrielle DUPONT ROUZEYROL, Dr Thierry BALDET, Dr Hélène DELATTE, MCU Romain PIGEALT**, qui ont accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je remercie **DR. Patrick MAVINGUI** de m'avoir accueillie au sein de l'unité mixte de recherche Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT) qu'il dirige. Je tiens aussi à remercier mes deux directeurs de thèse, **DR. Patrick MAVINGUI**, et **MCU Célestine ATYAME**, pour m'avoir fait confiance en me donnant l'opportunité de réaliser mon doctorat sur un sujet passionnant et de m'avoir encadré au cours de celle-ci.

Je souhaite également vivement remercier les membres de mon comité de suivi de thèse, **PU Didier BOUCHON, MCU Nathalie BOULANGER, PU Abdelaziz HEDDI**, et **PU Philippe DESPRES** pour tous leurs conseils qui ont su enrichir ma thèse, et aussi pour leurs encouragements tout au long de celle-ci. Merci également à **Haoues ALOUT** qui m'a énormément aidé pour la partie analyse. Sans toi je serais très certainement encore bloquée pour toujours dans l'enfer de mes scripts R, alors un grand merci pour ton aide, ta patience et ta gentillesse!

Je tiens à remercier mes collègues de l'UMR PIMIT, spécialement ceux de l'équipe DYSIIS, pour leur aide, leurs conseils, et les échanges que nous avons pu avoir. Cela a été enrichissant de travailler avec vous. Merci en particulier à **Pablo TORTOSA** pour son aide et sa bienveillance.

Un remerciement tout particulier à ces collègues qui sont devenus des amis au fil des années. **Cyrille LEBON, David WILKINSON**, et **Yann GOMARD**, vous avez été comme des grands frères pour moi tout au long de cette thèse. Vous m'avez tous les trois beaucoup apporté, que ce soit d'un point de vue scientifique, en m'encadrant dans mes manips et mes analyses, ou d'un

point de vue humain. On a échangé, rigolé, et partagé des moments que je n'oublierai pas, que ce soit sur le terrain ou au laboratoire. Je savais que la recherche était un travail d'équipe, et au cours de cette thèse vous m'en avez apporté une preuve éclatante. Merci à vous trois! **Céline TOTTY**, tu as été une merveilleuse rencontre. Ta gentillesse n'a pas d'égal, merci pour tous ces moments d'échanges et de rires. **Eva OGIRE**, aïe aïe aïe, ça y est enfin je te rejoins de l'autre côté, j'en aurai mis du temps !!! Merci pour tout Eva, ma comparse de galère comme tu le dis si bien. Tu es talentueuse, d'une persévérance incroyable, et tu as un cœur en or. Bref, tu es une personne exceptionnelle, merci d'être entrée dans ma vie. Merci aussi à **Colette, Magali, Marjolaine, Fenia, Jade, Rachel, Fiona, Samantha, Clément, Daed, Alawiya** et **Juliano**, j'ai passé d'incroyables moments avec vous tous !

Merci également à **Michel ARBOIREAU**, un collègue de l'université devenu un ami. Les valeurs que tu fais rayonner autour de toi et de l'association Grand Air, ainsi que l'énergie déployée et ta ténacité au service d'un monde meilleur et plus juste sont une source d'inspiration. Je suis heureuse de vous avoir rencontré, toi et **Patricia**.

Mes amis de longues dates, **Sarah NAMET, Mathieu KICHENIN, Kézia POUDOU, Laïs GODEFROY**... pour ne citer que vous, je tiens à vous remercier de faire partie de ma vie. Je me sens chanceuse d'avoir mon petit monde rempli d'aussi différentes, uniques, et belles personnes. Merci pour tout... Nos rires et nos échanges n'ont pas de prix, ils me remplissent de bonheur, m'enrichissent, et m'aident à toujours aller de l'avant.

Un grand merci aussi à **Michel, Sonia** et **Yolande**, pour votre bienveillance, votre accueil, et votre soutien lors des bons moments, comme lors des plus délicats.

A ma famille, **Papa, Maman, Mehdi, Seymi, Elodie, Erina, Arthur, Lina, Malik**, et **Kenzo**. Merci pour tous vos encouragements, vos rires, votre amour. Vous êtes et serez à jamais, toutes et tous, ma plus grande fierté. Mon amour pour vous est incommensurable.

Iswaran, je n'ai pas de mots pour t'exprimer ma gratitude. Tu as été d'un soutien à toutes épreuves dès les tous premiers jours de ma thèse jusqu'à aujourd'hui, le jour de ma soutenance. Et des épreuves, il y en a eu.. Tu es l'une des personnes les plus merveilleuses que je connaisse. Je me sens privilégiée de t'avoir dans ma vie. Merci, merci pour tout, du fond du cœur. Et tu sais quoi ? Quoi qu'il arrive, le meilleur reste à venir...

Résumé

La dengue est l'arbovirose la plus répandue à l'échelle globale avec la moitié de la population mondiale vivant en zone à risque, majoritairement au sein de la ceinture tropicale et subtropicale. Le virus de la dengue (DENV), agent étiologique de cette maladie, est un *Orthoflavivirus* comptant quatre sérotypes différents (DENV-1 à DENV-4). Deux espèces de moustiques à savoir *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* sont les principaux vecteurs impliqués dans la transmission du DENV dans les populations humaines au niveau mondial. Depuis 2017, l'île de La Réunion, département français d'outre-mer situé dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI), fait face à une épidémie de dengue sans précédent caractérisée par une augmentation significative du nombre de cas humains et de formes sévères de la maladie. Le moustique *Ae. albopictus* étant reconnu comme l'espèce vectrice du DENV dans les populations humaines réunionnaises, l'objectif principal de cette thèse était d'étudier les interactions entre le DENV et les populations d'*Ae. albopictus* de La Réunion afin de mieux comprendre le rôle de ce vecteur dans l'épidémiologie de la dengue. Dans la première partie de cette thèse, nous avons retracé l'historique de la dengue dans le SOOI, et plus particulièrement à La Réunion. Nous avons ensuite caractérisé la diversité génétique des souches virales de DENV-1 et DENV-2 ayant circulé à La Réunion et aux Seychelles lors des dernières épidémies. La troisième partie de cette thèse a été consacrée à l'analyse de la compétence vectorielle (aptitude d'une population de moustiques à transmettre un pathogène donné) des populations d'*Ae. albopictus* de différentes générations (générations F0 et F2) et collectées dans différents sites autour de l'île. Nous avons également examiné l'influence des bactéries endocellulaires *Wolbachia* sur les phénotypes de compétence vectorielle. Pour finir, nous avons étudié la compétence vectorielle des populations d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* provenant de différentes îles du SOOI et infectées par les virus de la dengue, du Chikungunya et du Zika. Les résultats de ces travaux permettent de mieux comprendre l'épidémiologie de la dengue et les dynamiques de transmission des arbovirus dans les îles du SOOI, particulièrement à La Réunion .

Mots clés : virus de la dengue, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, compétence vectorielle, *Wolbachia*, épidémiologie, île de La Réunion, Sud-Ouest de l'Océan Indien.

Abstract

Dengue is the most widespread arbovirolosis worldwide, with half the world's population living in at-risk areas, mainly in the tropical and subtropical belt. Dengue virus (DENV), the etiological agent of this disease, is an *Orthoflavivirus* with four different serotypes (DENV-1 to DENV-4). Two species of mosquito, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, are the main vectors involved in transmitting DENV to human populations worldwide. Since 2017, Reunion Island, a French overseas department located in the South-West Indian Ocean (SWIO), has been facing an unprecedented dengue epidemic characterized by a significant increase in the number of human cases and severe forms of the disease. As the *Ae. albopictus* mosquito is recognized as the vector species of DENV in human populations on Reunion Island, the main objective of this thesis was to study the interactions between DENV and *Ae. albopictus* populations on Reunion Island, in order to better understand the role of this vector in dengue epidemiology. In the first part of this thesis, we retraced the history of dengue fever in the SWIO, and more specifically in Reunion Island. We then characterized the genetic diversity of DENV-1 and DENV-2 viral strains circulating in Reunion Island and the Seychelles during recent epidemics. The third part of this thesis was devoted to analyzing the vectorial competence (ability of a mosquito population to transmit a given pathogen) of *Ae. albopictus* populations of different generations (F0 and F2 generations) collected in different locations around the island. We also examined the influence of the *Wolbachia* intracellular bacteria on vector competence phenotypes. Finally, we studied the vectorial competence of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* populations from different SWIO islands infected with dengue, Chikungunya and Zika viruses. The results of this work provide a better understanding of the epidemiology of dengue and the transmission dynamics of arboviruses in the SWIO islands, particularly on Reunion Island.

Keywords : Dengue virus, *Aedes albopictus*, *Aedes aegypti*, vector competence, *Wolbachia*, epidemiology, Reunion Island, South West Indian Ocean.

Table des matières

Remerciements.....	1
Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Abréviations.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des tableaux.....	9
Introduction générale.....	10
Synthèse bibliographique.....	15
1. Pathosystème et moustiques vecteurs.....	15
<u>1.1. Généralités sur les pathosystèmes vectoriels.....</u>	15
1.1.1. Pathosystème et mode de vie parasitaire.....	15
1.1.2. Transmission et vection.....	15
1.1.3. Les moustiques vecteurs : qui sont-ils ?.....	18
1.1.4. Les moustiques vecteurs : de leur alimentation dépend la vection.....	20
<u>1.2. La capacité vectorielle des moustiques.....</u>	22
1.2.1. La compétence vectorielle et la période d'incubation extrinsèque.....	22
1.2.2. Les facteurs extrinsèques au pathosystème vectoriel.....	23
1.2.3. Les facteurs intrinsèques au pathosystème vectoriel.....	24
1.2.3.1. Le fond génétique des vecteurs et des pathogènes.....	25
1.2.3.2. Les systèmes de protections.....	26
2. Interactions tripartites : <i>Wolbachia</i> et ses effets sur le pathosystème vectoriel.....	29
<u>2.1. Généralités sur <i>Wolbachia</i>.....</u>	29
2.1.1 Ecologie et biologie.....	29
2.1.2. Diversité phylogénétique.....	31
2.1.3. Organisation des génomes.....	32
<u>2.2. Effets de <i>Wolbachia</i> sur ces hôtes.....</u>	34
2.2.1. Effet sur la reproduction.....	34
2.2.2. <i>Wolbachia</i> , vecteurs et pathogènes.....	37
2.2.2.1. Phénotypes d'interaction.....	38
2.2.2.2. Mécanismes d'interactions.....	39
3. Modèles biologiques de l'étude.....	42
<u>3.1. Les virus de la dengue.....</u>	42
3.1.1. L'historique et les cycles de transmission.....	42

3.1.2. Conséquences mondiales de la dengue en chiffres clés.....	49
3.1.3. Lutte contre la dengue.....	52
3.1.3.1. Traitements préventifs.....	52
3.1.3.3. Méthodes de protection et lutte antivectorielle.....	54
3.1.4. Structure, diversité, et cycle du DENV.....	57
3.1.4.1. Organisation structurale et fonctionnelle du DENV.....	57
3.1.4.2. Phylogénie du virus de la dengue.....	59
3.1.4.3. Cycle viral et tropisme du virus de la dengue.....	61
<u>3.2. Principaux moustiques vecteurs du genre <i>Aedes</i></u>	63
3.2.1. <i>Aedes aegypti</i>	63
3.2.2 <i>Aedes albopictus</i>	66
<u>3.3. Publication 1</u> : « Overview of dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: A systematic review ».....	71

Mémoire expérimental..... 88

1. Description des DENV circulant à La Réunion..... 88

1.1. Introduction..... 88

1.2. Échantillonnage et détection des virus..... 89

1.3. Publication 2: “Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Epidemic Strains from Reunion Island and the Seychelles”..... 90

1.4. Publication 3: “Genetic characterization of Dengue virus serotype 1 circulating in Reunion Island, 2019- 2021, and the Seychelles, 2015-2016” 93

1.5. Discussion et perspectives..... 101

2. Compétence vectorielle des populations réunionnaises..... 107

2.1. Introduction..... 107

2.2. Campagnes de terrain et élevage..... 108

2.3. Publication 4: “Vector competence of *Aedes albopictus* field populations from Reunion Island exposed to local epidemic dengue viruses” 110

2.4. Discussion et perspectives..... 136

3. Compétence vectorielle des populations du Sud Ouest de l’Océan Indien..... 145

3.1. Introduction..... 145

3.2. Présentation des souches virales..... 146

3.2.1. Quelques généralités sur les virus du Chikungunya et du Zika..... 146

3.2.2. Choix des souches virales de DENV, CHIKV et ZIKV pour l’étude..... 148

3.3 Campagnes de terrain et élevage..... 150

3.4. Publication 5: “*Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from the South-Western Indian Ocean experimentally transmit Chikungunya and Dengue-1 viruses but not Asian Zika virus” 151

3.5. Discussion et perspectives..... 175

Conclusion générale.....180

1. Résumé des travaux de la thèse..... 180

2. Epilogue de l’histoire de la dengue à La Réunion.....	184
3. Conclusion.....	187
Références.....	188
Annexes.....	224
1. Publication 6 : “Investigation of Dengue Infection in Asymptomatic Individuals during a Recent Outbreak in La Réunion.”.....	224
2. Publication 7 : “Genomic insights into early SARS-CoV-2 strains isolated in Reunion Island.”.....	242
3. Publication 8 : “Genetic diversity of endosymbiotic bacteria Wolbachia infecting two mosquito species of the genus Eretmapodites occurring in sympatry in the Comoros archipelago.”.	258

Abréviations

Aaa : *Aedes aegypti aegypti*
AAD : antiviraux à action directe
Aaf : *Aedes aegypti formosus*
arboviroses : arthropod borne virose
arbovirus : arthropod borne virus
ARNi : interférence ARN
Bti : *Bacillus thuringiensis israelensis*
CHIKV : virus du chikungunya
CV : capacité vectorielle
CYD-TDV : de l'anglais « Chimeric Yellow Fever 17D virus-Tetravalent Dengue Vaccine »
DCV : C Virus de Drosophila
DENV : virus de la dengue
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane
DF : fièvre à dengue
DFH : dengue à fièvre hémorragique
GABA : acide γ -aminobutyrique
IC : incompatibilité cytoplasmique
L1 à L4 : stades larvaires 1 à 4 des moustiques
LAV : lutte anti-vectorielle
miRNA : microRNA
MLST : typages par séquençages multilocus
MTV : maladie(s) à transmission vectorielle
NS : protéines non-structurales
OMS : Organisation Mondiale de la Santé (ou WHO)
PAMs : peptides antimicrobiens
PAMPs : pathogen-associated molecular patterns
PIE : période d'incubation extrinsèque
piRNA : piwi interacting RNA
protéine C : protéine structurale de la capside
protéine E : protéine structurale de l'enveloppe
protéine prM/M : protéine structurale précurseur de la membrane/de la membrane
PRRs : Pattern-Recognition Receptors
RE : réticulum endoplasmique
RIDL : de l'anglais "Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene"
ROS : espèces réactives à l'oxygène
sRNA : small RNA
siRNA : small interfering RNA
SOOI : Sud-Ouest de l'Océan Indien
TIS : technique de l'insecte stérile
UTR : région non traduite
WNV : virus du Nil Occidental
YFV : virus de la fièvre jaune
ZIKV : virus du Zika

Liste des figures

- Figure 1** : Diversité des interactions hôte-vecteur-pathogène.
- Figure 2** : Pathosystème vectoriel et transmission vectorielle.
- Figure 3** : Liste des animaux les plus meurtriers pour l'Homme.
- Figure 4** : Cycle de vie des moustiques dont les femelles sont anautogènes.
- Figure 5** : Résistance à la dessiccation des œufs de moustiques.
- Figure 6** : Cycle gonotrophique d'une femelle moustique.
- Figure 7** : Séquence de la compétence vectorielle d'un moustique, de l'infection à la transmission.
- Figure 8** : Systèmes de défense des moustiques face à l'infection, la réplication et la dissémination des pathogènes à transmission vectorielle.
- Figure 9** : Distribution de *Wolbachia* dans les tissus somatiques de ses hôtes.
- Figure 10** : Phylogénie des *Wolbachia*.
- Figure 11** : *Wolbachia* parasite de la reproduction et ses différents phénotypes.
- Figure 12** : Incompatibilité cytoplasmique uni- et bidirectionnelle entre des moustiques mâles et femelles infectés par des souches différentes de *Wolbachia*.
- Figure 13** : Co-localisation des bactéries *Wolbachia* et du CHIKV au sein des cellules des moustiques *Ae. albopictus*.
- Figure 14** : Inhibition de la réplication du DENV-2 induite par les *Wolbachia wAlbB* de façon densité-dépendante dans les lignées cellulaires Aa23 d'*Ae. albopictus*.
- Figure 15** : Co-circulation des sérotypes de DENV de 1943 à 2013.
- Figure 16** : Évolution de la répartition mondiale de la dengue et de son vecteur principal *Ae. Aegypti*.
- Figure 17** : Zones à risque de dengue en 2020.
- Figure 18** : Charge globale de la dengue en 2010.
- Figure 19** : Profils dose-réponse par catégorie de maladie.
- Figure 20** : Liste des vaccins contre la dengue selon leur phase de tests préclinique ou clinique en 2020.
- Figure 21** : Méthode de paratransgénèse dans la lutte contre la dengue utilisant la transinfection de la bactérie *Wolbachia* au sein des moustiques vecteurs.
- Figure 22** : Organisation structurale du virion et du génome viral de la dengue.
- Figure 23** : Arbre phylogénétique des souches DENV des 4 sérotypes, dérivé des cadres de lecture ouverts complets disponibles dans la bibliothèque GenBank.
- Figure 24** : Cycle de réplication du virus de la dengue.
- Figure 25** : Prédiction de la distribution d'*Ae. aegypti* au niveau mondial.
- Figure 26** : Représentation géographique de la propagation mondiale d'*Aedes albopictus* mettant en évidence l'ascendance commune des différentes lignées dérivées de ces moustiques.
- Figure 27** : Limite hivernale de la répartition des d'*Aedes albopictus* à La Réunion.

Liste des tableaux

- Tableau 1** : Épidémies de type dengue-like au travers le monde du XVII^{ème} à la première moitié du XX^{ème} siècle.
- Tableau 2** : Mutations non-synonymes entre les souches réunionnaises de DENV-2 EVAg et DENV-2 JUL.

Introduction générale

La symbiose, étymologiquement « la vie ensemble », est un terme dont le sens biologique génère des controverses entre scientifiques depuis sa création par Anton de Bary en 1879 (Martin and Schwab 2012). Aujourd'hui la définition consensuelle de la symbiose en biologie est, une interaction étroite et durable entre organismes hétérospécifiques. Les symbioses peuvent être catégorisées selon la balance coûts/bénéfices perçue par chaque organisme impliqué dans l'interaction. Ces catégories sont si diversifiées qu'elles forment un continuum allant du mutualisme, dont la balance est majoritairement bénéfique pour les organismes en interaction, à son antipode, le parasitisme, dans lequel l'organisme parasite tire bénéfice de l'organisme hôte au détriment de ce dernier. À mi-chemin entre ces deux extrêmes, se trouve le commensalisme, avec des bénéfices perçus par l'un des organismes de l'interaction sans coût mesurable pour le second. Le mode de vie parasitaire a pour sa part été adopté par des organismes très différents se distribuant dans l'ensemble des règnes du vivant. Aucun de ces règnes n'étant non plus épargné par ce mode de vie, puisque tous abritent des organismes endossant le coûteux rôle d'hôte. Le mode de vie parasitaire regorge donc d'une multiplicité d'interactions et de mécanismes d'adaptation associés à celles-ci.

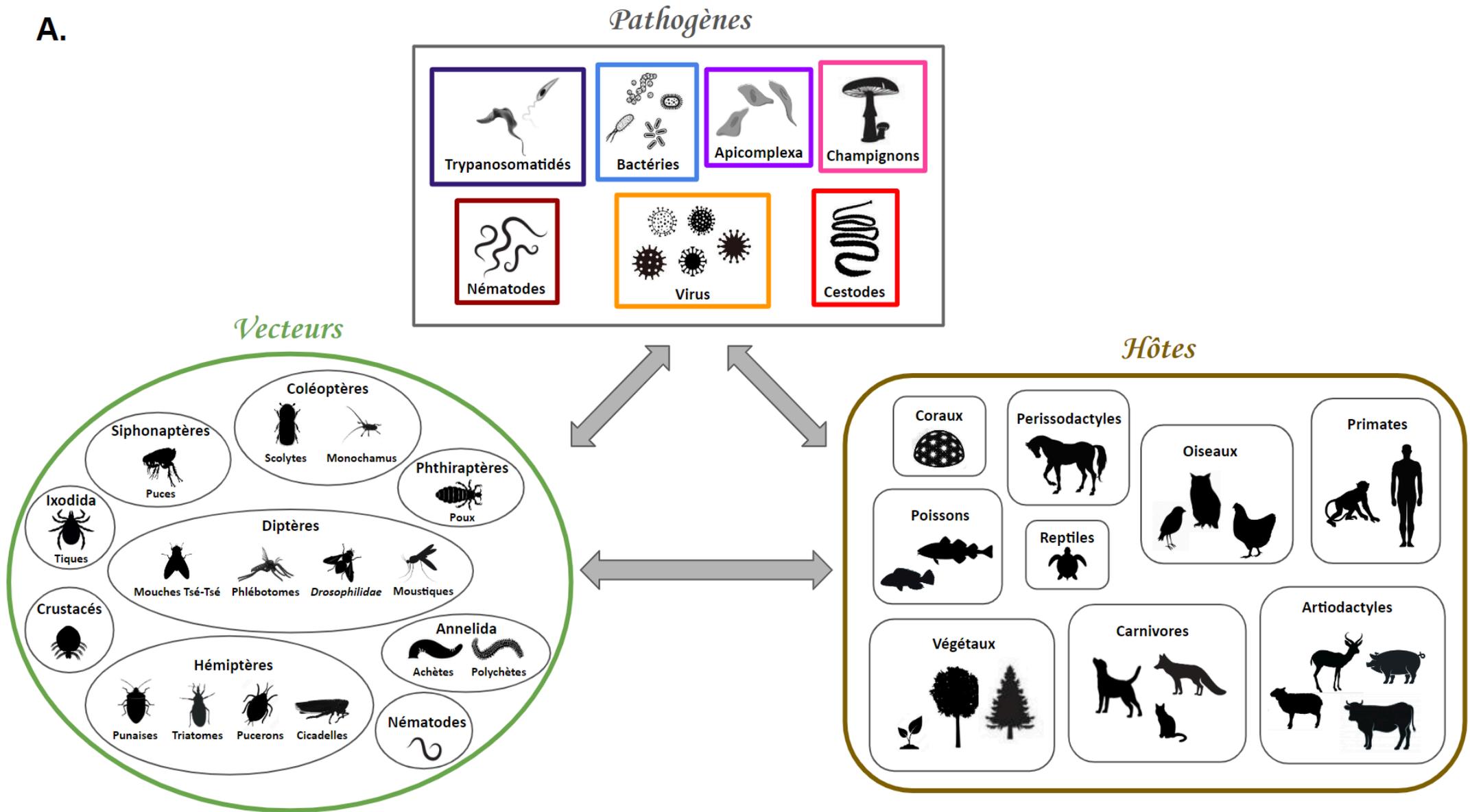
Les interactions parasitaires, malgré leur grande diversité, sont soumises à des contraintes communes que Claude Combes (Combes 2001) a conceptualisées en utilisant deux filtres, dont l'ouverture conjointe conditionne l'établissement du cycle parasitaire. L'ouverture du premier filtre, dit « de rencontre », rend compte de la nécessité de co-localisation spatiale (contrainte de biocénose) et temporelle (contrainte éthologique) des pathogènes et de leurs hôtes. Le filtre de compatibilité dont l'ouverture est conditionnée, comme son nom l'indique, par la compatibilité entre hôte(s) et pathogène(s), représente une deuxième contrainte incontournable. D'une part, les ressources que le parasite puise chez l'hôte doivent pouvoir contenter l'ensemble des besoins nécessaires à son développement (angle d'exigence métabolique/de ressources). D'autre part, le parasite doit être apte à se développer au sein de l'environnement-hôte malgré les systèmes de défense de celui-ci (angle d'évasion immunitaire). Le degré d'ouverture de ces filtres n'est pas un paramètre figé. Il peut évoluer dans le temps, notamment suite à des introductions/extinctions d'espèces hôtes, réservoirs ou parasites (Ogden et al. 2019; Talapko et al. 2019; Meissner et al. 2022), à des modifications comportementales (Woolhouse 2006; Ezenwa et al. 2016), à des évolutions génétiques chez les partenaires biologiques impliqués dans une interaction (Vazeille et al. 2007; Sekhwal et al. 2015; Goubert et al. 2017; Grunwald et al. 2022), ou encore à des modifications environnementales et biologiques (Daszak et al. 2001; Frentiu et al. 2014; Hawaria et al. 2020). En d'autres termes, l'interaction parasitaire est tributaire de l'ensemble des variables susceptibles de modifier la probabilité de rencontre ou la compatibilité entre hôtes et parasites.

Parmi les interactions parasitaires, les maladies à transmission vectorielle (MTV) sont les conséquences symptomatiques d'infections par des bactéries, virus, champignons et parasites (stricto sensu: protozoaires, nématodes) véhiculés entre les hôtes par l'intermédiaire d'un hôte hétérospécifique: le vecteur. Les contraintes sont grandes pour la mise en place de ces cycles parasitaires à transmission vectorielle. En effet, l'ouverture conjointe des filtres de rencontre et de compatibilité précédemment décrits dépend de trois organismes hétérospécifiques, dont un organisme pathogène (i.e. organisme parasites *lato sensus* responsables de maladies infectieuses) et deux hôtes très différents. Ces derniers doivent se rencontrer, se transmettre le

pathogène, et assurer tous deux, aussi différents soient-ils, le développement dudit pathogène. Les vecteurs sont la plupart du temps des insectes piqueurs-suceurs (Figure 1) qui transmettent les pathogènes à un hôte hétérospecificque lors d'un repas pris sur celui-ci. Malgré ces contraintes, ce mode de transmission est répandu dans le monde du parasitisme, comme en témoigne la grande diversité d'associations hôte-vecteur-pathogène (Figure 1). En outre, les MTV représentent, à elles seules, plus de 17% des maladies infectieuses humaines. Elles constituent un enjeu majeur de santé publique avec plus d'un million de décès chaque année, et près d'1/7ème de la population mondiale touchée (WHO 2020a). Les arthropodes, et plus particulièrement les moustiques, sont les vecteurs principaux des MTV humaines les plus importantes. Étudier les interactions entre les différents organismes impliqués dans ces symbioses parasitaires à transmission vectorielle, notamment les MTV humaines transmises par les moustiques vecteurs, est la première étape permettant de comprendre les épidémies, d'identifier les mécanismes de propagation et, à terme, de pouvoir en limiter les conséquences voire même de les éradiquer.

Les îles habitées de la région du Sud-Ouest de l'Océan Indien (SOOI) situées au sein de la ceinture tropicale représentent un terrain d'étude propice aux études de telles interactions. Il s'agit de Madagascar, de l'archipel des Mascareignes, avec La Réunion, Maurice et Rodrigues, de l'archipel des Comores, avec Grande Comore, Mohéli, Anjouan et Mayotte, et de l'archipel des Seychelles (voir carte dans [Publication 1](#)). Afin de faire face à leur isolement géographique, les écosystèmes insulaires entretiennent des échanges aériens et maritimes importants entre eux et avec les continents, fournissant des conditions propices pour observer et différencier la transmission locale de pathogènes au sein d'une île, de celle régionale entre îles, voire même de celle intercontinentale (Tortosa et al. 2012). C'est le cas de La Réunion, une île volcanique française qui est profondément marquée par sa dimension multiculturelle, entretenant des liens socio-économiques intenses avec les autres îles du SOOI, telles que les Seychelles, Madagascar, Mayotte, ou encore les Comores, mais également avec des pays continentaux d'Europe et d'Asie. Les spécificités de certains de ces écosystèmes insulaires, en termes d'isolement géographique, d'aire limitée, et de diversité limitée en espèces vectrices ou réservoirs, les rendent également adaptés au décryptage plus fin des interactions hôte-vecteur-pathogène dans ces cycles de transmission singuliers alternant hôte vertébré et vecteur arthropode (Tortosa et al. 2012). En effet, les îles du SOOI abritent des moustiques vecteurs de MTV humaines, dont la distribution et la densité sont favorisées par les climats tropicaux (Delatte, Dehecq, et al. 2008; Delatte et al. 2009; Boussès et al. 2018). Elles font de ce fait fréquemment face à des épidémies de MTV transmises par des moustiques vecteurs, tels que le paludisme, le Chikungunya, la fièvre de la vallée du Rift, ou encore la dengue (Tchen et al. 2006; Delatte, Dehecq, et al. 2008; D'Ortenzio et al. 2011; Balenghien et al. 2013). Les îles du SOOI représentent donc un terrain pertinent pour l'étude des interactions hôte-vecteur-pathogène et pour la compréhension de l'épidémiologie des MTV. Cela est d'autant plus vrai depuis quelques années dans certaines îles du SOOI, notamment à La Réunion, où les épidémies de dengue connaissent une augmentation de leur fréquence, de leur durée et de la sévérité de la maladie (Hafsia et al. 2022). En effet, l'île de La Réunion fait face à une épidémie ininterrompue de dengue depuis 2017 avec plus de 72 276 cas biologiquement recensés par l'Agence Régionale de Santé Réunion, dont 2 823 hospitalisations, plus de 550 cas sévères, et 77 décès à déplorer (Hafsia et al. 2022; Santé Publique France 2024a).

A.



B.	Hôtes	Pathogènes	Vecteurs	Références
*	<i>Poissons</i> (<i>Oreochromis niloticus</i>)	- <i>Trypanosomatidés</i> (<i>Trypanosoma mukasai</i>)	- <i>Achètes</i> (<i>Batracobdelloides tricarinata</i>)	Negm-Eldin et Davies, 1999
*	<i>Végétaux</i> (<i>Cocos nucifera</i>)	- <i>Trypanosomatidés</i> (<i>Phytomonas staheli</i>)	- <i>Punaises</i> (<i>Lincus lobuliger</i>)	da Cunha et al., 2010
*	<i>Carnivores</i> (<i>Felis catus domesticus</i>)	- <i>Trypanosomatidés</i> (<i>Leishmania infantum</i>)	- <i>Phlébotomes</i> (<i>Phlebotomus perniciosus</i>)	Maroli et al., 2007
*	<i>Oiseaux</i> (<i>Passer domesticus</i>)	- <i>Apicomplexa</i> (<i>Plasmodium relictum</i>)	- <i>Moustiques</i> (<i>Culex quinquefasciatus</i>)	Box, 1966 ; Atkinson et Samuel, 2010
*	<i>Perissodactyles</i> (<i>Equus caballus</i>)	- <i>Apicomplexa</i> (<i>Theileria equi</i>)	- <i>Tiques</i> (<i>Dermacentor nuttalli</i>)	Battsetseg et al., 2001 ; Malekifard et al., 2014
*	<i>Végétaux</i> (<i>Ulmus sp.</i>)	- <i>Champignons</i> (<i>Ophiostoma novo-ulmi</i>)	- <i>Coléoptères</i> (<i>Scolytus scolytus</i>)	Brasier et Webber, 2019
*	<i>Carnivores</i> (<i>Vulpes vulpes</i>)	- <i>Nématodes</i> (<i>Thelazia callipaeda</i>)	- <i>Drosophilidae</i> (<i>Phortica variegata</i>)	Otranto et al., 2009
*	<i>Poissons</i> (<i>Cyprinus carpio</i>)	- <i>Nématodes</i> (<i>Skrjabillanus scardinli</i>)	- <i>Crustacés</i> (<i>Argulus foliaceus</i>)	Tikhomirova , 1970 ; Hadfield et Smit, 2019
*	<i>Végétaux</i> (famille des <i>Poacées</i>)	- <i>Bactérie</i> (Phytoplasme de l'Aster Jaune)	- <i>Cicadelles</i> (<i>Macrostelus quadrilineatus</i>)	Olivier et al., 2012
*	<i>Coraux</i> (<i>Oculina patagonica</i>)	- <i>Bactérie</i> (<i>Vibrio shiloi</i>)	- <i>Polychètes</i> (<i>Hermodice carunculata</i>)	Sussman et al., 2003
*	<i>Primates</i> (<i>Homo sapiens sapiens</i>)	- <i>Bactérie</i> (<i>Bartonella quintana</i>)	- <i>Poux</i> (<i>Pediculus humanus</i>)	CDC, 2022
*	<i>Carnivores</i> (<i>Canis lupus familiaris</i>)	- <i>Cestodes</i> (<i>Dipylidium caninum</i>)	- <i>Puces</i> (<i>Ctenocephalides spp.</i>)	CDC, 2019
*	<i>Reptiles</i> (<i>Chelonia midas</i>)	- <i>Virus</i> (Herpèsvirus de la tortue associé au fibropapillome)	- <i>Achètes</i> (<i>Ozobranchus sp.</i>)	Greenblatt et al., 2004
*	<i>Artiodactyles</i> (<i>Phacochoerus africanus</i>)	- <i>Virus</i> (Virus de la Peste Porcine Africaine)	- <i>Tiques</i> (<i>Ornithodoros moubata</i>)	Dixon et al., 2019
*	<i>Végétaux</i> (<i>Vitis vinifera</i>)	- <i>Virus</i> (Virus des feuilles en palmettes de la vigne)	- <i>Nématodes</i> (<i>Xiphinema index</i>)	Taylor et Raski, 1964
*	<i>Primates</i> (<i>Erythrocebus patas</i>)	- <i>Virus</i> (Virus du ZIKA)	- <i>Moustiques</i> (<i>Aedes luteocephalus</i>)	Boyer et al., 2018

Figure 1 : Diversité des interactions hôte-vecteur-pathogène. La figure illustre de façon non exhaustive la grande diversité des interactions hôte-vecteur-pathogène. D'une part, elle présente les principaux hôtes, vecteurs, et pathogènes connus pour être impliqués dans ce type d'interaction (A.), et d'autre part elle dresse une liste d'exemples concrets de ces interactions (B.) (Negm-Eldin and Davies 1999; da Cunha et al. 2010; Maroli et al. 2007; Box 1966; Battsetseg et al. 2001; Malekifard et al. 2014; Brasier and Webber 2019; Otranto et al. 2009; Tikhomirova 1970; Hadfield and Smit 2019; Sussman et al. 2003; Greenblatt et al. 2004; Dixon et al. 2019; Taylor and Raski 1964; Boyer et al. 2018; C. of D.C. CDC 2022; CDC - DPDx - Dicrocoeliasis 2019; Atkinson and Samuel 2010; Olivier et al. 2011)

Au vu de l'historique épidémiologique de la dengue à La Réunion, l'ouverture conjointe des filtres de rencontre et de compatibilité entre humains, moustiques *Aedes albopictus* (dits moustiques tigres, uniques vecteurs incriminés sur l'île), et virus de la dengue (DENV) ne fait aucun doute d'un point de vue empirique. L'ouverture du filtre de rencontre a été confirmée par la détection d'une même souche de DENV de sérotype 1 (DENV-1) dans des pools d'*Ae. albopictus* de terrain et dans le sérum de patients lors d'une micro-épidémie de dengue en 2004 à La Réunion (Pierre et al. 2005). Pour le filtre de compatibilité, les résultats précédemment obtenus pour La Réunion sont plus contrastés. Certaines études vont dans le sens d'un filtre de compatibilité ouvert, avec des moustiques *Ae. albopictus* pouvant s'infecter et transmettre le DENV (Paupy et al. 2001; Vazeille et al. 2010). Au contraire, les résultats d'une autre étude suggèrent une ouverture plus limitée de ce filtre, avec des moustiques tigres dont la compétence à transmettre le DENV est compromise du fait de leur infection naturelle par la bactérie endosymbiotique *Wolbachia* (Mousson et al. 2012). Cependant, aucune de ces études n'utilise à la fois des souches virales de DENV locales et des moustiques tigres d'origine réunionnaise récemment échantillonnés sur le terrain, éloignant ainsi les résultats obtenus en conditions contrôlées de la réalité du terrain. Il apparaît ainsi clairement que l'étude du filtre de compatibilité reste à approfondir, tant pour mesurer son degré d'ouverture, que pour étudier les paramètres qui l'influencent, notamment les interactions entre moustique, DENV, et *Wolbachia*. Ces études permettraient d'affiner la compréhension du patron épidémiologique singulier de la dengue à La Réunion. Au vu de la situation géographique de La Réunion, étudier l'ouverture de ce filtre de compatibilité dans les autres îles du SOOI permettrait également d'apprécier les risques de propagation de la dengue et d'autres MTV d'intérêt médical dans l'ensemble de la région. Le but de telles études est de cerner plus justement les enjeux de santé publique présents et à venir en lien avec certaines MTV au sein du SOOI, notamment en ce qui concerne la dengue actuellement en plein essor dans la région, et particulièrement à La Réunion.

Dans ce contexte, l'objectif du travail de thèse était d'explorer la compatibilité entre DENV locaux et populations réunionnaises de moustique tigre, avec un focus sur les effets de la densité de *Wolbachia* sur le DENV *in insecta*. Il a également été question d'examiner la compétence des *Ae. albopictus* et *Aedes aegypti* des îles du SOOI à transmettre divers arbovirus d'intérêt médical. L'hypothèse générale de ces travaux étant que les interactions multipartites entre les différents protagonistes du cycle parasitaire définissent la trajectoire et le devenir des épidémies. Afin de rendre compte de ce travail, la première partie de ce manuscrit est dédiée à une synthèse bibliographique permettant de définir le pathosystème vectoriel, de décrire *Wolbachia* et son influence sur ce pathosystème vectoriel, ainsi que de présenter spécifiquement les différents modèles et contextes biologiques de ces travaux de thèse. Dans un second temps, les travaux de recherches sont exposés selon trois axes principaux, à savoir (i) une description des souches de DENV circulant à La Réunion, et (ii) la mesure de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. albopictus* de La Réunion vis-à-vis des souches locales de DENV, et (iii) la mesure de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. albopictus* et d'*Ae. aegypti* de la zone du SOOI quant à la transmission des virus de la dengue, du Chikungunya et du Zika. Un résumé des résultats des travaux de thèse et un épilogue sur l'histoire de la dengue à La Réunion concluent ce manuscrit.

Synthèse bibliographique

1. Pathosystème et moustiques vecteurs

1.1. Généralités sur les pathosystèmes vectoriels

1.1.1. Pathosystème et mode de vie parasitaire

Un pathosystème représente l'ensemble des différents acteurs intervenant dans le cycle de vie et de développement d'un parasite *lato sensu* dans un environnement donné. Il s'agit du parasite lui-même, de son ou ses hôtes, ainsi que des interactions directes ou indirectes entre eux et avec le milieu où ils évoluent. Le pathosystème constitue un sous-ensemble de l'écosystème dans lequel il se trouve, les interactions qui s'y déroulent sont de ce fait dépendantes des conditions biotiques et abiotiques de ce plus large ensemble qu'est l'écosystème. Sont qualifiés de parasites tous les organismes qui ont un mode de vie parasitaire et les virus. Le mode de vie parasitaire signifie que pour leur développement, leur reproduction, ou encore leur transmission, les parasites tirent profit de leurs hôtes, au détriment de ces derniers. Le parasitisme est dit obligatoire si le parasite doit impérativement avoir un hôte pour achever son cycle, dans le cas contraire il est dit facultatif. Certaines relations symbiotiques mutualistes peuvent notamment basculer vers une relation hôte-parasite si l'un des deux partenaires est affaibli ou si l'un prend le dessus sur l'autre, comme certaines bactéries mutualistes du microbiote intestinal humain par exemple (Hooper et al. 2012). Les cycles parasitaires peuvent être plus ou moins complexes et faire intervenir un ou plusieurs hôtes. Les ressources détournées par les parasites sont très diverses. Certains vont par exemple soutirer de l'eau ou des substances nutritives à leur hôte (Ruiz-L and Madrid-V 1992; Ahmad et al. 2017), d'autres vont accaparer les soins parentaux (Sato et al. 1986; Schulze-Hagen et al. 2009), se servir de leur hôte comme d'un support physique nécessaire au succès de leur développement (Putz and Holbrook 1986), et d'autres encore vont utiliser la machinerie et/ou les ressources cellulaires de leur hôte pour leur développement. Cependant, avant de pouvoir détourner les ressources de leurs hôtes quelles qu'elles soient, les parasites doivent atteindre ces hôtes et les infecter. Rentre alors en jeu la notion de transmission des parasites.

1.1.2. Transmission et vection

La vie des parasites obligatoires dépend entièrement de leurs hôtes. En effet, pour réaliser leur cycle de vie et assurer leur descendance, les parasites doivent être transmis d'un hôte infecté à un hôte susceptible. Certains parasites se transmettent des parents à la descendance, la transmission est alors dite verticale. C'est notamment le cas du virus de la diarrhée virale bovine se transmettant de la vache au fœtus par franchissement de la barrière placentaire, et qui peut causer de lourdes pertes économiques dans les élevages (Lindberg 2003). D'autres parasites sont transmis via l'environnement de l'hôte, dite transmission horizontale. Cela comprend toutes les transmissions par contact entre

individus, avec des milieux et surfaces contaminés, ou encore celles qui se font par l'utilisation de la chaîne trophique pour se transmettre. Il existe également des parasites usant de stratagèmes exceptionnels pour parvenir à leur fin, telle que la manipulation de la reproduction ou du comportement de leurs hôtes. Dans le premier cas, les parasites vont manipuler la reproduction de leur hôte (diminution de la survie de la descendance non infectée, modification du type de reproduction, ...) afin de s'assurer un meilleur taux de transmission dans la population. C'est notamment le cas de la bactérie intracellulaire *Wolbachia* chez de très nombreux arthropodes et nématodes (Werren et al. 2008). Dans le second cas, la manipulation du comportement des hôtes infectés permet à certains parasites d'atteindre leur prochain milieu de vie ou prochain hôte. Par exemple, le plathelminthe *Dicrocoelium dendriticum* manipule le comportement de son hôte fourmis afin de se transmettre plus facilement à son hôte bovin suivant (Otranto and Traversa 2003; Martín-Vega et al. 2018). Pour finir, certains parasites ne vont s'appuyer sur l'éthologie de leur hôte pour se transmettre, sans nécessairement les manipuler. C'est le cas des parasites à transmission vectorielle où l'hôte utilisé comme moyen de transport est qualifié d'hôte vecteur. Celui-ci recherche activement l'hôte suivant et ce, pour effectuer son propre cycle de développement. Le vecteur transporte ainsi directement le parasite vers l'hôte suivant.

La transmission vectorielle a été décrite pour la première en 1878 par Patrick Manson avec le filaire *Wuchereria bancrofti* transmis à l'homme par les moustiques *Culex fatigans* (Chernin 1983), et plusieurs types de transmission vectorielle et de vecteurs ont depuis été découverts. Seuls les vecteurs arthropodes hématophages seront étudiés dans la suite de ce manuscrit. Tout d'abord, la transmission passive est un événement très rare et fortement lié au hasard. Si un arthropode a des extrémités contaminées par des parasites, comme les pattes d'une mouche avec des champignons par exemple, et qu'il se pose sur un animal ou sur les plaies d'un animal, il peut alors lui transmettre de façon passive ce parasite (Kamyszek 1968). A cette transmission passive s'oppose celle dite active et pour laquelle deux modes de transmission existent, l'un mécanique et l'autre biologique. Tous deux ont pour point commun l'utilisation d'un vecteur arthropode hématophage qui de par son régime alimentaire assure la transmission du parasite d'un hôte à un autre. Un taon qui effectue deux repas sanguins successifs, le premier sur un bovin infecté par des trypanosomes et le second sur un bovin sain, peut transmettre quelques parasites au second par simple transfert mécanique du fait de son proboscis contaminé lors du premier repas (Desquesnes and Dia 2004). Ce mode de transmission mécanique active reste tout à fait sporadique. Pour ce qui est de la transmission vectorielle biologique active, le parasite doit infecter le vecteur et se développer en son sein avant d'être transmis de nouveau à un autre hôte du cycle. Le vecteur est dans ce cas un hôte à part entière du cycle de vie du parasite, et peut alors avoir différents statuts: sain, infecté, ou infectant. Le pathosystème est alors qualifié de pathosystème vectoriel et comprend: le parasite, le vecteur, et l'hôte (Figure 2). Dans la suite du manuscrit, lorsque la transmission vectorielle sera énoncée, il s'agira uniquement de transmission vectorielle biologique active réalisée par un vecteur arthropode hématophage.

Ecosystème

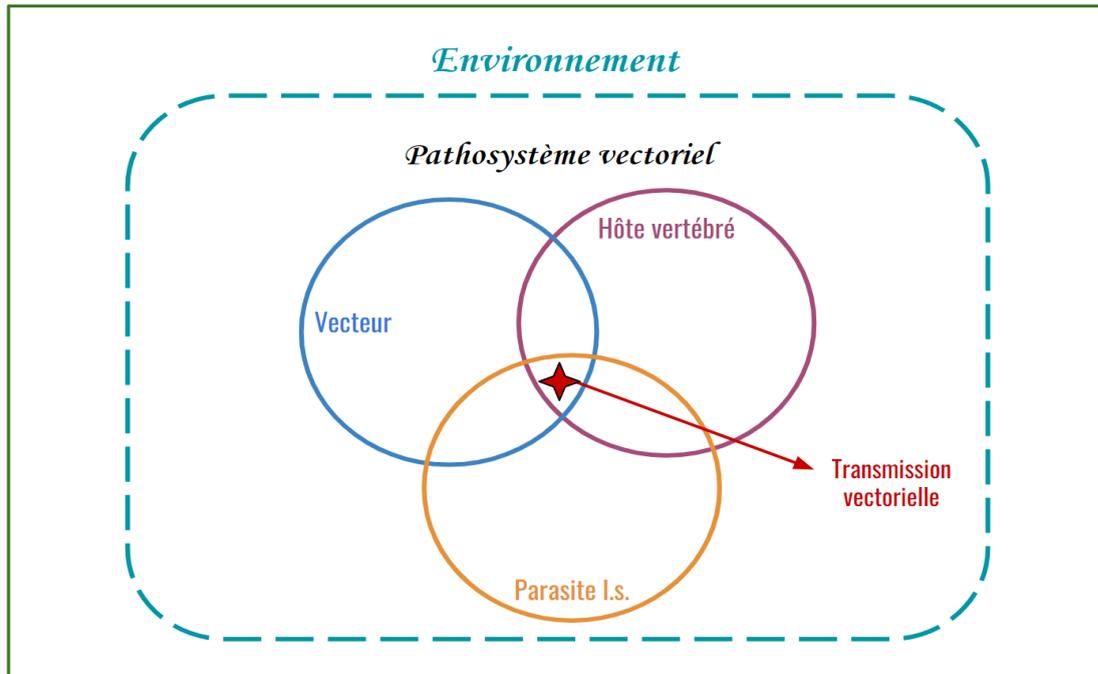


Figure 2 : Pathosystème vectoriel et transmission vectorielle d'un parasite lato sensu dans un environnement donné. Le pathosystème vectoriel est un sous-ensemble de l'écosystème dans lequel se jouent ces interactions entre hôte vertébré, vecteur et parasite.

Il est intéressant de noter que dans le but d'augmenter la fréquence de contact entre le vecteur et l'hôte vertébré, ces parasites à transmission vectorielle ne sont pas en reste en ce qui concerne la manipulation de leurs hôtes (Schwartz and Koella 2001). Une appétence plus importante pour les repas sanguins a par exemple été observée chez des phlébotomes infectés par des parasites du genre *Leishmania* sp., avec un taux de piqûre plus élevé, et donc potentiellement plus de transmission du parasite (Jefferies et al. 1986). Le virus de la dengue (DENV), quant à lui, a une double action. D'un côté, il rend les moustiques plus maladroits dans la localisation et la perforation des vaisseaux sanguins lors de leurs repas, ce qui a pour conséquence d'augmenter le nombre de piqûres et le nombre d'hôtes vertébrés nécessaires à une prise de sang complète, favorisant ainsi sa transmission (Wei Xiang et al. 2022). Par ailleurs, l'infection par le DENV peut également modifier le microbiote de la peau de l'hôte vertébré qui attire alors de façon plus importante les moustiques, ce qui favorise la transmission du virus aux moustiques cette fois-ci (Zhang et al. 2022).

Les vecteurs sont responsables de la transmission de nombreux pathogènes chez l'Homme et les animaux, causant des épidémies aux lourdes conséquences économiques et de santé publique. Parmi eux, les moustiques sont sans nul doute les vecteurs les plus tristement célèbres. Et pour cause, outre la nuisance de l'irritation qu'ils induisent par leurs piqûres, les moustiques sont les animaux les plus meurtriers pour l'Homme (Figure 3). Ils sont responsables de plus d'un million de morts par an (WHO 2020a), loin devant les autres vecteurs (Figure 3). Mais comment de si petits animaux peuvent causer autant de dégâts ? Qui sont-ils et pourquoi sont-ils de si bons vecteurs ?

Les animaux les plus meurtriers du monde

Nombre de personnes tuées par des animaux, 2015

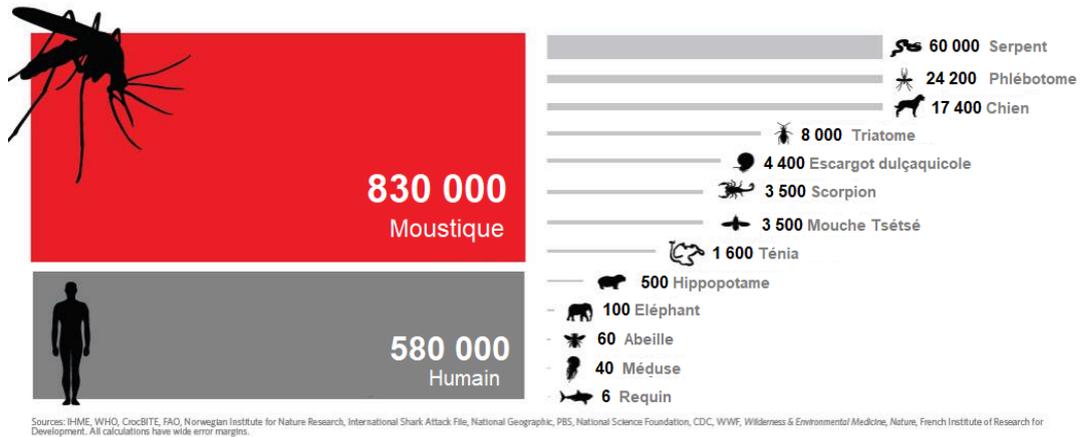


Figure 3 : Liste des animaux les plus meurtriers pour l'Homme au monde avec les estimations du nombre de morts dues à chacun pour l'année 2015. Figure traduite à partir de l'image réalisée par la Fondation Bill-et-Melinda-Gates et extraite de <https://pbs.twimg.com/media/CufaC0vXEAA-JMg.jpg>.

1.1.3. Les moustiques vecteurs : qui sont-ils ?

Les moustiques sont des insectes de l'ordre des Diptères de la famille des *Culicidae*. Les données de 2008 mentionnent l'existence de 3 614 espèces de moustiques répartis en deux sous-familles: *Anophelinae* qui comprend 3 genres d'une part, et *Culicinae* avec 110 genres (site web: <https://mosquito-taxonomic-inventory.com>). Les moustiques sont des insectes holométaboles, c'est-à-dire des insectes dont la métamorphose de l'œuf à l'adulte est complète. Cette transformation se fait progressivement au cours de quatre stades de vie: l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte (Service 1993; Carnevale and Robert 2009) (Figure 4).

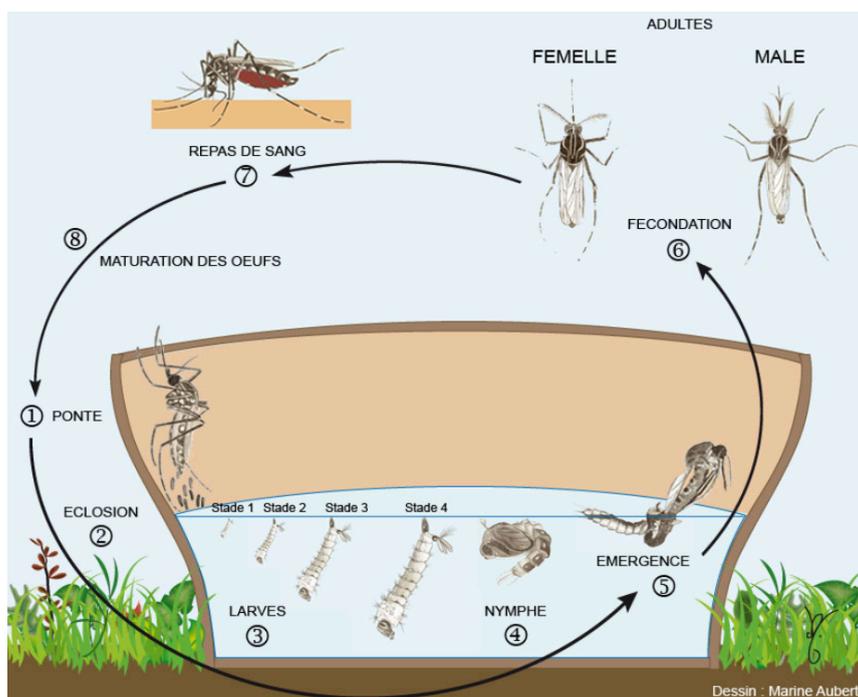


Figure 4 : Cycle de vie des moustiques dont les femelles sont anautogènes. Figure extraite de <http://www.institutpasteur.nc/les-moustiques-et-la-dengue/>.

Les œufs des moustiques, d'un demi à un mm de long, sont pondus à l'interface air/eau ou proche d'un point d'eau sur un substrat humide, dans un endroit qui peut soit entrer en contact avec l'eau soit être entièrement submergé par celle-ci. Après la ponte, les œufs deviennent résistants à la dessiccation, résistance dont l'intensité et la durée dépendent de l'espèce (Farnesi et al. 2015; Farnesi et al. 2017) (Figure 5). Au contact de l'eau, et une fois le développement embryonnaire fini, les œufs éclosent en larves (Figure 4).

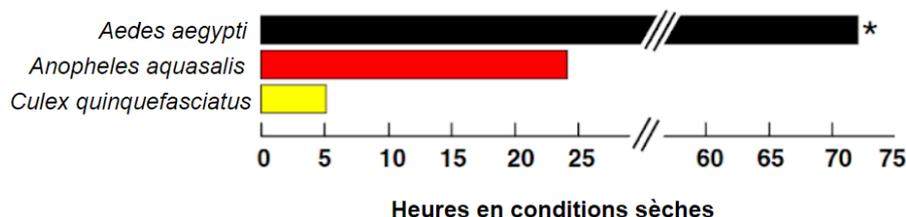


Figure 5 : Résistance à la dessiccation des œufs de moustiques. Le graphique, traduit de Farnesi et al., 2015, présente la résistance à la dessiccation des œufs de trois espèces de moustiques placés en conditions sèches après avoir complété 80% de leur embryogenèse. Les barres indiquent les périodes les plus longues pendant lesquelles les œufs présentent une viabilité importante. * = a minima.

Les moustiques connaissent quatre stades de développement larvaires aquatiques distincts qu'ils atteignent par transformations et mues successives, allant du stade L1 d'un à deux mm et faisant directement suite à l'éclosion, jusqu'au stade L4 d'un à deux cm (Figure 4). Les larves se composent toutes d'une tête, d'un thorax et d'un abdomen segmenté (Figure 4). Elles sont pour la plupart détritivores et filtreuses, certaines pouvant être prédatrices (Merritt et al. 1992), et respirent à l'aide d'un syphon respiratoire (ou d'un spiracle selon l'espèce) porté par les derniers segments de l'abdomen et affleurant la surface.

Puis, intervient la nymphose qui est la métamorphose du stade L4 en puppe, appelée aussi nymphe (Figure 4). Celle-ci, courbée en avant, comprend deux parties: le céphalothorax, surmonté dans sa partie dorsale de deux trompettes respiratoires, et l'abdomen segmenté terminé par deux palettes natatoires caudales (Figure 4). Les nymphes ne se nourrissent pas et entament leur dernière métamorphose qui dure en moyenne un à deux jours. Une fois celle-ci achevée, le tégument de la nymphe s'ouvre par une fente dorsale longitudinale à la surface de l'eau. L'adulte ailé, ou imago, s'extrait de l'exuvie nymphale et fait sécher ses ailes en restant posé à la surface de l'eau avant de prendre son premier envol. Son milieu de vie est désormais le milieu aérien/terrestre (Figure 4).

Le corps des moustiques adultes est divisé en trois parties : une tête, un thorax et un long abdomen (Figure 4). La tête porte les yeux composés et les antennes qui sont des organes sensoriels (Montell and Zwiebel 2016), et les pièces buccales adaptées en appareil suceur ou piqueur-suceur selon l'espèce, appelé proboscis (Burkett-Cadena 2019). Ce dernier possède deux canaux dont un salivaire qui permet d'excréter la salive, et l'autre alimentaire qui permet d'ingérer les repas. Le thorax porte les appareils locomoteurs et abrite, dans sa partie antérieure, les glandes salivaires du moustique. L'abdomen abrite, quant à lui, une partie du système digestif avec le jabot, l'estomac, l'intestin et le rectum. Pour finir, le système circulatoire des moustiques adultes est constitué d'une cavité générale, l'hémocoèle, contenant l'hémolymphe qui est un liquide incolore dans lequel baignent les organes, les substances nutritives et les déchets découlant de leur utilisation, ainsi que certaines cellules immunitaires, les hémocytes (Wirkner et al. 2013).

Peu après leur émergence, les moustiques femelles adultes s'accouplent pour l'unique fois de leur vie. Elles stockent le sperme dans les spermathèques, organes dans lesquels les femelles puisent pour féconder leurs œufs avant chaque ponte, ou oviposition. Ainsi, bien qu'elles n'aient été fécondées qu'une fois, les femelles peuvent pondre à plusieurs reprises au cours de leur vie. Chaque oviposition compte approximativement de 10 à 200 œufs selon l'espèce et les ressources disponibles pour le développement des œufs chez la femelle. Les adultes se nourrissent de sucS végétaux. Mais, les femelles de certaines espèces, dont les *Anopheles*, les *Culex*, et les *Aedes*, sont anautogènes. Elles doivent compléter ce régime sucré par des repas de sang pour la maturation des œufs avant chaque ponte, d'où un proboscis piqueur-suceur. La spécificité d'hôtes pour ces repas de sang dépend de l'espèce, certaines piquant uniquement les oiseaux ou les mammifères par exemple (Service 1970; Tempelis et al. 1976), et d'autres étant plus opportunistes (Delatte et al. 2010). La succession d'événements entre deux repas sanguins est appelée cycle gonotrophique et comporte trois phases (Beklemishev 1940). La première est la recherche d'un hôte pour la prise du repas sanguin et le repas en lui-même, la seconde est la digestion du sang et la maturation des œufs, et la troisième est la recherche d'un site de ponte et l'oviposition (Figure 6). Ce cycle peut durer de deux à huit jours en fonction, entre autres, de l'espèce de moustiques, des conditions climatiques, ou encore du nombre de cycles gonotrophiques déjà effectués par la femelle (Mala et al. 2014). La digestion du sang peut notamment être plus rapide dans les zones tropicales que dans les zones tempérées, mais aussi plus rapide en saison sèche qu'en saison humide dans une zone tropicale (Service 1993; Mala et al. 2014).

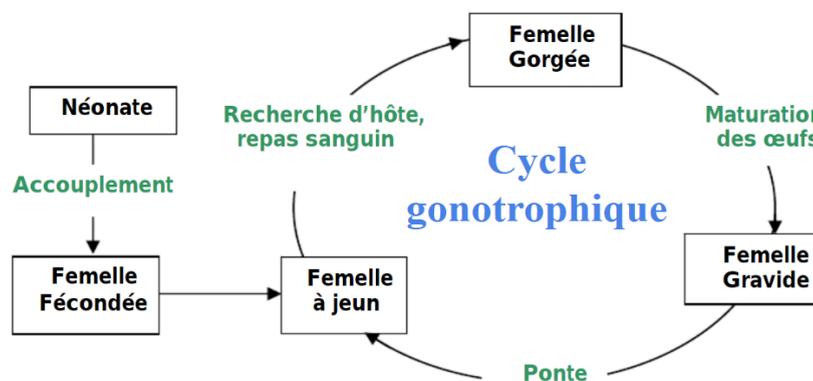


Figure 6 : Cycle gonotrophique d'une femelle moustique. Figure extraite et modifiée à partir de Pradel, 2006.

1.1.4. Les moustiques vecteurs : de leur alimentation dépend la vection.

De cette nécessité de repas sanguins chez les femelles anautogènes provient le problème de la transmission des MTV, ces femelles jouant le rôle de vecteur biologique de l'agent étiologique de la maladie, le transportant activement d'un individu infecté à un individu sain lors de ses repas de sang. Le moustique s'infecte avec le pathogène en prenant un repas sanguin sur un hôte infecté, pathogène se développant ensuite au sein du moustique jusqu'à atteindre sa salive. Le moustique transmet alors le pathogène à des hôtes sains via sa salive lors de ses prochains repas sanguins. En effet, les moustiques injectent leur salive à la composition extrêmement complexe (Ribeiro et al. 2007) lors des repas de sang

pour, entre autres, empêcher l'hémostase afin de maintenir le sang fluide, et retarder l'inflammation à l'endroit de la piqûre afin de ne pas avertir l'hôte de sa présence (Ribeiro 1987). Ainsi, par les pathogènes qu'ils peuvent contenir, les quelques nanolitres de salive injectés à un hôte par les femelles moustiques lors des repas sanguins sont indirectement responsables d'un problème majeur en santé humaine et vétérinaire au niveau mondial.

En effet, comme mentionné précédemment, les MTV représentent plus de 17% des maladies infectieuses humaines, avec près d'1/7ème de la population mondiale impactée et plus d'un million de décès chaque année (WHO 2020a). Or, les moustiques sont les vecteurs des MTV humaines les plus importantes en termes d'incidence, de mortalité et de morbidité. En tête de ce triste podium se trouve le paludisme avec 608 000 décès et 249 millions de cas estimés en 2022 (WHO 2023), et qui est transmis par une cinquantaine d'espèces de moustiques du genre *Anopheles* dont *Anopheles gambiae*. Le paludisme est causé par des parasites de la famille des *Haemosporida* et du genre *Plasmodium*, dont *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax* sont les plus dangereux pour l'Homme. Vient ensuite la dengue qui cause 96 millions de cas symptomatiques et de 20 000 à 40 000 décès chaque année, et dont l'agent étiologique, le DENV, est essentiellement transmis par des moustiques du genre *Aedes* (Bhatt et al. 2013; WHO 2023; CDC 2023). D'autres MTV humaines aux répercussions sanitaires et économiques majeures sont transmises par les moustiques telles que la filariose lymphatique (51 millions d'infections en 2018) et des arboviroses (pour "arthropod borne virose") avec notamment le chikungunya, le zika, la fièvre jaune (170 000 cas sévères et 60 000 décès en 2013), ou encore l'encéphalite japonaise (68 000 cas symptomatiques chaque année dont 30% sont fatals) (WHO 2018a; WHO 2019a; WHO 2019b; WHO 2020b; WHO 2022). Bien que la plupart de ces MTV circulent de façon endémique dans la ceinture tropicale et subtropicale, certaines sont connues pour leurs flambées épidémiques aux conséquences dramatiques. Cela a été dernièrement le cas du zika dans l'Océan Pacifique entre 2007 (185 cas en Micronésie) et 2013 (ex. 55 000 cas en Polynésie Française) et en Amérique du Sud depuis 2015 (ex. 1,3 millions de cas en 2015 au Brésil), ou encore du chikungunya dans l'Océan Indien de 2004 à 2007 (plus de 2 millions de cas) et en Amérique latine en 2016 (près de 350 000 cas)(Singh et al. 2016; WHO 2018a; WHO 2020b).

Le régime alimentaire des moustiques femelles a donc de lourdes conséquences en termes de santé publique, et cela risque d'empirer dans un futur proche. En effet, avec l'augmentation des températures et des précipitations induites par le changement climatique (GIEC et al. 2019), la répartition des espèces de moustiques est en cours d'évolution (Kraemer et al. 2019; Hertig 2019; Li et al. 2021). Certaines zones jusqu'ici plutôt épargnées pourraient devenir des zones de transmission active au sein de populations humaines relativement naïves face à ces MTV. Ajouter à cela l'augmentation de la population humaine située en zones déjà à risque, les coûts économiques et la morbidité associés à ces MTV risquent en effet de s'aggraver. De façon intéressante, ces MTV n'impliquent que peu d'espèces de moustiques, et fort heureusement au vu des conséquences dramatiques que cela a déjà sur l'humanité. En effet, tous les moustiques ne sont pas aptes à transmettre des pathogènes, tous ne sont pas vecteurs (Leake 1992). Et, tous les moustiques qui sont

vecteurs ne sont pas aptes à transmettre tous les pathogènes à transmission vectorielle (Leake 1992). Cela va dépendre de la capacité vectorielle des populations de moustiques.

1.2. La capacité vectorielle des moustiques

Dans un premier temps définie pour l'étude de la malaria (Macdonald 1956), puis généralisée par la suite pour l'ensemble des MTV (Kramer and Ciota, 2015), la capacité vectorielle (CV) est une expression visant à modéliser l'épidémiologie de la transmission des parasites véhiculés par les vecteurs. Elle représente l'aptitude qu'a une population de moustiques à établir un cycle épidémique pour un pathogène donné. Concrètement, elle permet de déterminer le nombre moyen d'infections secondaires induites dans une population d'hôtes susceptibles à partir d'un moustique infecté. Le calcul de la CV prend en compte les paramètres intrinsèques à la population de moustiques ayant une influence sur la transmission des pathogènes, à savoir le nombre de femelles moustiques retrouvées par hôtes (m), le taux journalier de piquûre (a), le taux de transmission au sein des moustiques exposés ou compétence vectorielle (b), la probabilité de survie quotidienne (p), et la période d'incubation extrinsèque (n , ci-après PIE). La CV est ainsi modélisée par l'expression (Kramer and Ciota 2015):

$$CV = ma^2 \times bp^n / -\log_e p$$

Cette expression, lorsqu'elle est multipliée par la durée de la virémie chez l'hôte (Garrett-Jones 1964; Benkimoun et al. 2021) permet de calculer le R_0 qui évalue, pour sa part, le nombre moyen de cas secondaires qu'un cas d'une maladie infectieuse peut générer, au cours de sa phase infectieuse, dans une population susceptible. L'aspect multifactoriel de la CV peut parfois la rendre difficile à appréhender d'un point de vue expérimental. Ces travaux de thèse s'intéressant à l'ouverture du filtre de compatibilité entre moustiques vecteurs et arbovirus, les paramètres de la CV qui sont nécessaires d'étudier concernent la compétence vectorielle et la PIE.

1.2.1. La compétence vectorielle et la période d'incubation extrinsèque

La compétence vectorielle d'une population de moustiques est définie comme étant le taux de moustiques pouvant assurer la multiplication et la transmission vectorielle biologique active d'un pathogène donné. Elle est donc le résultat de l'aptitude de chaque moustique de la population à s'infecter avec un pathogène lors d'un repas sanguin contaminé; à faire disséminer ce pathogène en son sein jusqu'à ce qu'il atteigne les glandes salivaires; puis à le transmettre via la salive lors d'un nouveau repas de sang sur un autre hôte (Figure 7). La compétence vectorielle d'une population envers un pathogène donné peut être totale, partielle ou nulle, avec respectivement la totalité, une partie ou aucun des moustiques de la population étant aptes à le transmettre. Le temps qui s'écoule entre l'ingestion du pathogène par le moustique et la transmission à un nouvel hôte via l'injection de la salive correspond à la PIE (Figure 7). Une fois les femelles moustiques devenues

infectantes (*i.e.* capables de transmettre le pathogène), elles sont estimées le rester toute leur vie (Hardy et al. 1983). De ce fait, plus la PIE est courte, plus la probabilité de transmission du parasite par la femelle moustique au cours de sa vie est élevée.

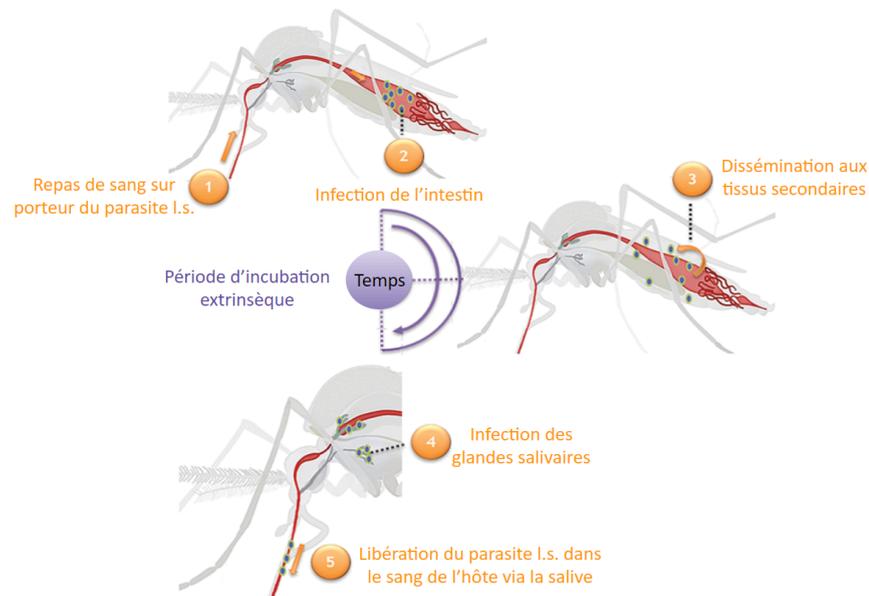


Figure 7 : Séquence de la compétence vectorielle d'un moustique, de l'infection à la transmission. Figure extraite et modifiée à partir de Chouin-Carneiro et dos Santos, 2017.

Les paramètres de la CV, y compris la compétence vectorielle et la PIE, sont sous l'influence de facteurs extrinsèques tels que la température, l'humidité, l'exposition aux insecticides, ou encore la compétition pour les ressources mais aussi des facteurs intrinsèques tels que la génétique du vecteur et du parasite, les barrières physiques et immunitaires présentes chez le vecteur, ou encore son microbiote.

1.2.2. Les facteurs extrinsèques au pathosystème vectoriel

L'environnement dans lequel évoluent les vecteurs est d'une grande importance dans la définition de la CV. L'influence qu'il exerce sur celle-ci peut avoir lieu au cours des différents stades de vie du moustique. En effet, même lorsque le vecteur en devenir n'est encore qu'une larve, cet effet de l'environnement peut se répercuter sur la CV des moustiques adultes par l'effet de report (ou "carry-over effect" en anglais). En ce qui concerne les facteurs abiotiques, la température joue un rôle clé dans la détermination de la PIE et de la compétence vectorielle (Kenney and Brault 2014; Ciota and Keyel 2019). Une augmentation de la température de leur gîte larvaire induit notamment une augmentation des taux d'infection et de dissémination du Sindbis virus chez les moustiques *Ae. aegypti* une fois adultes par l'effet de report (Muturi and Alto 2011). Et, l'augmentation de la température ambiante lors de la PIE des vecteurs adultes peut, par exemple, améliorer le taux de transmission du virus du Nil occidental (WNV) par une population de *Culex pipiens* (Vogels et al. 2016) ou augmenter sa réplication chez des *Culex quinquefasciatus* (Anderson et al. 2010), ou encore réduire la durée de la PIE du DENV-2 chez les *Ae. aegypti* (Watts et al. 1987). Par ailleurs, la température et l'humidité agissent de concert sur d'autres éléments de la CV que

sont la survie du vecteur et la densité de population, mais également sur la durée du cycle gonotrophique et le taux de piqûre journalier (Ciota and Keyel 2019). D'autres facteurs abiotiques peuvent influencer la compétence vectorielle des moustiques comme, par exemple, la composition biotique et physico-chimique des gîtes larvaires (Hery et al. 2021). L'exposition des larves à l'insecticide malathion induit notamment une augmentation des taux d'infection et de dissémination du Sindbis virus par les *Ae. aegypti* une fois adulte (Muturi and Alto 2011). La disponibilité en ressources est un autre paramètre important des gîtes larvaires. Par exemple, un stress alimentaire au stade larvaire peut induire une diminution de la survie des larves et des adultes et donc une diminution de la densité de la population de moustiques, paramètres clés de la CV (Alto and Lounibos 2013). La limitation des ressources au sein d'un gîte larvaire associée à une compétition intra- ou interspécifique importante, peut aussi avoir des répercussions sur la taille et le temps de développement des larves d'*Ae. albopictus*, induisant par la suite une augmentation du taux de dissémination du DENV-2 chez les moustiques adultes (Alto et al. 2008). Deux hypothèses peuvent expliquer cet effet sur la compétence vectorielle des moustiques: la première étant une compétence vectorielle augmentée du fait d'un manque de ressources pour la mise en place d'une réponse protectrice efficace; et la seconde étant à l'inverse une compétence vectorielle diminuée avec un parasite peinant à trouver les ressources nécessaires pour contourner le système immunitaire et/ou se développer correctement au sein de son hôte vecteur. Par ailleurs, un gîte larvaire expérimentalement appauvri en densité de micro-organismes, en plus d'influencer les traits d'histoire de vie des moustiques, peut aussi être délétère pour le développement des pathogènes, comme c'est le cas pour les oocytes de *Plasmodium falciparum* chez les vecteurs *Anopheles gambiae* (Okech et al. 2007). De façon intéressante, la composition du repas sanguin (Huang et al. 2017) peut aussi avoir un effet sur la compétence vectorielle des moustiques. Cela a été montré chez les *Ae. aegypti* avec une réduction de leur taux d'infection par le DENV ou par le virus du Zika (ZIKV), du fait d'une concentration importante en anticorps anti-dengue ou en lipoprotéines à faible densité dans les repas sanguins, respectivement (Nguyen et al. 2013; Wagar et al. 2017).

Ces facteurs extrinsèques peuvent influencer directement les éléments de la CV, mais ils peuvent aussi les influencer indirectement via une perturbation du développement des vecteurs, et donc une modification de certains de leurs facteurs intrinsèques (Alto and Lounibos 2013). Ces perturbations du développement des moustiques peuvent notamment induire des changements de l'efficacité de leurs barrières physiques, immunitaires et microbiologiques face aux infections (Alto and Lounibos 2013; Ciota and Keyel 2019).

1.2.3. Les facteurs intrinsèques au pathosystème vectoriel

Divers facteurs intrinsèques au pathosystème vectoriel influencent la CV. Parmi eux se trouvent l'éthologie du vecteur, avec notamment la spécificité d'hôte pour les repas sanguins ainsi que la fréquence de piqûres lors d'un cycle gonotrophique qui impactent directement le taux de transmission d'un pathogène dans une population hôte (Scott and Takken 2012), mais également le taux d'infection de la population vectrice en elle-même (Kantor et al. 2018; Cui et al. 2019; Armstrong et al. 2020). Ces points ont d'ailleurs été mis en avant lors

de l'analyse du rôle du moustique *Ae. aegypti* dans le devenir pandémique du DENV au cours des dernières décennies (Brady and Hay 2020). Le facteur qui nous intéresse particulièrement dans ce manuscrit est la génétique, que ce soit celle du vecteur ou celle du pathogène, et ses effets sur la compétence vectorielle et la PIE.

1.2.3.1. Le fond génétique des vecteurs et des pathogènes

La compétence vectorielle et la PIE d'un pathosystème vectoriel donné vont dépendre de la génétique du vecteur, avec des différences observées pour un même pathogène entre les espèces vectrices. Le ZIKV a par exemple une PIE plus courte chez les moustiques *Ae. aegypti* par rapport aux moustiques *Ae. albopictus* (Armstrong et al. 2018). L'effet de la génétique du vecteur peut également s'observer entre populations d'une même espèce et même entre individus d'une même population. Chez *Ae. aegypti* par exemple, les individus d'une même population mais appartenant à différentes familles génétiques présentent des PIE différentes vis-à-vis d'une souche de DENV-3 (Ye et al. 2016). Un des aspects génétiques qui peut expliquer les différences de compétence vectorielle entre les individus d'une même population sont les gènes de résistance aux insecticides. La résistance aux organophosphates entraîne notamment une augmentation de la compétence vectorielle des *Cx. quinquefasciatus* à transmettre le WNV (Atyame et al. 2019).

La compétence vectorielle et la PIE vont également dépendre de la génétique du pathogène. Les moustiques *Cx. quinquefasciatus* peuvent, par exemple, transmettre le virus de l'encéphalite japonaise (Van den Eynde et al. 2022), mais sont incompetents pour le ZIKV appartenant à la même famille des *Flaviviridae* (Kauffman and Kramer 2017). Et, différentes espèces de *Plasmodium sp.* présentent une PIE différente chez leurs vecteurs *Anopheles darlingi* (de Barros et al. 2011). Certaines mutations dans le génome des pathogènes peuvent expliquer ces différences de compatibilité entre vecteurs et pathogènes. La mutation A226V présente dans certaines souches du CHIKV leur a par exemple permis une meilleure transmission par les vecteurs *Ae. albopictus* et, ainsi, la mise en place d'une épidémie sans précédent dans le SOOI, notamment à La Réunion (Vazeille et al. 2007).

Les différences en termes de compétence vectorielle et de PIE sont donc grandement influencées par les interactions entre génotypes du vecteur et du pathogène. Cela a par exemple été démontré lors d'une étude expérimentale utilisant plusieurs populations d'*Ae. albopictus* des Amériques exposées à différentes souches du ZIKV (Azar et al. 2017). Qui plus est, selon le génotype des parasites, la spécificité des vecteurs pouvant assurer leur transmission varie. Par exemple, les pathogènes du genre *Plasmodium* infectant les humains peuvent être transmis uniquement par des moustiques du genre *Anopheles* (Sinka et al. 2012), tandis que les espèces infectant les oiseaux, tel que *Plasmodium relictum*, ont un spectre de vecteurs compétents beaucoup plus large avec entre autres des espèces vectrices des genres *Anopheles*, *Culex* et *Aedes* (LaPointe et al. 2012). Ces différences d'aptitude à la vexion sont le reflet d'une compatibilité différente entre vecteurs et pathogènes en ce qui concerne les angles d'exigence métabolique et d'évasion du système immunitaire. La nécessité en lipides (dont le cholestérol) pour le cycle de réplication des flavivirus est un exemple maintenant bien connu d'exigence métabolique. Chez le vecteur moustique, l'apport en lipides pour les flavivirus va notamment dépendre de l'hôte sur lequel le repas

sanguin a été pris, ce qui pourrait expliquer que certains moustiques sont plus ou moins bons vecteurs en fonction de leur éthologie, et même expliquer les différences d'aptitude à la transmission d'un parasite entre les vecteurs d'une même population (Vial et al. 2021). En ce qui concerne l'angle d'évasion immunitaire, les systèmes de défense des moustiques ont en effet été identifiés comme modulateurs de la compétence vectorielle en fonction des interactions entre génotypes du vecteur et du pathogène, et aussi en fonction de l'environnement dans lequel ces interactions se déroulent (Franz et al. 2015; Sanchez-Vargas et al. 2021; Carpenter and Clem 2023). Ces systèmes de protection, pouvant intervenir lors des différentes étapes du cycle parasitaire au sein du vecteur, comprennent des protections physiques, immunitaires, et d'autres facteurs ayant un effet protecteur contre les pathogènes, comme le microbiote (Figure 8).

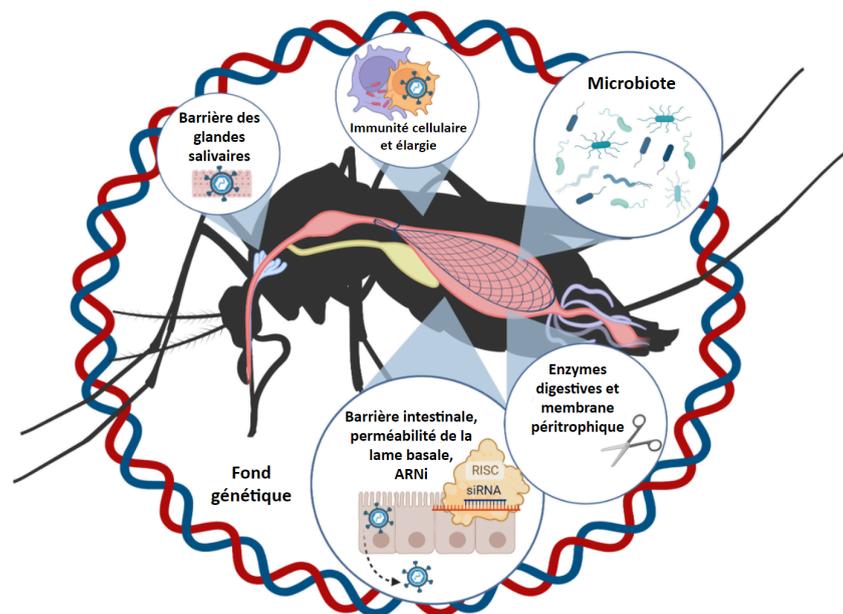


Figure 8 : Systèmes de défense des moustiques face à l'infection, la réplication et la dissémination des pathogènes à transmission vectorielle. Au sein du vecteur, les pathogènes, ici des virus, rencontrent des barrières physiques, cellulaires, microbiennes et immunologiques, qui sont influencées par le fond génétique du moustique. Figure extraite et traduite à partir de Lewis et al. 2023.

1.2.3.2. Les systèmes de protections

- **Les barrières physiques**

Elles sont représentées par les cellules et tissus du vecteur que le pathogène doit franchir les uns après les autres afin d'atteindre la salive de celui-ci, salive qui est sa voie de sortie pour être transmis à un nouvel hôte. Il s'agit de la membrane péritrophique (Huber et al. 1991), de l'épithélium intestinal (Bartholomay and Christensen 2002; Cirimotich et al. 2010; Brown and Hernandez 2012; Franz et al. 2015), de la lame basale (Carpenter and Clem 2023), et des cellules acineuses des glandes salivaires (Sanchez-Vargas et al. 2021).

- **Les défenses immunitaires**

Lorsqu'un vecteur est infecté par un pathogène, des défenses immunitaires se mettent en place dont la nature dépend du pathogène mais aussi du vecteur. Il peut s'agir de

l'immunité humorale, des mécanismes d'interférence ARN (ARNi) ou encore de l'immunité élargie. Pour activer les voies efficaces contre le type de pathogène qui l'infecte, le moustique possède des molécules, les PRRs (Pattern-Recognition Receptors), qui reconnaissent et se lient aux PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) du pathogène (Kumar et al. 2018). Une fois les PRRs liés aux PAMPs, des cascades de réactions sont déclenchées permettant d'activer des gènes de l'immunité.

L'immunité humorale des moustiques comprend trois voies, les voies Toll (Shin et al. 2005; Frolet et al. 2006; Xi et al. 2008), Imd (Meister et al. 2005; Garver et al. 2012; Carissimo et al. 2015), et JAK/STAT (Barillas-Mury et al. 1999; Gupta et al. 2009; Jupatanakul et al. 2017). Chacune d'elles activent la sécrétion de peptides antimicrobiens (PAMs) via des cascades de signalisation cellulaire et l'expression de différents gènes (Kumar et al., 2018). Ces trois voies sont loin de s'exclure mutuellement mais semblent au contraire agir de concert pour la protection face à l'infection par certains parasites. Cela est notamment révélé par des études expérimentales montrant le rôle de chacune des trois voies dans la lutte contre l'infection par le DENV au sein des *Ae. aegypti*, que ce soit de façon directe avec les voies Toll et JAK/STAT (Xi et al. 2008; Jupatanakul et al. 2017) ou de façon indirecte pour la voie Imd (Ramirez et al. 2012). Par ailleurs, l'infection par le DENV dans des cellules d'*Ae. aegypti* a montré la sur-régulation significative de sept PAMs appartenant à trois familles différentes : trois défensines, deux cécropines, une gambicine et une attacine (Xiao et al. 2014), indiquant une complémentarité potentielle de ces PAMs ainsi que des voies humorales qui les expriment. La nature et la quantité de l'expression des gènes dépendant des voies humorales et de la sécrétion des PAMs qui en découle, ainsi que leur efficacité, va dépendre de l'espèce de moustique, voire même de l'individu moustique, du parasite, de la voie activée, du temps, et de l'organe infecté (Sanders et al. 2005; Garver et al. 2009; Luplertlop et al. 2011; Carvalho-Leandro et al. 2012).

Le mécanisme d'interférence ARN (ARNi), particulièrement conservé au sein du vivant, est un système d'inhibition de l'expression des gènes qui est séquence-spécifique et médié par de l'ARN non-codant. Ce système est également utilisé pour dégrader les ARN exogènes des parasites infectant les cellules hôtes. De ce fait, ce système constitue un rempart majeur face aux arbovirus contre lesquels il est particulièrement efficace. Les PAMPs initiant l'ARNi sont des ARN double brins endogènes ou exogènes, qui vont être réduits en petits fragments d'ARN simple brin (sRNA pour small RNA en anglais) par des complexes protéiques. Ce sont ces sRNA qui associés à d'autres complexes protéiques vont permettre de dégrader les ARN des séquences qui leur sont complémentaires. Il existe différents types de mécanismes d'ARNi selon l'origine de ces PAMPs, leur taille, les protéines par lesquelles ils sont recrutés, mais également selon leur rôle et devenir: la voie des siRNA (small interfering RNA), principale voie antivirale (Hussain et al., 2016), la voie des miRNA (microRNA)(Winter et al. 2007; Dennison et al. 2015), et la voie des piRNA (piwi interacting RNA)(Vodovar et al. 2012; Olson and Blair 2015). L'importance de la voie des siRNA dans la défense contre les arbovirus a été montrée par son implication dans la défense antivirale au sein de différents pathosystèmes vectoriels (Keene et al. 2004; Franz et al. 2006; Sánchez-Vargas et al. 2009; Brackney et al. 2009; Khoo et al. 2010; Blair 2011). A ce jour, le miR-252 est le seul miRNA ayant démontré un effet antiviral en régulant l'expression de la protéine d'enveloppe du

DENV-2 au sein des cellules du vecteur *Ae. albopictus*, limitant donc l'efficacité de la réplication virale (Yan et al. 2014), avec possiblement des répercussions sur la compétence vectorielle. L'implication de la voie des piRNA dans l'interférence virale a notamment été montré pour différents arbovirus chez les vecteurs *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (Hess et al. 2011; Morazzani et al. 2012; Vodovar et al. 2012; Léger et al. 2013; Varjak et al. 2017).

L'immunité élargie correspond aux mécanismes de développement du moustique et de régulation de l'homéostasie cellulaire détournés dans un but de protection face à l'infection par des parasites. La mélanisation, par exemple, est détournée afin de créer une capsule de mélanine autour d'un pathogène détecté préalablement par certains hémocytes. Cette capsule hermétique permet de priver le pathogène de ressources et de le confronter aux espèces réactives à l'oxygène créées lors de la production de la mélanine, et induisant un stress oxydatif délétère ou même létal pour le pathogène (Kumar et al. 2018). L'infection d'une cellule par un parasite peut aussi induire le mécanisme d'apoptose, mais cet effet anti-parasitaire a été peu observé (Vaidyanathan and Scott 2006), la plupart des études montrant à l'inverse qu'une activité apoptotique sur-régulée par la présence d'un pathogène peut faciliter son infection et sa dissémination au sein du vecteur (Chen et al. 2012; Wang et al. 2012). Il a été suggéré que les pathosystèmes vectoriels efficaces ont probablement évolué afin d'éviter un déclenchement trop important de l'apoptose dans le but de maintenir une infection systémique mais non létale au sein du vecteur et pouvoir ainsi compléter le cycle parasitaire et être transmis à un nouvel hôte (Clem 2016). Les parasites peuvent également être dégradés par autophagie, par phagocytose (Hillyer et al. 2003), ou encore par l'action de protéines de choc thermique, comme cela a déjà été montré par la surexpression de la protéine de choc thermique HSC70B, faisant suite à l'infection des *An. gambiae* par le virus o'nyong-nyong, induisant une diminution de la réplication et de l'infection du virus (Sim et al. 2007).

- **Le microbiote**

Pour finir, un facteur qui peut à la fois intervenir sur les ressources disponibles et l'immunité du moustique est son microbiote. Le moustique n'est pas simplement le vecteur de parasites, il constitue également un environnement-hôte pour de nombreux micro-organismes symbiotiques, commensaux, ou même parasites, et c'est cet ensemble qui est appelé microbiote (Jupatanakul et al. 2014; Azar and Weaver 2019; Gao et al. 2020). Bien que les bactéries soient le type de micro-organismes le plus étudié du microbiote, car représentant sa fraction la plus importante, il peut aussi contenir des virus, des champignons, et même des protistes (Guégan et al. 2018). La densité et la nature du microbiote dépendent de l'espèce des moustiques, de leur génétique, de leur sexe, de leur stade de vie, des facteurs biotiques et abiotiques de leur environnement, et aussi de leur alimentation (Jupatanakul et al. 2014; Scolari et al. 2019). Il est par exemple reconnu que les moustiques élevés en condition de laboratoire hébergent une diversité microbienne plus faible que les populations de terrain (Hegde et al. 2018; Scolari et al. 2019). Les interactions plus ou moins directes de ces micro-organismes avec leur environnement-hôte et avec les parasites à transmission vectorielle qui y arrivent peuvent moduler la capacité vectorielle des moustiques vis-à-vis de ces parasites (Jupatanakul et al. 2014; Azar and Weaver 2019; Gao et

al. 2020). Par exemple, le microbiote intestinal des *An. gambiae* peut être modifié du fait de la présence d'antibiotiques dans le repas de sang, modification qui induit une augmentation de la susceptibilité à l'infection du vecteur face à des parasites du genre *Plasmodium* (Gendrin et al. 2015). Le microbiote peut notamment induire ces modifications de la capacité vectorielle des moustiques en modifiant leur physiologie, leurs réponses immunitaires, et aussi la disponibilité en ressource pour le développement/la réplication des parasites (Scolari et al. 2019). Par exemple, le champignon *Beauveria bassiana*, peut agir sur la physiologie du moustique en réduisant sa durée de vie, sa fécondité, et en augmentant la durée du cycle gonotrophique, facteurs importants de la capacité vectorielle (Kean et al. 2015; Deng et al. 2019). Mais il agit également sur l'immunité des moustiques puisqu'il peut par exemple activer les voies canoniques de l'immunité des vecteurs *Ae. aegypti* réduisant leur susceptibilité à l'infection face au DENV-2 (Dong et al. 2012). Les virus du microbiote peuvent eux aussi agir sur la capacité vectorielle des moustiques à transmettre des arbovirus, soit parce que leur présence active la voie ARNi des moustiques avant même l'infection par les arbovirus, soit parce qu'ils entrent en compétition avec eux (Nasar et al. 2015; Scolari et al. 2019; Öhlund et al. 2019). C'est notamment le cas de l'alphavirus Eilat, spécifique des insectes, qui diminue la réplication virale d'arbovirus à transmission vectorielle au sein des cellules d'*Ae. aegypti* (Nasar et al. 2015). Parmi les micro-organismes qui affectent la compétence vectorielle, les bactéries endosymbiotiques *Wolbachia* sont de plus en plus étudiées.

2. Interactions tripartites : *Wolbachia* et ses effets sur le pathosystème vectoriel

2.1. Généralités sur *Wolbachia*

2.1.1 Ecologie et biologie

Wolbachia sp. est une alpha-protéobactérie, à gram négatif, endosymbiotique obligatoire de l'ordre des *Rickettsiales*, de la famille des *Anaplasmataceae* (Werren et al. 2008). Décrite pour la première en 1924 par Hertig et Wolbach dans les ovaires des moustiques *Culex pipiens* (Hertig and Wolbach 1924), cette bactérie a depuis été retrouvée chez de nombreux arthropodes, ainsi que chez des nématodes filaires et des nématodes de plantes (Manoj et al. 2021; Kaur et al. 2021). Les analyses les plus récentes estiment que *Wolbachia* est présente chez environ 60% des espèces d'arthropodes (Zug and Hammerstein 2012; Weinert et al. 2015). Le large spectre d'hôtes de *Wolbachia* s'explique, entre autres, par les interactions symbiotiques que cette bactérie a su développer avec eux. Ces interactions sont réparties le long du continuum allant du parasitisme au mutualisme, et leur diversité démontre les grandes capacités d'adaptation de *Wolbachia*. Par exemple, les souches de *Wolbachia* wVulC et wVulM, sont des parasites de la reproduction des cloportes *Armadillidium vulgare* qu'elles infectent pour se propager le plus efficacement possible dans

la population (Cordaux et al. 2004), tandis que la souche *wBm* est dans une relation mutualiste obligatoire avec le nématode filaire *Brugia malayi*, dépendant l'un de l'autre pour leur survie respective grâce à l'apport réciproque de substances organiques particulières (Foster et al. 2005). Pour sa part, la souche *Wolbachia wMel* est un mutualiste facultatif de la nutrition des *Drosophila melanogaster*, leur permettant une fécondité plus importante que celle des drosophiles non infectées lorsque le fer vient à manquer dans leur environnement (Brownlie et al. 2009), mais *wMel* peut aussi avoir un léger phénotype de parasite de la reproduction chez cet hôte (Hoffmann 1988). Le phénotype d'interaction symbiotique est déterminé par la/les souches de *Wolbachia* et par l'espèce hôte (voir même la population hôte) impliquées dans l'interaction observée (Boyle et al. 1993; Hoffmann et al. 1994; Werren et al. 2008). Ce phénotype d'interaction n'est pas un paramètre figé, il peut évoluer dans le temps, comme ce fut par exemple le cas en Californie pour les *Wolbachia wRi* des *Drosophila simulans* qui en une vingtaine d'années passèrent du parasitisme au mutualisme (Weeks et al. 2007). Les hôtes peuvent être infectés par une ou plusieurs souches de *Wolbachia* (Werren et al. 1995), et les populations d'une même espèce hôte peuvent présenter des profils d'infection différents (i.e. infectées ou non, par une ou plusieurs souches, infectées par des souches différentes) (Landmann 2019).

Wolbachia peut infecter à la fois les tissus somatiques et les tissus reproducteurs de ses hôtes. Sa répartition au sein de l'environnement-hôte va dépendre de son phénotype d'interaction avec celui-ci, et implicitement des interactions entre génotype bactérien et génotype hôte (Sicard et al. 2014). Chez de nombreux hôtes arthropodes, *Wolbachia* peut presque être considérée comme une infection systémique (Sicard et al. 2014; Pietri et al. 2016) (Figure 9). Elle se transmet essentiellement de la mère à la descendance par transmission transovarienne verticale, et est de ce fait retrouvée dans les cellules germinales puis les ovocytes des femelles hôtes arthropodes (Kaur et al. 2021). Chez les hôtes arthropodes mâles, *Wolbachia* n'est pas présente dans les cellules germinales, elle en est exclue lors de la spermiogenèse, lorsque le cytoplasme excédentaire dans lequel se trouve les *Wolbachia* est retiré de la tête des spermatozoïdes (Kaur et al. 2021). Tous les hôtes des *Wolbachia*, arthropodes ou nématodes, appartiennent au super-embranchement des *Ecdysozoaires*, ils se développent par mues successives (Le Guyader and Lecointre 2016). L'infection par *Wolbachia* étant persistante au cours de ces mues, la transmission de cette bactérie est donc également transstadiale (Hertig and Wolbach 1924; Chao et al. 2021). Par ailleurs, *Wolbachia* possède la capacité de franchir les membranes cellulaires de ces hôtes, capacité démontrée suite à l'infection systémique (tissus somatiques et germinaux) obtenue après la microinjection de la bactérie dans la cavité générale d'hôtes sains (Boyle et al. 1993; Xi et al. 2005; Frydman et al. 2006; Werren et al. 2008). Bien que les mécanismes ne soient pas encore totalement élucidés, *Wolbachia* peut grâce à cela se transmettre de façon horizontale entre des espèces hôtes différentes. Il est cependant à noter que tous les arthropodes et nématodes ne sont pas permissifs à l'infection par cette bactérie, le succès de ce transfert horizontal dépendant en effet de l'ouverture du filtre de compatibilité entre la bactérie et l'hôte une fois mis en contact (Rigaud and Juchault 1995; Werren et al. 2008; Sanaei et al. 2021). Ce transfert horizontal peut avoir lieu grâce à différents comportements

des hôtes, tels que la prédation ou le cannibalisme de proies infectées, le partage d'une même niche écologique avec des espèces infectées, ou encore le parasitisme (parasites l.s. ou parasitoïdes) sur des hôtes infectés ou le transfert de *Wolbachia* à des hôtes sains par des parasites infectés (Sicard et al. 2014; Sanaei et al. 2021; Kaur et al. 2021). A la suite de blessures, les contacts sanguins peuvent aussi permettre la transmission de *Wolbachia* entre individus d'une même espèce ou d'espèces différentes, comme cela a été démontré expérimentalement chez les cloportes (Rigaud and Juchault 1995). La phorésie est, elle aussi, suspectée dans le transfert de *Wolbachia* entre des poux et des mouches (Covacin and Barker 2007). La combinaison de tous ces modes de transmission participe à l'incroyable répartition de *Wolbachia* au sein des *Ecdysozoaires*, et la diversité de ces modes de transmission se reflète par les résultats des analyses phylogénétiques et de co-phylogénie entre *Wolbachia* et ses hôtes.

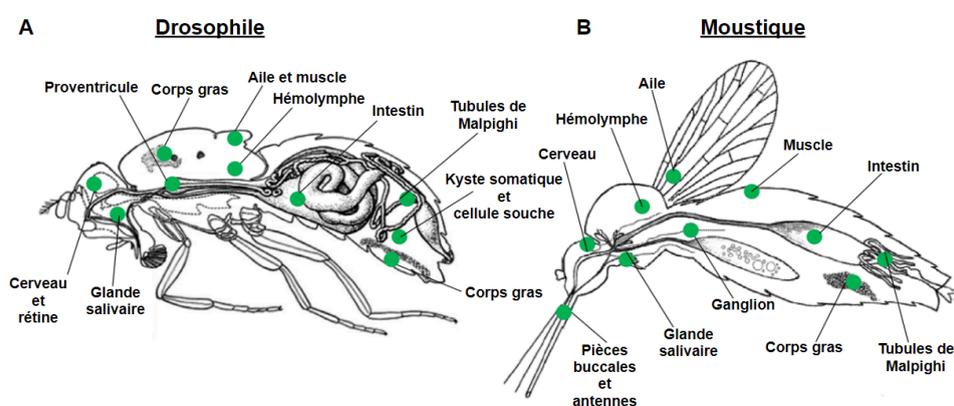


Figure 9 : Distribution de *Wolbachia* dans les tissus somatiques de ses hôtes arthropodes. Les points verts montrent les tissus et organes somatiques dans lesquels *Wolbachia* a été déjà détectée par PCR et cytologie fluorescente chez les hôtes drosophiles (A) et moustiques (B). Figure modifiée à partir de (Pietri et al. 2016).

2.1.2. Diversité phylogénétique

Le genre *Wolbachia* ne comprend pour l'instant qu'un seul représentant, *Wolbachia pipientis*, mais de nombreuses souches de celui-ci existent. De multiples études de détection, de séquençage, et d'analyses phylogénétiques, ont permis de classer toutes ces différentes souches de *Wolbachia* en 17 grandes lignées phylogénétiques appelées supergroupes qui sont notés de A à F, de H à Q, et S (Kaur et al. 2021) (Figure 10). Certains supergroupes comprennent des *Wolbachia* rencontrées chez un seul type d'hôtes, comme le supergroupe I de *Wolbachia* dont les hôtes sont tous de l'ordre des *Siphonaptères*, le K avec les hôtes de la superfamille des *Tetranychidae*, ou encore le C et le D incluant uniquement des *Wolbachia* mutualistes de nématodes filaires (Figure 10) (Kaur et al. 2021). D'autres supergroupes contiennent des *Wolbachia* présentes chez une plus grande diversité d'hôtes ; c'est le cas des supergroupes A et B dont les *Wolbachia* sont mutualistes et/ou parasites de nombreux arthropodes différents, ou du supergroupe F dont les hôtes sont soit des filaires soit des arthropodes (Figure 10) (Kaur et al. 2021). Chez les arthropodes, les études co-phylogénétiques entre *Wolbachia* et ses hôtes montrent l'absence de congruence, traduisant ainsi de nombreux transferts horizontaux entre les espèces hôtes (Werren et al.

2008). Dans l'état actuel des connaissances, les supergroupes A et B sont ceux qui contiennent le plus de souche de *Wolbachia* et d'hôtes différents. Mais ils sont aussi, avec les supergroupes C et D, parmi les plus étudiés du fait de l'importance médicale et vétérinaire de certains hôtes des *Wolbachia* qui leur appartiennent. Par exemple, les moustiques *Cx. pipiens* et *Ae. albopictus* infectés, comme décrit précédemment, par les bactéries des supergroupes A (*wAlbA*) et B (*wAlbB* et *wPip*), sont les vecteurs d'importants arbovirus infectant l'Homme. Les nématodes *Onchocerca volvulus*, *Brugia malayi*, ou encore *Wuchereria bancrofti* causant de graves filarioses chez l'Homme sont eux-mêmes infectés par des *Wolbachia* du supergroupe C pour le premier (*wOv*), et du D pour les deux autres (*wBm*, et *wWb* respectivement). La lisibilité et la compréhension de la phylogénie des souches de *Wolbachia* ont été rendues difficiles par la présence de nombreux éléments mobiles dans leurs génomes, par leur grande diversité, et par leur capacité à effectuer de la recombinaison entre elles (Werren et al. 2008). Cela s'est amélioré grâce à l'intense prospection de nouvelles souches bactériennes et de nouveaux hôtes (ou population d'hôtes), aux typages par séquençages multilocus (MLST) (Baldo et al. 2006), et aussi aux séquençages plus fréquents et profonds du génome complet des souches de *Wolbachia* ainsi trouvées.

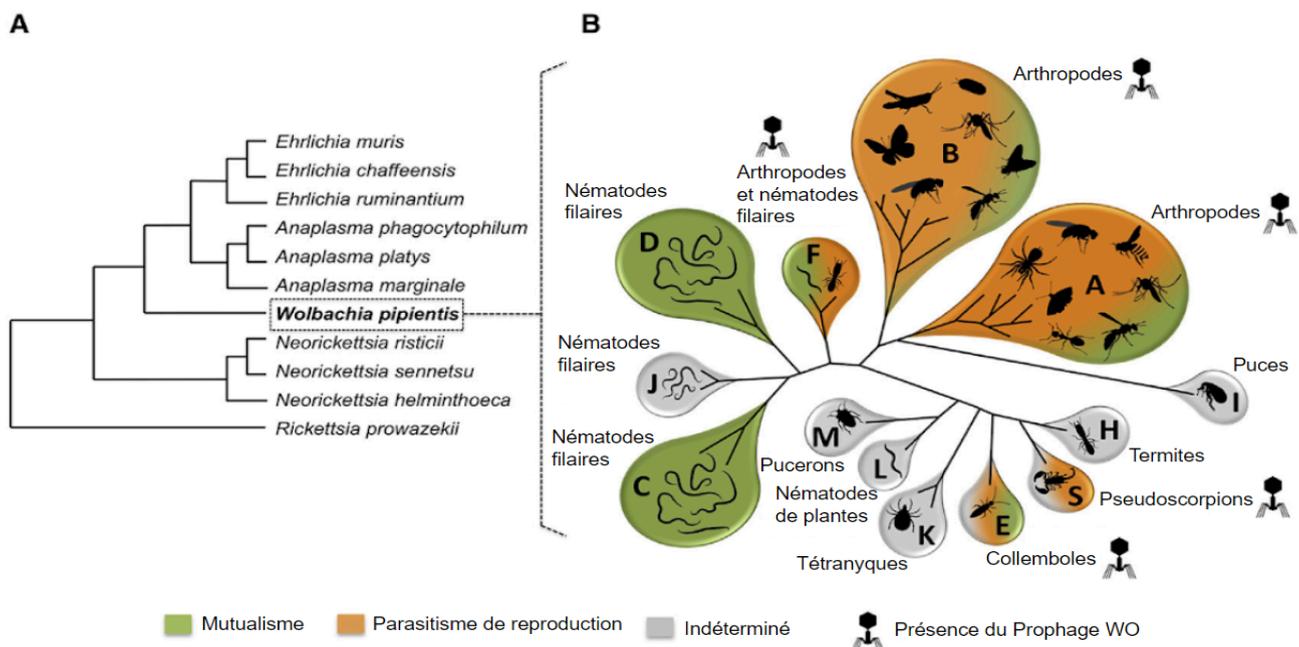


Figure 10 : Phylogénie des *Wolbachia*. Représentations schématiques des relations phylogénétiques du genre *Wolbachia* et des genres frères de la famille des *Anaplasmataceae* (A), et un arbre phylogénétique consensuel non enraciné basé sur l'ARNr 16S des principaux supergroupes de *Wolbachia*. Les couleurs verte, orange, ou grise, correspondent aux différents phénotypes d'interaction symbiotique hôte-*Wolbachia* retrouvés dans chaque supergroupe. Le symbole de phage représente les supergroupes de *Wolbachia* pour lesquels il existe des preuves génomiques de la présence du prophage WO intact ou relique. Figure extraite et traduite à partir de (Kaur et al. 2021).

2.1.3. Organisation des génomes

La taille des génomes de *Wolbachia* varie entre les souches, allant de 0,96 à 1,8 Mb (Kaur et al. 2021). Autour d'un génome "cœur" retrouvé chez différentes *Wolbachia*

séquencées, se trouvent un génome accessoire dont des éléments mobiles (transposons et phages) varient entre les souches et participent ainsi à la variabilité de la taille des génomes (Kaur et al. 2021). Cette partie accessoire du génome dépend, entre autres, du phénotype d'interaction symbiotique existant entre la souche de *Wolbachia* et son hôte. Par exemple, les souches mutualistes obligatoires de la bactérie ont un génome 30% plus court en moyenne que les souches parasitaires (Kaur et al. 2021), présentant notamment moins d'éléments répétés (tels que les gènes codant pour des protéines possédant des motifs ankyrine répétés) dans le génome accessoire (Foster et al. 2005). Un autre facteur pouvant expliquer cette différence importante de taille entre les génomes des *Wolbachia* mutualistes et parasites est l'érosion génétique de certains gènes devenus inutiles lors d'une symbiose mutualiste obligatoire à transmission purement verticale et/ou redondants avec les gènes de l'hôte (Foster et al. 2005). En effet bien que certains gènes soient conservés dans les deux types d'interactions, mutualiste ou parasitaire, tel que les gènes codant pour la réplication de l'ADN, la biosynthèse de certains cofacteurs, ou encore les mécanismes de sécrétion, d'autres gènes ne subissent plus une sélection aussi drastique chez les *Wolbachia* mutualistes (Brownlie et al. 2007). Ceci est lié au caractère obligatoire et donc stable de l'interaction mutualiste qu'elles entretiennent avec leurs hôtes, les deux parties étant totalement interdépendantes l'une de l'autre. A l'inverse, certains gènes des souches de *Wolbachia* parasites subissent une sélection plus importante, comme c'est notamment le cas pour ceux en charge de la réparation de l'ADN, de la stabilité des protéines, de la division bactérienne, et de la synthèse de l'enveloppe (Brownlie et al. 2007). Cela leur permet de survivre comme parasite dans l'environnement-hôte et/ou lors des transferts horizontaux à une nouvelle espèce hôte. Pour résumer, les génomes des souches parasitaires de *Wolbachia* sont plus sujets à la sélection sur certains gènes, codent pour d'avantages de protéines, et possèdent de plus nombreux éléments répétés, pouvant aller jusqu'à 14% dans le génome de la souche wMel par exemple (Brownlie et al. 2007; Werren et al. 2008; Landmann 2019).. Ces mêmes souches peuvent également avoir acquis des éléments mobiles tels que le prophage WO, qui est uniquement retrouvé dans les 5 supergroupes contenant les *Wolbachia* parasites, et non chez celles mutualistes des filaires (Figure 13) (Kaur et al. 2021). Ce prophage peut être sous forme lysogénique et est donc retrouvé complet et intact parfaitement intégré dans le génome de *Wolbachia* ; mais peut également avoir un cycle lytique et entraîner la lyse des *Wolbachia* infectées (Masui et al. 2001; Fujii et al. 2004; Bordenstein et al. 2006). Mais, il peut également être présent dans le génome de *Wolbachia* sous forme de relique, ayant perdu certains gènes redondant avec le génome de *Wolbachia* ou avec le génome de l'hôte de celle-ci (Kaur et al. 2021). Que le prophage WO soit intact ou sous forme de relique, certains de ses gènes sont impliqués dans la détermination du phénotype de parasite de la reproduction des *Wolbachia*, comme les gènes participant au male killing (wmk) ou à l'incompatibilité cytoplasmique (cifA et cifB) par exemple (LePage et al. 2017; Perlmutter et al. 2019; Perlmutter et al. 2020). D'autres éléments mobiles peuvent être retrouvés dans les génomes des *Wolbachia*, tels que les transposons qui peuvent représenter jusqu'à 10% du génome, ou encore le plasmide pWCP récemment découvert (Kaur et al. 2021) dans les souches de *Wolbachia* wPip présentes chez les *Cx. pipiens* (Reveillaud et al. 2019). L'ensemble des caractéristiques génomiques des souches de

Wolbachia parasites, détaillées ci-dessus, leur confèrent une importante plasticité génétique, pouvant expliquer les phénotypes très différents induits chez ses hôtes (Landmann 2019).

2.2. Effets de *Wolbachia* sur ces hôtes

2.2.1. Effet sur la reproduction

Au sein d'une espèce hôte donnée, la bactérie *Wolbachia* se transmet majoritairement de façon verticale via les ovocytes des femelles infectées. Il n'est de ce fait pas rare que *Wolbachia* soit nécessaire ou ait un impact positif sur la fertilité, la fécondité, la fitness, ou encore la survie de ses hôtes, paramètres dont dépend drastiquement la transmission verticale. Cela s'observe aussi bien pour les relations symbiotiques que la bactérie entretient avec des hôtes nématodes (Chirgwin et al. 2003; Landmann et al. 2011; Foray et al. 2018; Landmann 2019) ou avec des hôtes arthropodes (Stouthamer and Luck 1993; Min and Benzer 1997; Dedeine et al. 2001; Weeks et al. 2007; Miller et al. 2010; Fast et al. 2011; Joanne et al. 2015; Kaur et al. 2021). Afin d'optimiser sa propagation par transmission verticale, *Wolbachia* manipule la reproduction de ses hôtes dans le but de favoriser sa transmission. Quatre phénotypes de manipulation de la reproduction induits par *Wolbachia* sont connus chez les arthropodes, à savoir la féminisation (Figure 11, A), l'induction de la parthénogenèse (Figure 11, B), le male killing (Figure 11, C), et l'incompatibilité cytoplasmique (IC) (Figure 11, D) (Werren et al. 2008).

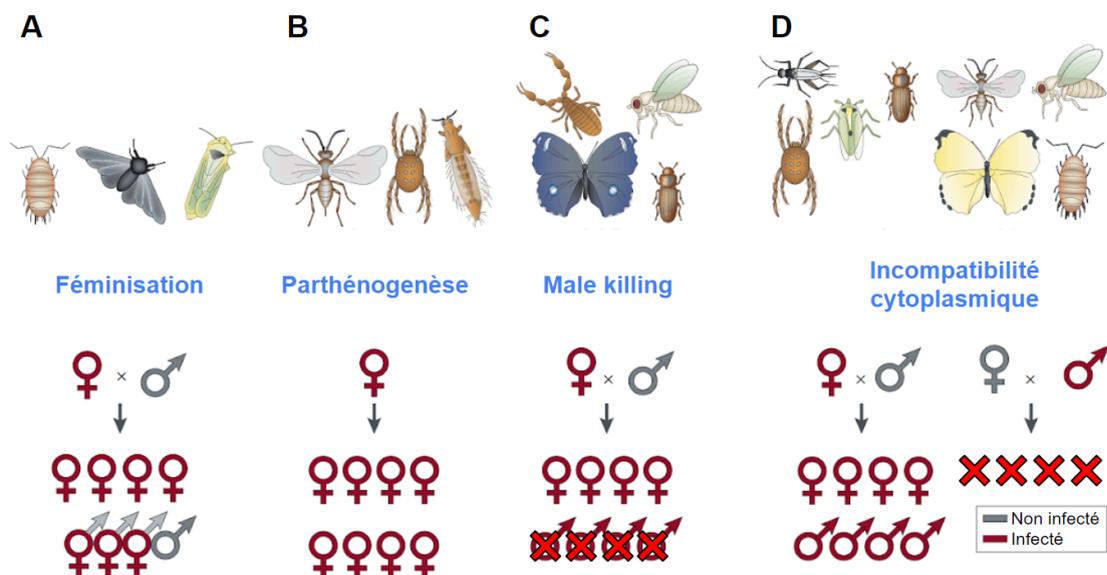


Figure 11 : *Wolbachia* parasite de la reproduction et ses différents phénotypes. Le mécanisme de féminisation des mâles génétiques qui se développent en femelles phénotypiques est retrouvé dans les ordres des Hémiptères, des Isopodes et des Lépidoptères (A). *Wolbachia* peut également induire la parthénogenèse chez ses hôtes, éliminant ainsi les mâles de la reproduction (B). Ce mécanisme a été retrouvé chez les Acariens, les Hyménoptères et les Thysanoptères. Le mécanisme du male killing est utilisé par des *Wolbachia* présentes chez des Coléoptères, des Diptères, des Lépidoptères, et des Pseudoscorpions. Les mâles infectés sont éliminés durant l'embryogenèse ou le développement larvaire, au profit des femelles infectées (C). Pour finir, l'incompatibilité cytoplasmique unidirectionnelle empêche les mâles infectés d'obtenir une descendance avec des femelles non infectées (D). Ce phénotype est retrouvé chez des *Wolbachia* infectant des arthropodes très diverses tels que des Acariens, des Coléoptères, des Diptères, des Hémiptères, des Hyménoptères, des Isopodes, des Lépidoptères et des Orthoptères. Figure extraite, traduite et modifiée à partir de Werren et al. 2008.

La féminisation est particulièrement étudiée chez les cloportes *Armadillidium vulgare*, chez lesquels elle est notamment induite par la souche wVulC de *Wolbachia* (Rigaud et al. 1991). Les glandes androgènes nécessaires à la différenciation sexuelle des cloportes mâles génétiques en mâles phénotypiques sont rendues non fonctionnelles à cause de la prolifération excessive de wVulC en leur sein, allant jusqu'à les hypertrophier (Werren et al. 2008). Les mâles génétiques, privés des hormones androgéniques de différenciation sexuelle produites par ces glandes, se développent alors en femelles phénotypiques (Figure 11, A) (Werren et al. 2008).

La parthénogenèse thélytoque est un des phénotypes rencontrés chez des espèces hôtes au développement initialement arrhénotoque dont les œufs fécondés produisent des femelles et les œufs non fécondés des mâles (Stouthamer et al. 1990; Stouthamer et al. 1999). La parthénogenèse thélytoque est une forme de reproduction asexuée au cours de laquelle les femelles produisent une descendance femelle à partir d'un œuf non fécondé (Figure 11, B). *Wolbachia* peut intervenir sur l'épissage de certains gènes impliqués dans l'ovogenèse, la mitose et la méiose pour aboutir à ce phénotype, et ce, à différent moment de la formation d'un zygote diploïde à partir d'œufs non fécondés (Landmann 2019; Wu et al. 2020). En effet, en fonction de l'espèce hôte, *Wolbachia* peut soit induire la formation de gamètes diploïdes en altérant la méiose chez la femelle, soit empêcher l'anaphase durant la première division embryonnaire, soit faire fusionner les noyaux de deux cellules suite à la première division mitotique de l'embryon (Stouthamer and Kazmer 1994; Gottlieb and Zchori-Fein 2001; Weeks and Breeuwer 2001; Pannebakker et al. 2004).

Le male killing induit par *Wolbachia* provoque la mortalité précoce des mâles infectés par *Wolbachia* lors de l'embryogenèse (et parfois lors du développement larvaire). Ce phénotype est retrouvé chez de nombreux arthropodes, dont des Coléoptères, des Diptères, des Lépidoptères, et des Pseudoscorpions (Werren et al. 2008) (Figure 11, C). En plus d'induire un sex-ratio biaisé vers les femelles, l'élimination des mâles permet d'augmenter les ressources disponibles pour les femelles. Ces dernières peuvent également se nourrir des cadavres de leurs frères, favorisant ainsi leur développement (Hurst and Majerus 1993). Cette mortalité des mâles viendrait de l'inhibition par *Wolbachia* d'un gène au rôle dans la masculinisation et dans la compensation de dosage (i.e. processus de régulation de l'expression de certains gènes liés au chromosome sexuel dans le but d'obtenir le même niveau d'expression de ces gènes dans les deux sexes) (Fukui et al. 2015). Des études sont nécessaires afin d'améliorer la compréhension de ce mode d'action, mais le gène *wmk* (de l'anglais WO-mediated killing) porté par le prophage WO et présent chez toutes les souches de *Wolbachia* induisant ce phénotype du male killing, serait au cœur du mécanisme (Perlmutter et al. 2019).

L'incompatibilité cytoplasmique (IC) est le phénotype induit par *Wolbachia* le plus courant chez les arthropodes. Ce phénotype s'observe en général lors des croisements entre mâles infectés par *Wolbachia* et femelles non infectées et se traduit par une mortalité embryonnaire très élevée pouvant aller jusqu'à 100% chez certaines espèces ; les autres croisements (i.e. mâles infectés x femelles infectées, mâles non infectés x femelles infectées ou mâles non infectés x femelles non infectées) étant tous compatibles (Figure 11, D) (Yen and Barr 1971; Werren et al. 2008). L'IC entraîne ainsi une diminution de la fitness des

femelles non infectées (Figure 11, D) (Yen and Barr 1971). L'IC peut également survenir lors des croisements entre individus infectés par des souches incompatibles de *Wolbachia*. Puisque la bactérie se transmet verticalement par la femelle, ceci aboutit en une surreprésentation des individus infectés dans les populations d'hôtes (Figure 11, D). L'IC repose sur un système de "poison-antidote", le 'poison' et 'l'antidote' s'exprimant respectivement chez les mâles et les femelles infectés par *Wolbachia* (Werren 1997; Poinot et al. 2003). Les mécanismes peuvent varier (Werren et al. 2008), mais globalement le poison présent dans le pronucléi mâle a pour effet de désynchroniser la première division mitotique des pronucléus mâle et femelle. Suite à la fécondation, le poison induit une condensation et une ségrégation anormale de la chromatine du pronucléi mâle entraînant un retard de la prophase (Tram et al. 2006; Landmann et al. 2009; Beckmann et al. 2017). En l'absence d'antidote (ou en présence d'un antidote non compatible avec le poison) dans l'ovocyte, ce décalage entraîne le blocage de la mitose et donc l'arrêt de l'embryogenèse dans son premier cycle mitotique (Tram et al. 2006). Si le bon antidote est présent en quantité suffisante dans l'ovocyte fécondé, il inhibe alors l'action du poison, vraisemblablement lors de l'interphase, et l'embryogenèse se déroule normalement (Yen and Barr 1971; Landmann et al. 2009; Shropshire et al. 2018). Les gènes codant pour le système poison-antidote (*CifB-CifA*) se trouvent dans le génome des prophages WO infectant certaines souches de *Wolbachia* (LePage et al. 2017; Beckmann et al. 2017). Ils présentent une importante diversité génétique entre les espèces hôtes de la bactérie, et même entre les populations d'une espèce hôte, induisant à la fois des mécanismes et des phénotypes d'IC variés (Werren et al. 2008; Bonneau, Atyame, et al. 2018; Bonneau, Landmann, et al. 2018). Par exemple, du fait de l'importante diversité génétique des souches de *Wolbachia* *wPip* infectant les moustiques *Cx. pipiens* et regroupées en 5 groupes (*wPipI* à *wPipV*) (Atyame et al. 2011), et de la diversification associée des gènes opérant pour le système "poison-antidote", l'IC chez ces moustiques peut être unidirectionnelle entre mâles infectés et femelles non infectées (Figure 11, D), mais aussi uni- ou bi-directionnelle entre mâles et femelles infectés par des souches différentes de *wPip* (Figure 12, A et B) (Bonneau, Landmann, et al. 2018; Sicard et al. 2019). A l'inverse, les souches *wAlbA* et *wAlbB*, co-infectant naturellement presque tous les *Ae. albopictus* à travers le monde, présentent une faible diversité avec notamment les gènes *CifA* et *CifB* de *wAlbB* qui sont monomorphes (absence de données pour *wAlbA*), rendant l'IC difficile à observer en conditions naturelles chez ces moustiques (Sicard et al. 2019), et ce, malgré leur capacité à produire de l'IC démontrée lors de croisements pour certaines populations aux femelles mono-infectées et mâles bi-infectés (Kambhampati et al. 1993; Sinkins et al. 1995) ou lors de leur transinfection dans des *Ae. aegypti* naturellement dépourvus de *Wolbachia* (Xi et al. 2005; Sicard et al. 2019). Par ailleurs, toutes les différentes formes d'IC peuvent être partielles ou totales, différentes souches de *Wolbachia* pouvant utiliser des mécanismes d'action pour leurs systèmes "poison-antidote" plus ou moins compatibles entre eux (Zabalou et al. 2008; Werren et al. 2008). Par ailleurs, des mêmes souches de *Wolbachia* peuvent présenter des phénotypes d'IC différents entre hôtes naturels et hôtes transinfectés expérimentalement. C'est notamment le cas des *Wolbachia* *wTei* présentant un phénotype d'IC après avoir été transinfectées au sein des *Drosophila simulans* mais pas chez leur hôte naturel *D. teissieri* (Zabalou et al. 2008).

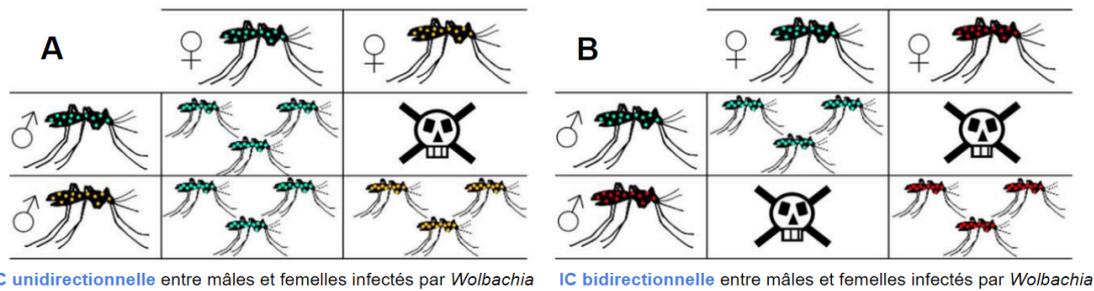


Figure 12 : Incompatibilité cytoplasmique uni- et bidirectionnelle entre des moustiques mâles et femelles infectés par des souches différentes de *Wolbachia*. L'IC est unidirectionnelle lorsque seul un des croisements réciproques est compatible, l'autre étant incompatible (A), et bidirectionnelle lorsque les deux croisements réciproques sont incompatibles (B). Figure extraite, traduite et modifiée à partir de (Sicard et al. 2019).

Ainsi, tous ces phénotypes induits par *Wolbachia* lui permettent de favoriser elle-même sa propagation rapide au sein des populations hôtes (Werren et al. 2008). Mais, cette bactérie n'est pas seulement connue en tant que parasite de la reproduction. Elle peut aussi modifier l'environnement que représente son hôte. Ceci peut se répercuter sur les autres micro-organismes évoluant au sein du même environnement-hôte qu'elle, notamment sur les pathogènes à transmission vectorielle au sein des vecteurs moustiques.

2.2.2. *Wolbachia*, vecteurs et pathogènes

Comme dépeint précédemment, *Wolbachia* peut causer des infections quasi-systémiques et être ainsi retrouvée dans des organes clés de la compétence vectorielle, telles que les glandes salivaires. Elle partage de ce fait un environnement commun, une niche commune, de façon parfois très intime au sein même des cellules du vecteur (Figure 13), avec les pathogènes à transmission vectorielle. Cette colocalisation suggère des interactions plus ou moins directes entre *Wolbachia* et pathogènes, notamment via la modification de l'environnement-hôte par la bactérie. Différents phénotypes d'interaction peuvent aboutir de leur co-infection dépendamment des populations vectrices, des lignées de *Wolbachia*, et des souches de pathogène observées.

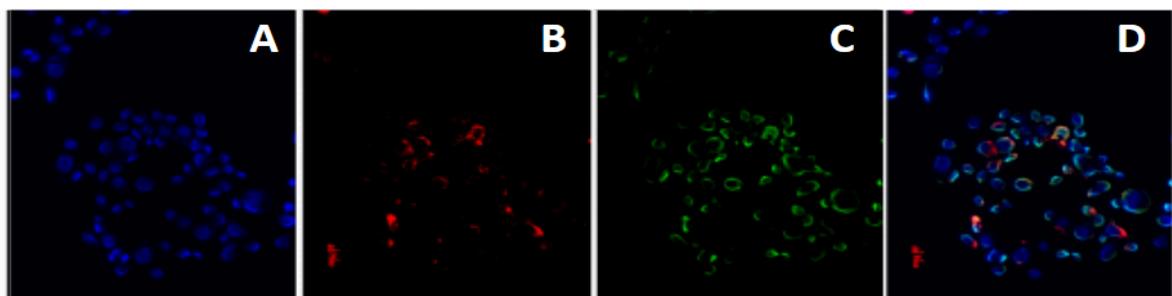


Figure 13 : Co-localisation des bactéries *Wolbachia* et du CHIKV au sein des cellules des moustiques *Ae. albopictus*. (A-D) Détection et localisation par FISH des bactéries *Wolbachia wAlbB* et des particules virales de CHIKV dans la lignée cellulaire C6/36 des moustiques *Ae. albopictus*. Les noyaux des cellules hôtes sont colorés en bleu par le marquage au DAPI (A). Les détections de l'ARNr 16S de *Wolbachia*, en rouge (B), et de l'ARN du gène E du CHIKV, en vert (C), sont réalisées à l'aide de sondes oligonucléotidiques marquées à la Rhodamine et à l'Alexa_488, respectivement. Bactéries et virus co-infectent le cytoplasme des cellules C6/36 *wAlbB* (D). Barre rouge = 10 µm. Figures modifiées à partir de (Raquin et al. 2015).

2.2.2.1. Phénotypes d'interaction

Les effets de *Wolbachia* sur la compétence vectorielle ont été largement décrits d'un point de vue phénotypique, en particulier sur des modèles de transfections expérimentales de *Wolbachia* chez des vecteurs naturellement dépourvus de la bactérie. Les bactéries peuvent ne pas avoir d'effet sur la compétence vectorielle, l'augmenter, ou au contraire la diminuer. L'absence d'effet de *Wolbachia* sur celle-ci a été observée pour des associations hôte-*Wolbachia* naturelles et pour des modèles de transinfection. Par exemple, les souches *wAlbA* et *wAlbB* n'induisent pas d'inhibition virale suite à l'infection expérimentale d'une population d'*Ae. albopictus*, leur hôte naturel, par une souche de DENV-2 (Blagrove et al. 2012). La compétence vectorielle des *Cx. quinquefasciatus* quant à la transmission de *Plasmodium relictum* n'a pas non plus été modifiée suite à la transinfection de ces vecteurs par la souche *wAlbB* (Kilpatrick et al. 2024). Une augmentation de la compétence vectorielle vis-à-vis de *P. relictum* a en revanche été observée dans le pathosystème vectoriel naturel impliquant les vecteurs *Cx. pipiens* et leur endosymbiotes *Wolbachia wPip*, avec une augmentation de la susceptibilité à l'infection des vecteurs en présence de la bactérie et une prévalence plus importante du parasite dans leurs glandes salivaires (Zélé et al. 2014). L'interférence de *Wolbachia* sur la compétence vectorielle de moustiques vecteurs quant à la transmission de virus, de protozoaires, et de filaires a déjà pu être observée dans des pathosystèmes naturels ou transinfectés (Kambris et al. 2009; Glaser and Meola 2010; Hughes et al. 2011; Iturbe-Ormaetxe et al. 2011; Mousson et al. 2012). Pour les arbovirus, cette diminution appelée interférence virale a notamment été montrée pour le DENV, le CHIKV, le ZIKV, ou encore le virus de la fièvre jaune (YFV) au sein des vecteurs *Ae. aegypti* suite à leur transinfection par des *Wolbachia* de drosophiles (Moreira et al. 2009; Bian et al. 2010; Walker et al. 2011; van den Hurk et al. 2012; Hussain et al. 2013; Dutra et al. 2016).

Ces phénotypes d'interactions dépendent des génomes des différents acteurs du pathosystème vectoriel observé, i.e. le génome du pathogène, celui du vecteur, et celui de la bactérie (Bourtzis et al. 2014). Par exemple, lorsque des *Ae. aegypti* sont transinfectés avec une même souche de *Wolbachia wMel*, un phénotype d'interférence virale est observé avec le CHIKV mais pas avec le YFV (van den Hurk et al. 2012). Un autre exemple très intéressant concerne les vecteurs *Ae. albopictus*, naturellement bi-infectés par les souches de *Wolbachia wAlbA* et *wAlbB*, et leur compétence à transmettre le DENV. En effet, les *Ae. albopictus* présentent une importante diversité de phénotypes d'interaction avec certaines lignées cellulaires ou populations naturelles montrant une interférence virale plus ou moins totale (Mousson et al. 2012; Wei et al. 2021), tandis que d'autres n'en présentent pas (Bian et al. 2010; Joanne et al. 2017). Par ailleurs, des *Ae. albopictus* (ou leurs lignées cellulaires) compétents pour transmettre le DENV sans que le phénomène d'interférence soit décelable, deviennent réfractaires au DENV s'ils sont curés de leur infection naturelle par antibiothérapie puis transinfectés avec d'autres lignées de *Wolbachia* comme avec *wMel* (Blagrove et al. 2012) ou *wMelPop-CLA* (Frentiu et al. 2010). Il apparaît à de multiples reprises dans la littérature que la densité en *Wolbachia* peut être un facteur déterminant pour la mise en place d'un phénotype d'inhibition partielle ou totale. C'est par exemple le cas du DENV au sein des vecteurs *Ae. albopictus*, tant *in cellulo* (Lu et al. 2012) (Figure 14) qu'*in insecta* (Blagrove et al. 2012; Lu et al. 2012; Bian et al. 2013; Wei et al. 2021).

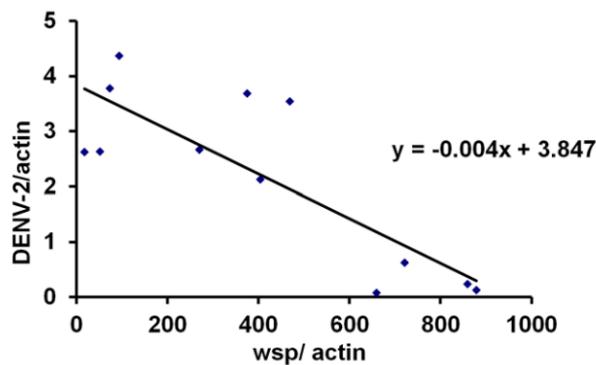


Figure 14: Inhibition de la réplication du DENV-2 induite par les *Wolbachia* wAlbB de façon densité-dépendante dans les lignées cellulaires Aa23 d'*Ae. albopictus*. Les cultures cellulaires utilisées pour les infections expérimentales sont dérivées de douze traitements antibiotiques différents réalisés dans le but d'obtenir des densités en *Wolbachia* hétérogènes. Cinq jours après l'infection de ces cellules par le DENV-2, les copies du génome viral ont été mesurées par RT-qPCR, et les copies du génome bactérien (gène *wsp*) par qPCR. L'actine a été utilisée comme gène hôte pour normaliser les données. Chaque point est la moyenne d'au moins trois réplicats biologiques. Figure extraite et légende traduite à partir de Lu et al. 2012.

Les phénotypes ainsi décrits sont les résultats visibles de processus d'interaction prenant place à l'échelle cellulaire et moléculaire. En effet, d'un point de vue mécanistique, ces phénotypes d'interactions sont la résultante de l'utilisation, de l'activation ou du détournement, de divers processus et composés biologiques de l'environnement-hôte par la bactérie et/ou le pathogène. Nous allons maintenant décrire succinctement la diversité de ces mécanismes d'action pour les interactions entre les bactéries endosymbiotiques *Wolbachia* et les arbovirus, ces derniers étant les modèles biologiques d'intérêt de cette thèse.

2.2.2.2. Mécanismes d'interactions

Les interactions entre la bactérie *Wolbachia* et les arbovirus au sein du vecteur peuvent être plus ou moins directes et faire intervenir différents mécanismes d'actions qui vont modifier d'une façon ou d'une autre l'environnement-hôte que représente le vecteur pour ces deux micro-organismes (Sicard et al. 2014; Landmann 2019; Minwuyelet et al. 2023). Les voies immunitaires et les voies métaboliques ont notamment montré être impliquées dans certaines de ces interactions. Plusieurs études ont été réalisées pour comprendre le rôle de l'immunité du vecteur dans les interférences virales liées à *Wolbachia*. Pan et coll., ont montré que la transfection de wAlbB chez les *Ae. aegypti* entraîne une surproduction des espèces réactives à l'oxygène (ROS). Ces dernières activent la voie Toll impliquée dans le contrebalancement du stress oxydatif via l'action des antioxydants. Or l'activation de la voie Toll induit à son tour l'expression de peptides antimicrobiens, la cécropine et la défensine, qui vont inhiber la réplication du DENV dans ces moustiques, expliquant les phénotypes d'interférence virale observé dans ce pathosystème vectoriel particulier (Moreira et al. 2009; Bian et al. 2010; Pan et al. 2012). De la même façon, la surexpression de gènes codant pour des peptides antimicrobiens a également été observée chez des *Ae. albopictus* préalablement curés de leur *Wolbachia* naturelles puis transfectés avec la souche wMelPop-CLA, les rendant réfractaires au DENV (Blagrove et al. 2012).

Cependant, ce même vecteur infecté naturellement par *wAlbA* et *wAlbB* est compétent pour transmettre le DENV dans certaines régions du globe et aucune surexpression des ROS ou des gènes de l'immunité n'a été observée pour le pathosystème vectoriel naturel (Bourtzis et al. 2000; Blagrove et al. 2012; Molloy and Sinkins 2015). Deux hypothèses, ne s'excluant pas mutuellement, ont été formulées pour expliquer ces différences d'activation de l'immunité observées entre pathosystème vectoriel naturel et pathosystème vectoriel transinfecté par des souches de *Wolbachia* étrangères. La première est que l'implication de l'immunité dans les mécanismes d'interférence virale dépendrait de l'état d'infection naturel du vecteur par *Wolbachia* (i.e. infecté ou non-infecté), avec une surexpression de l'immunité pour les transfections expérimentales, relativement récentes, et une absence de surexpression pour les infections naturelles (Rancès et al. 2012; Zhang et al. 2020). Cette étude conclut alors que l'interférence virale observée chez les vecteurs aux infections naturelles par *Wolbachia*, implique d'autres voies que l'immunité (Rancès et al. 2012), et pourrait notamment être due à une densité inhabituellement élevée des *Wolbachia* dans les systèmes transinfectés comparés aux systèmes naturels (McGraw et al. 2002). La seconde hypothèse est que l'utilisation des voies immunitaires comme mécanisme d'interférence virale serait déterminée par les génotypes en présence au sein du pathosystème vectoriel, puisqu'au moins une étude suggère que les systèmes naturels pourraient eux aussi présenter une interférence virale avec l'immunité comme mécanisme d'action. En effet, une expression différentielle de la voie des piARN médiée par *Wolbachia* au sein des *Ae. albopictus* infectés par le DENV a été observé (Raquin 2012), voie immunitaire dont l'inhibition induit une augmentation de la réplication du virus de la forêt de Semliki, un alphavirus, dans une lignée cellulaire d'*Ae. albopictus* (Schnettler et al. 2013).

Puisque les *Wolbachia* et les parasites à transmission vectorielle partagent le même environnement-hôte, ils peuvent également entrer en compétition pour les ressources disponibles nécessaires à leur développement respectif. Par exemple, *Wolbachia* et les moustiques étant auxotrophes pour le cholestérol, ils dépendent de celui procuré par les repas des moustiques. Cette dépendance peut induire une compétition entre les deux acteurs pour ce facteur limitant au sein des cellules (Molloy et al. 2016). Également essentiel à la réplication des arbovirus, le cholestérol s'accumule dans les cellules de moustiques *Ae. aegypti* transinfectées avec *wMelPop* du fait de la présence de la bactérie, empêchant le virus de la dengue d'y accéder (Geoghegan et al. 2017) et induisant donc le phénotype d'interférence virale. Une autre preuve de cette compétition pour le cholestérol est apportée par la levée partielle de l'inhibition de la réplication du ZIKV médiée par différentes souches de *Wolbachia* au sein de lignées cellulaires de moustiques suite à un apport en cholestérol (Schultz et al. 2017). Un autre système insecte/*Wolbachia*/virus a déjà montré le rôle de la compétition pour le cholestérol dans l'interférence entre certaines souches de *Wolbachia* (*wMelCS* ou *wMelPop*) et le C Virus de *Drosophila* (DCV) au sein des de *Drosophila melanogaster* (Caragata et al. 2013). Le fait que cette compétition soit retrouvée dans des systèmes divers indique que le cholestérol est un élément essentiel des mécanismes d'interférence virale. Cependant, ce métabolite n'est pas le seul lipide constituant une cible potentielle des mécanismes d'interférence virale médiée par *Wolbachia* puisque le DENV a déjà montré pouvoir perturber le profil lipidique des cellules de moustiques (Perera et al.

2012). Par exemple, une certaine classe de lipides, les acyl-carnitines, est sous-régulée par la présence de *Wolbachia* au sein des cellules d'*Ae. aegypti* transinfectées par *wMel*, alors-même qu'elle est nécessaire pour la réplication des arbovirus du DENV et du ZIKV qui s'effondrent totalement en son absence, révélant ainsi un autre mécanisme potentiel de l'interférence virale médié par *Wolbachia* (Manokaran et al. 2020). Par ailleurs, le fait que Sessions et coll., ont pu déterminer un répertoire de 116 facteurs impactés par l'infection du DENV chez *Ae. aegypti*, avec pour certains une implication dans la réplication virale (Sessions et al. 2009), indique qu'il existe de nombreux facteurs qui peuvent être les cibles potentielles de ces mécanismes d'interférence virale. A l'inverse, d'autres facteurs modulés par la présence de *Wolbachia* au sein des cellules du vecteur pourraient être responsables de l'interférence virale lors d'infections *a posteriori* par des arbovirus, et plus d'études sont nécessaires afin de confirmer leur implication dans ces mécanismes d'interaction. En réduisant la concentration de cet élément toxique, bien que nécessaire pour les cellules et la bactérie, *Wolbachia* peut persister plus longtemps dans les cellules (Kremer et al. 2009). Il serait donc intéressant de voir si cette voie métabolique joue un rôle dans l'interférence virale médiée par la bactérie. D'autres mécanismes de nature diverses sont mis en jeu lors des phénotypes d'interférence virale, avec par exemple *Wolbachia wAlbB* qui peut inhiber la fixation du DENV et du ZIKV aux cellules de moustiques d'*Ae. aegypti*, empêchant donc leur infection (Lu et al. 2020), et il paraît probable que plusieurs mécanismes interviennent de concert pour former le phénotype d'interférence virale.

Les analyses de génomique globale (transcriptomique, protéomique, métabolomique) sont des approches de choix pour décrypter l'implication relative de différents mécanismes dans l'interférence virale. Par exemple, dans une lignée cellulaire d'*Ae. albopictus* infectée par le CHIKV, *wAlbB* régule de façon concomitante plusieurs voies de l'hôte, incluant la glycolyse, le métabolisme de l'ATP, et les productions de glycoprotéines structurales et de protéines de la capsid du CHIKV, mais pas celles de l'immunité (Saucereau et al. 2017). Dans cette même étude, le CHIKV a été observé comme inhibant l'expression de protéines liées aux processus de transcription, de traduction, de stockage des lipides et de la voie des miRNAs. Or, certains éléments de la voie des microARNs (miRNAs) sont connus pour être séquestrés par *Wolbachia* pour faciliter sa colonisation (Hussain et al. 2011). Ce détournement de la voie des miRNAs induit des sous- ou des sur-expressions de gènes pouvant conduire à l'interférence virale (Asgari 2017). Par exemple, la transinfection de *wMelPop* chez *Ae. aegypti* induit une surexpression du gène *AaDnmt2* codant pour une méthyltransférase en détournant le miRNA *aae-miR-2940*, et cela entraîne une augmentation de la colonisation du vecteur par *Wolbachia* et une diminution de la réplication du DENV (Zhang et al. 2013). Il serait intéressant de voir si l'inhibition de la voie des miRNAs médiée par le CHIKV au sein des *Ae. albopictus* (Saucereau et al. 2017) empêche ce mécanisme d'interférence utilisant la même voie et observé pour le DENV au sein des *Ae. aegypti* transinfectés (Zhang et al. 2013). De plus, des études complémentaires de mutagenèse inverse utilisant des ARN interférents restent à réaliser pour définir le rôle précis des différents facteurs médiés par *Wolbachia* ou par le CHIKV dans l'interférence virale définis par Saucereau et coll. (Saucereau et al. 2017). Il serait également intéressant d'investiguer si les mêmes modulations sont retrouvées avec d'autres arbovirus, comme le DENV et le ZIKV,

et plus d'études de la sorte *in insecta* sont également nécessaires. Il est important de noter qu'une grande partie des études sur les modulations métaboliques et immunitaires liées à *Wolbachia* concernent les drosophiles, ou des vecteurs moustiques transfectés expérimentalement, et non ceux naturellement infectés par *Wolbachia*, comme *Ae. albopictus*. Des efforts restent donc à entreprendre afin de mieux comprendre les interactions des pathosystèmes naturels, ainsi que leurs effets sur la compétence vectorielle et plus généralement leur implication dans l'épidémiologie des arboviroses.

Les caractéristiques de *Wolbachia* présentées ci-dessus, et ces effets sur les maladies à transmission vectorielle les plus graves et les plus incidentes ainsi que sur leurs vecteurs, en font un atout majeur dans la lutte contre ces maladies à l'échelle globale. En effet, que ce soit via la manipulation de la reproduction des vecteurs ou via les interférences parasitaires qu'elle induit, *Wolbachia* est de plus en plus utilisée pour faire face à ces maladies, notamment dans la lutte contre la dengue (World Mosquito Program 2023). De plus, au vu des interactions intimes qu'elle entretient avec les vecteurs et les pathogènes qu'ils véhiculent, son influence sur les patterns épidémiologiques et sur l'évolution des pathosystèmes vectoriels ne doit pas être négligée. Chez les *Ae. albopictus* de La Réunion, un phénomène d'interférence virale a été décrit entre les *Wolbachia* naturellement présentes (*wAlbA* et *wAlbB*) et le DENV, allant jusqu'à l'absence totale du virus dans les glandes salivaires des femelles de la population testée (Mousson et al. 2012; Saucereau et al., données non publiées). Ces phénomènes d'interférence sont en contradiction avec l'épidémie qui est observée sur l'île depuis fin 2017 et, des études complémentaires sont nécessaires pour mieux comprendre ce paradoxe, études initiées par les travaux de cette thèse dont les modèles biologiques utilisés vont maintenant être présentés.

3. Modèles biologiques de l'étude

3.1. Les virus de la dengue

3.1.1. L'historique et les cycles de transmission

Il y a plus de 1600 ans en Chine, à l'époque de la dynastie Jin (265-420), des médecins rendirent compte d'une maladie nommée « poison de l'eau » aux symptômes particuliers au travers d'écrits dans l'«Encyclopédie des symptômes, des maladies, et des remèdes » (Vasilakis and Weaver 2008). Cela constitue la première description connue d'une maladie dite aujourd'hui de type dengue-like. Il faudra attendre 1635 dans les Indes Occidentales Françaises, et plus précisément dans les colonies françaises des Caraïbes, pour de nouveaux témoignages écrits relatant des épidémies de « Coup de barre » aux symptômes semblables à ceux décrits dans l'Encyclopédie chinoise (Vasilakis and Weaver 2008). Une description ancienne extrêmement précise de ces symptômes vient d'un des échecs coloniaux les plus cuisants de l'Histoire, le projet Darién (McSherry 1982). Ce projet audacieux, initié par Sir William Paterson, avait pour but la colonisation de l'isthme du Panama par les écossais, en raison de sa position stratégique à la croisée des grandes routes maritimes commerciales de

la fin du XVII^{ème} siècle. A peine les colons arrivés, 200 furent enterrés entre novembre 1698 et mars 1699 du fait d'une épidémie lors de laquelle le colon Patrick MacDowall décrivit avec grande précision l'évolution de sa maladie (McSherry 1982). Les symptômes évoqués sont typiques de la dengue : forte fièvre, douleurs rétro-orbitaires, vomissements, rashes cutanés, céphalées, myalgie, arthralgie, mauvais goût persistant dans la bouche, et bien entendu convalescence et fatigue de longue durée (McSherry 1982). En peu de temps, plus de 2000 des 2500 colons périrent de maladies, mais également du fait de mésententes avec les indiens Kunas, et de confrontations avec les militaires espagnols. Le projet fut abandonné en 1700, laissant l'Écosse ruinée et contrainte de se rattacher à l'Angleterre en 1707. Les raisons aujourd'hui incriminées de ce fiasco sont multiples, raisons géopolitiques, choix commerciaux, et surtout épidémies de maladies à transmission vectorielle (MTV). Bien que la dengue ait une part de responsabilité dans cet échec, elle doit être mise en cause dans une moindre mesure que le paludisme et la fièvre jaune, du fait de son plus faible taux de mortalité. Toujours est-il qu'au vue de la description sans équivoque de Patrick MacDowall elle a dû, même partiellement, contribuer à cet échec. L'Histoire contemporaine et les MTV, dont la dengue, sont ainsi intimement liées. Elles ont exercé, et exercent toujours aujourd'hui, une influence réciproque entre elles. Les MTV empêchant des colonies de se former, des pays de se développer, l'Histoire de l'humanité permettant à des maladies de se propager. En effet, pour expliquer l'acquisition par la dengue de son statut pandémique, trois phases distinctes peuvent être mises en évidence, toutes parallèles à l'Histoire de l'humanité et à celle des vecteurs moustiques de la dengue (Brady and Hay 2020).

Remontons tout d'abord à l'origine de la dengue, un cycle sylvatique impliquant des primates non humains et des moustiques de canopée tels que les *Aedes luteocephalus*, les *Aedes furcifer*, et les *Aedes taylori* en Afrique, et des espèces appartenant au complexe des *Aedes niveus* en Asie (Chen and Vasilakis 2011). La première phase vers le statut pandémique de la dengue consista donc à sa transition d'un cycle sylvatique à un cycle incluant l'Homme, permettant ensuite les premières épidémies dans les zones urbaines (Brady and Hay 2020). Les vecteurs incriminés dans cet échappement de la dengue depuis les forêts vers les milieux anthropisés sont des moustiques de canopée connus pour en descendre parfois afin de se nourrir sur les humains. Il s'agit notamment des *Ae. furcifer* en Afrique et/ou des *Ae. albopictus* en Asie (Chen and Vasilakis 2011). A partir de la fin du XVII^{ème} siècle et du début du XVIII^{ème}, les citées portuaires connurent un essor considérable, reflet de l'essor du commerce maritime, et devinrent alors de véritables plaques tournantes d'échanges intercontinentaux de biens et de personnes (Michon 2016). Ces citées portuaires constituèrent ainsi des lieux privilégiés pour l'import/export de vecteurs, essentiellement *Ae. aegypti* à cette époque, et de personnes infectées par la dengue, notamment via la traite des esclaves. Très attractives, ces citées s'agrandirent, avec pour conséquence la mise en place de véritables épidémies urbaines de dengue pour celles situées en zones tropicales et subtropicales.

Le commerce et le déplacement de personnes à l'intérieur des continents permirent ensuite à la dengue de se propager progressivement à partir des citées portuaires vers les grands centres urbains continentaux dans l'ensemble de la ceinture tropicale et subtropicale (Gubler 2006). Les tailles des villes étaient alors suffisamment importantes pour soutenir des

transmissions épidémiques d'une à quelques années. Ces descriptions plus ou moins précises d'épidémies de type dengue-like s'accumulèrent du XVII^{ème} à la première moitié du XX^{ème} siècle (Tableau 1), se multipliant à mesure que le moustique vecteur *Ae. aegypti* étendait son aire de répartition depuis l'Afrique dans le reste de la ceinture tropicale, notamment vers l'Amérique suivant les routes maritimes des esclavagistes (Powell 2018). Il est à noter que jusqu'à la moitié du XX^{ème} siècle les épidémies furent plutôt rares, de courtes durées, et que presque aucune ne présenta de mortalité importante (Brady and Hay 2020), éléments qui dénotent avec l'actuelle pandémie de dengue.

Date(s)	Localité(s)
1635	Antilles françaises
1699	Panama
1779	Etats-Unis d'Amérique (USA, Philadelphie), Indonésie (Batavia*)
1780	Egypte (Le Caire)
1784-1785	Espagne (Cadiz et Séville)
1823-1828	Tanzanie (île de Zanzibar), Egypte (Suez), Inde (Pondichéry à Calcutta, vallée du Gange), Birmanie (Rangoun en 1824), îles de la mer des Caraïbes, USA (Savannah en Géorgie), Petites Antilles, Cuba, Colombie du Nord, Mexique, sud-est des USA.
1827	Saint Thomas (île de la mer des Caraïbes des USA)
1829	Cuba
1847-1856	Arabie Saoudite (Jeddah), Pérou (Lima en 1851)
1865	Espagne
1868	Egypte (Port Saïd)
1835-1851	Côtes arabes, Sénégal**, Egypte (Le Caire), Brésil (Rio de Janeiro), Inde, Hawaii, USA (Nouvelle-Orléans), côte du Golfe du Mexique, côte Est des USA, La Réunion, île Maurice, Tahiti.
1870-1873	Afrique de l'Est, Syrie, Tanzanie (île de Zanzibar et Dar es Salaam), Egypte (Port Saïd), péninsule arabique, Inde, Birmanie, Singapour, Indonésie, Shanghai, Taïwan, île Maurice, sud des USA
1880	Afrique de l'Est, Grèce, Région de la mer Rouge, et du Levant***
1887-1889	Gibraltar (Territoire britannique d'outre-mer), Chypre, îles grecques, Turquie (ports de la mer Égée et de la mer Noire), Syrie
1894-1897	Australie, Indochine****, et Chine
1901-1907	Chine, Indochine***, Inde, Singapour, Australie, USA (Galveston au Texas), Panama, Cuba, Colombie
1912-1916	Panama, Chili, Argentine, Australie, Inde
1922-1929	USA (Galveston et États du Sud de l'Atlantique*****), îles de la mer des Caraïbes, Afrique du Sud, Égypte, Grèce
1941-1945	Afrique de l'Est, îles de la mer des Caraïbes, de l'Australie à Hawaii, de la Papouasie-Nouvelle-Guinée au Japon

Tableau 1 : Épidémies de type dengue-like au travers le monde du XVII^{ème} à la première moitié du XX^{ème} siècle. * actuelle Jakarta ; ** zone géographique comprenant approximativement les bassins des fleuves Sénégal et Gambie ; *** actuel Moyen-Orient ; **** actuellement Asie du Sud-Est continentale ; ***** comprennent le Delaware, le district de Columbia, la Floride, la Géorgie, le Maryland, la Caroline du Nord, la Caroline du Sud, la Virginie, et la Virginie occidentale. Tableau extrait, traduit et modifié à partir de Vasilakis et Weaver, 2008. Toutes les données ajoutées à ce tableau font l'objet d'une revue dans ce dernier article (Vasilakis and Weaver 2008).

Ce fut lors de cette phase initiale, étirée dans le temps, que les premières découvertes sur la dengue et son mode de transmission eurent lieu. En 1916, s'appuyant sur les récentes découvertes concernant la fièvre jaune (Reed et al. 1901), le rôle du moustique *Ae. aegypti* en tant que vecteur de la dengue pour l'humain fut démontré (Cleland et al. 1916). En 1926, l'agent étiologique responsable de la dengue fut classé en tant qu'agent filtrable (Siler et al. 1926) (ie. ancienne définition des virus). En 1931, ce fut au tour des moustiques *Ae. albopictus* d'être incriminés dans la vection de la dengue (Simmons et al. 1931; Snijders et al. 1931). Lors de cette première phase d'expansion de la dengue, les descriptions symptomatologiques sont les seules preuves de la survenue d'épidémies de type dengue-like. Or, la grande similarité qu'il peut parfois y avoir entre les symptômes de la dengue et ceux d'autres MTV fait qu'il est aujourd'hui difficile de statuer avec certitude sur l'implication de la dengue dans les épidémies de l'époque (Vasilakis and Weaver 2008). Un exemple de ces potentielles méprises est l'incrimination de la dengue dans une épidémie qui eut lieu à Calcutta en 1923, et pour laquelle les symptômes décrits correspondent rétrospectivement davantage à une épidémie de chikungunya (Vasilakis and Weaver 2008).

À partir de la seconde moitié du XX^{ème} siècle, les doutes furent levés sur la réelle implication du DENV lors des épidémies de type dengue-like grâce à sa détection dans le sang de patients malades. Ce fut au cours de la Seconde Guerre Mondiale que la dengue commença réellement à piquer la curiosité de certains gouvernements, représentant alors une source importante de morbidité au sein des troupes alliées et japonaises dans les théâtres d'opérations du Pacifique et de l'Asie (Gubler 2006). Les États-Unis décidèrent de créer et financer une unité scientifique spéciale, la "Dengue Research Unit" dirigée par le Professeur Sabin, afin de trouver des moyens de lutte contre cette menace planant sur leurs soldats et risquant d'amoindrir leur force de frappe. Les scientifiques japonais en firent autant. C'est ainsi qu'entre 1944 et 1952, les premières souches du virus de la dengue (DENV) furent isolées, et qu'il y eut démonstration de l'existence de sérotypes différents. Cela commença avec le sérotype 1 (DENV-1) isolé à partir du sang d'un patient au cours d'une épidémie à Nagasaki en 1943 par l'équipe japonaise du Professeur Hotta (Kimura and Hotta 1944; Hotta 1952). Ce même sérotype fut isolé chez un patient à Hawaï en 1944 par la Dengue Research Unit, qui isola la même année un second sérotype, le DENV-2, suite à une épidémie qui eut lieu en Papouasie Nouvelle Guinée (Sabin 1952). Sabin et Schlesinger entreprirent alors de mettre au point un vaccin en utilisant des souches virales épidémiques pour lesquelles ils observèrent une atténuation de la virulence chez l'Homme et une diminution de l'infection et de la charge virale chez le moustique vecteur *Ae. aegypti* suite à plusieurs passages chez des souris (Sabin and Schlesinger 1945). Les vaccins prêts, il ne restait plus qu'à les tester sur les soldats volontaires. Or, la fin de la guerre sonna le glas de cet essai clinique grandeur nature avant même l'administration des premières doses (Sabin 1952). A Manille, entre 1954 et 1956, une épidémie de dengue à fièvre hémorragique (DFH) permit la découverte de deux nouveaux sérotypes, le DENV-3 et le DENV-4 (Hammon et al. 1960). Tandis que la dengue présente des symptômes modérés, certains cas peuvent évoluer vers la DFH, appelée aujourd'hui dengue sévère, à la mortalité bien plus importante (Merle et al. 2018; WHO 2021) (voir symptomatologie de la dengue et de la DFH dans la Boîte descriptive des symptômes ci-dessous). L'épidémie de Manille ne fut pas la première

Boîte descriptive des symptômes

Les symptômes les plus fréquemment retrouvés lors d'une dengue « classique » sont : fortes fièvres, céphalées, asthénie, hypotension, myalgie, arthralgie, douleurs rétro-orbitaires, atteintes oculaires, rashes cutanés, vomissements, leucopénie, thrombocytopénie, ou encore adénopathie (WHO, 2021 ; Merle et al., 2018).

La dengue à fièvre hémorragique (DFH) est une complication de la dengue, à l'issue potentiellement fatale, est due à une dégradation rapide des symptômes : fuite plasmatisque, accumulation de fluide, détresse respiratoire, hémorragies, et défaillance d'organes, notamment hépatique (WHO, 2021).

description d'épidémies de DFH. Il y en eut avant cela, comme par exemple à Philadelphie en 1780, en Australie en 1897, à Beyrouth en 1910, à Taïwan en 1916, en Grèce en 1928, et de nouveau à Taïwan en 1931 (Gubler 2006). Cependant, l'épidémie de Manille fut la première pour laquelle l'implication du DENV fut biologiquement confirmée (Hammon et al. 1960). En quelques décennies, la DFH devint l'une des dix causes principales d'hospitalisations et de mortalité infantile en Asie du Sud-Est (WHO 1997). Dans les années 1970 et les décennies qui suivirent, la DFH s'étendit dans la région asiatique,

atteignit les îles du Pacifique, puis se propagea dans le sud et le centre du continent américain (Gubler 2006). L'augmentation de mortalité liée à la DFH, la présence continue d'un ou plusieurs sérotypes de dengue à certains endroits, et la large distribution des épidémies de DFH au sein de la ceinture tropicale et subtropicale indiquèrent un changement du pattern épidémiologique mondial de la dengue au cours de cette seconde moitié du XX^{ème} siècle. Il s'agit de la deuxième phase de l'expansion de la dengue. En effet, les bouleversements sociétaux, politiques, et écologiques qui advinrent dans l'après-guerre permirent à la dengue d'entamer la deuxième phase de son expansion, à savoir son endémisation, voire même son hyperendémisation, dans les grands centres urbains de la ceinture tropicale et subtropicale (Brady and Hay 2020) (Voir définitions dans la Boîte à définitions ci-dessous). L'hyperendémisation de la dengue est aujourd'hui reconnue comme étant la principale responsable de l'augmentation des épidémies de DHF observée depuis la seconde moitié du XX^{ème} siècle, notamment via l'effet de facilitation de l'infection par les anticorps lors d'une dengue secondaire.

Boîte à définitions

Les **maladies endémiques** sont des maladies infectieuses dont la **présence est continue ou habituelle** à un endroit donné, contrairement aux **maladies épidémiques** qui définissent des **augmentations de cas au-dessus des normales** attendues pour un endroit donné (CDC, 2021).

Les **maladies hyperendémiques** sont définies comme étant des maladies persistant à un haut niveau d'incidence dans un endroit donné (CDC, 2021). Cependant pour la dengue, le terme **hyperendémique** signifie que **plusieurs sérotypes de la dengue co-circulent de façon endémique** à un endroit donné.

Quatre facteurs principaux furent déterminants dans la mise en place de cette seconde phase d'endémisation et d'hyperendémisation de la dengue, qui dura approximativement des années 1950 aux années 1990. Le premier fut l'accroissement démographique mondial sans précédent associé à une urbanisation rapide et non planifiée (Lésel 2016; United Nations 2018) avec la multiplication des constructions insalubres et surpeuplées ainsi qu'une mauvaise gestion des eaux, des égouts, et des déchets. Ceci augmenta considérablement le nombre de gîtes larvaires pour les vecteurs, favorisant ainsi la densité de leur population, et par là même la mise en place de cycles à transmission vectorielle dans des endroits où les hôtes abondaient (Gubler 2006). Le second facteur fut la globalisation des échanges et des mouvements humains, par voies maritimes et aériennes. Avec en moyenne 9% de transports aériens en plus chaque année depuis 1960, la seconde moitié du XX^{ème} siècle conduisit l'interconnexion entre les grands centres urbains des différents continents à son paroxysme, rendant les imports/exports potentiels de personnes atteintes par la dengue et des vecteurs moustiques, aussi fréquents que rapides (Gubler 2006; Messina et al. 2014). Le troisième facteur fut le manque de moyens et d'efficacité des programmes de lutte anti-vectorielle (LAV) dans les pays les plus touchés par la dengue (Gubler 2006). L'apparition rapide de populations de moustiques résistantes aux insecticides (Vontas et al. 2012) ne fut pas la seule raison à ce manque d'efficacité sur le long terme. L'interconnexion entre les grands centres urbains permit, comme expliqué ci-dessus, l'import régulier de moustiques vecteurs et donc le maintien de la circulation de la dengue. Cette dernière se maintenant parfois même à des hauts niveaux d'incidence malgré un intense programme de LAV, comme à Singapour par exemple (Brady and Hay 2020). Pour finir, le quatrième principal facteur responsable de la seconde phase d'expansion de la dengue fut l'absence de traitement (préventifs et curatifs) efficaces, le manque de moyens des services de santé publique, et le manque d'accès aux soins dans les pays sous-développés et en développement les plus impactés par la dengue (Saeed and Asif 2020) Au cours de cette seconde phase, l'endémisation et l'hyperendémisation de la dengue se cantonnèrent aux grands centres urbains de la ceinture tropicale, la majorité de ceux-ci ne reportant la circulation que d'un à deux sérotypes à la fois (Figure 15) (Messina et al. 2014).

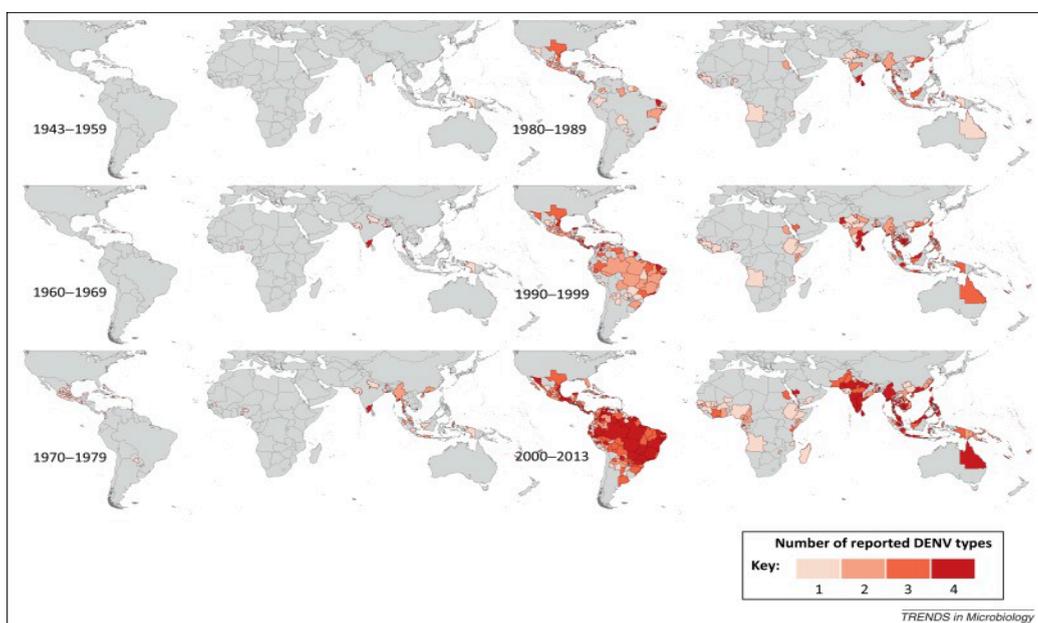


Figure 15 : Co-circulation des sérotypes de DENV de 1943 à 2013. Nombre cumulé des sérotypes de dengue circulant à un endroit donné pour chaque décennie depuis 1943 jusqu'à 2013. Carte extraite de Messina et al. 2014.

Il faut attendre les années 1990 pour assister à l'explosion du nombre de zones hyperendémiques de la dengue (Figure 15). La démocratisation des tests de sérotypage au cours des années 1980 coïncide avec cette explosion, mais elle ne peut l'expliquer à elle seule (Messina et al. 2014). Entre 2000 et 2013, la co-circulation des quatre sérotypes de dengue touche presque tout le Brésil, le Mexique, l'Inde, l'Indonésie, le Nord-Est de l'Australie, ainsi que l'Asie du Sud Est (Figure 15) (Messina et al. 2014). Bien que la Figure 15 semble indiquer que l'Afrique reste encore peu concernée par l'hyperendémisation de la dengue, l'incidence de la dengue en Afrique est très certainement sous-estimée (Gainor et al. 2022) du fait d'un manque de données (Messina et al. 2014; Saeed and Asif 2020). Ce nouveau changement de pattern épidémiologique de la dengue constitue la troisième et dernière phase de l'expansion de la dengue, celle dans laquelle nous nous trouvons actuellement, et ce, depuis les années 1990. Il s'agit de la phase de consolidation du statut pandémique et hyperendémique de la dengue dans la ceinture tropicale et subtropicale, s'accompagnant de sa propagation dans les zones périurbaines et même rurales à partir des grands centres urbains (Brady and Hay 2020). Ces derniers, de par leur taille et de par l'hyperendémicité de la dengue qui y règne, constituent une source intarissable pour l'importation des cas de dengue à leurs périphéries semi-urbaines, et même rurales. Les principaux facteurs expliquant cette troisième phase sont les mêmes que ceux de la phase précédente, mais en plus intenses (Saeed and Asif 2020). Une parfaite illustration de l'intensification de ces facteurs est donnée par l'augmentation drastique du nombre d'aires de répartition de la dengue et des *Ae. aegypti* à partir des années 1990 (Figure 16) (Brady and Hay 2020). En 1997, *Ae. aegypti* et la dengue se répartissaient dans l'ensemble des tropiques et largement dans les zones subtropicales, avec plus de 2,5 milliard de personnes vivant en zone à risque, soit 42% de la population mondiale (Saeed and Asif 2020). Ce nombre a presque doublé en une décennie, avec 4 milliards de personnes vivant en zone à risque au début des années 2010 (Brady et al. 2012). Cette incroyable augmentation est également due à la conquête nouvelle des aires périurbaines et rurales par la dengue, notamment grâce aux *Ae. albopictus*. Ce vecteur, dont la plasticité écologique permet de faire un pont entre zones urbanisées et zones rurales, a connu une expansion fulgurante de son aire de répartition depuis l'Asie du Sud-Est au cours de ces 50 dernières années, notamment via l'acheminement maritime de pneus usés entre les pays occidentaux et l'Asie, et est aujourd'hui retrouvés sur la plupart des continents (Paupy et al. 2009; Rezza 2012).

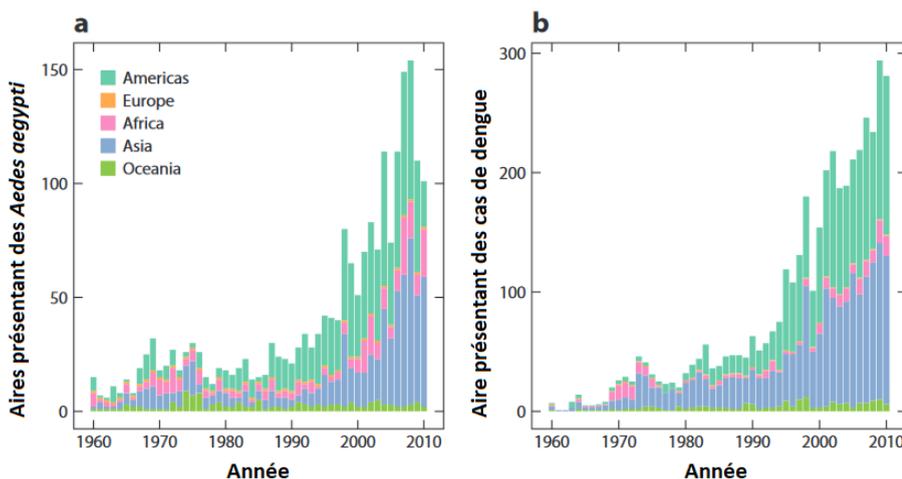


Figure 16 : Évolution de la répartition mondiale de la dengue et de son vecteur principal *Ae. Aegypti*. Les graphiques recensent le nombre global d'aires de répartition présentant des moustiques *Ae. Aegypti* d'une part (a) et des cas de dengue d'autre part (b), chaque année de 1960 à 2010. Graphiques extraits et traduits à partir de Brady and Hay 2020.

L'Histoire de l'humanité a ainsi influencé l'histoire de la dengue et de ses vecteurs moustiques. Réciproquement, la dengue et autres MTV ont pu jouer un rôle, parfois majeur, dans notre Histoire. Toutefois, il serait inexact de penser qu'elles ne laissent plus leurs empreintes sur notre présent et qu'elles n'impacteront plus notre avenir. La charge globale, le coût financier, et l'impact en Santé Publique engendrés par la dengue peuvent encore participer à contraindre l'Histoire de certains pays, notamment les pays les plus pauvres et dès lors, les plus vulnérables.

3.1.2. Conséquences mondiales de la dengue en chiffres clés

La dengue est l'arbovirose la plus répandue au monde avec la moitié de la population mondiale vivant en zone à risque (Messina et al. 2019) (Figure 17). Ubiquitaire dans la ceinture tropicale et dans la majorité des zones subtropicales, (Bhatt et al. 2013) son aire de répartition s'étend sur 128 pays différents (Brady et al. 2012) (Figure 17).

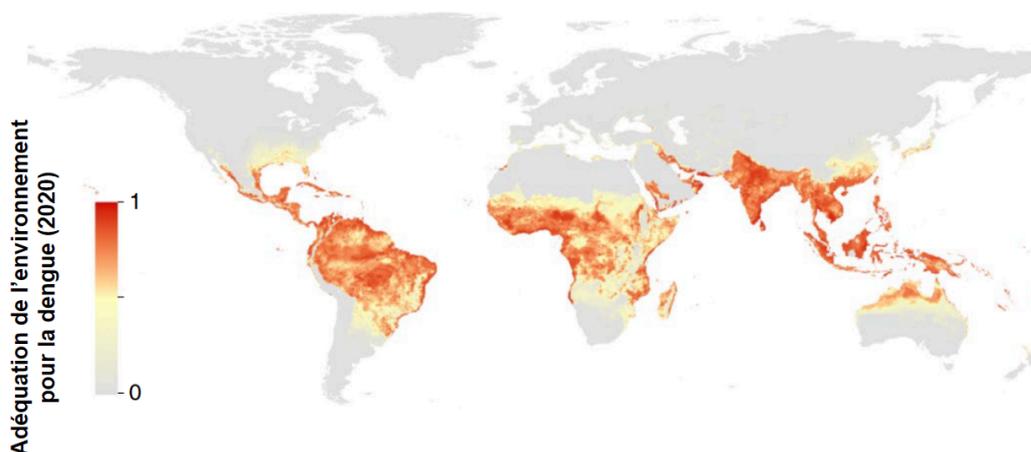


Figure 17 : Zones à risque de dengue en 2020. Cette carte présente les lieux regroupant les conditions environnementales propices à la survenue ou le maintien d'épidémies de dengue en 2020. Carte extraite et traduite à partir de (Messina et al. 2019).

Dans ces pays où vivent 3,97 milliards de personnes, près de la moitié de la population vit dans les plus hauts-lieux d'incidence et de circulation de la dengue, à savoir les zones urbaines et périurbaines comprenant respectivement 824 millions et 763 millions d'habitants (Brady et al. 2012). Responsable de 390 millions de nouveaux cas chaque année, dont 96 millions de cas symptomatiques, la dengue est aussi l'une des arboviroses les plus incidentes au monde (Bhatt et al. 2013) (Figure 18). L'Asie comptabilise 70% des cas symptomatiques de dengue, dont 33 millions de cas en Inde à elle seule, l'Amérique 14 %, dont plus de la moitié au Brésil et au Mexique, et l'Afrique 16%, avec une répartition très hétérogène au sein du continent (Bhatt et al. 2013) (Figure 18). Chaque année, le nombre de cas de dengue sévère est estimé à 500 000, dont 10 000 à 40 000 ont une issue fatale directement imputable à la dengue (Stanaway et al. 2016; WHO 2020c; WHO 2023; CDC 2023). Le taux de mortalité lié à la dengue est plus élevé chez les jeunes enfants et chez les personnes âgées, la plupart de ces décès survenant en Asie (Stanaway et al. 2016). Plus généralement, parmi les 128 pays qui présentent des cas de dengue, les plus impactés en

termes de nombre de cas, de sévérité et de taux de mortalité sont les pays à faibles revenus et revenus intermédiaires (Stanaway et al. 2016). D'autres facteurs que les paramètres socio-économiques aggravent le risque d'une incidence élevée de dengue, et permettent d'expliquer en partie la répartition mondiale actuelle de la maladie. Par exemple, les fortes précipitations, la température, le degré d'urbanisation d'une aire, et son niveau de connectivité sont autant de facteurs qui facilitent significativement la diffusion de la dengue et donc le risque d'une incidence accrue (Bhatt et al. 2013).

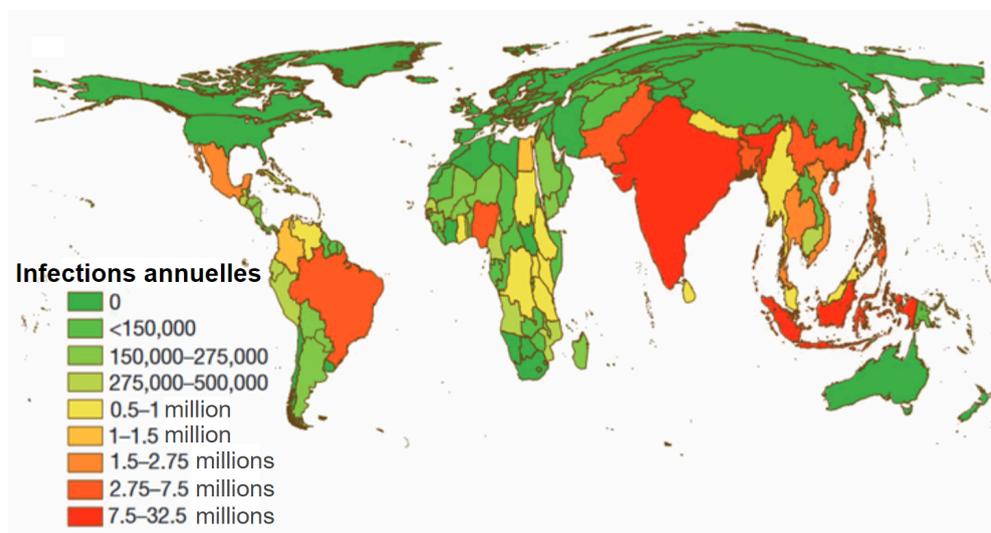


Figure 18 : Charge globale de la dengue en 2010. Cartogramme du nombre annuel d'infections pour tous les âges en proportion de la zone géographique nationale ou infranationale (Chine). Carte extraite et traduite à partir de Bhatt et al. 2013.

Une grande incertitude sur le nombre annuel de décès directement liés à la dengue persiste du fait d'un manque de données dans certains pays hautement endémiques, comme en Indonésie par exemple, ou dans certains pays d'Asie centrale (Brady et al. 2012; Stanaway et al. 2016). Par ailleurs, et comme expliqué précédemment, les données concernant la dengue sur le continent africain sont très limitées pour diverses raisons dont le manque de moyens financiers et humains, ainsi que la confusion diagnostique entre dengue et malaria (Gainor et al. 2022). Il est certain que l'appréciation de la répartition et de l'incidence mondiale de la dengue s'en trouve impactée, avec notamment une profonde mésestimation des nombres de cas de dengue symptomatiques, mortels, et même asymptomatiques à l'échelle locale, mais aussi globale. Pourtant invisibles à l'œil nu, les 294 millions des cas asymptomatiques par an estimés par l'équipe de Bhatt (Bhatt et al. 2013), n'en restent pas moins d'une grande importance dans la transmission de la dengue (Duong et al. 2015). En effet, malgré une virémie en moyenne plus faible chez les personnes asymptomatiques, elles peuvent transmettre tout aussi efficacement le DENV aux moustiques *Ae. aegypti* que les personnes présymptomatiques, et bien mieux que les personnes symptomatiques (Duong et al. 2015) (Figure 19). Ne pas les prendre en compte ou les sous-estimer fausse donc les modèles prédictifs de l'incidence présente et future de la dengue, et par là même les estimations de son coût, que ce soit le coût humain ou économique, à l'échelle locale ou globale.

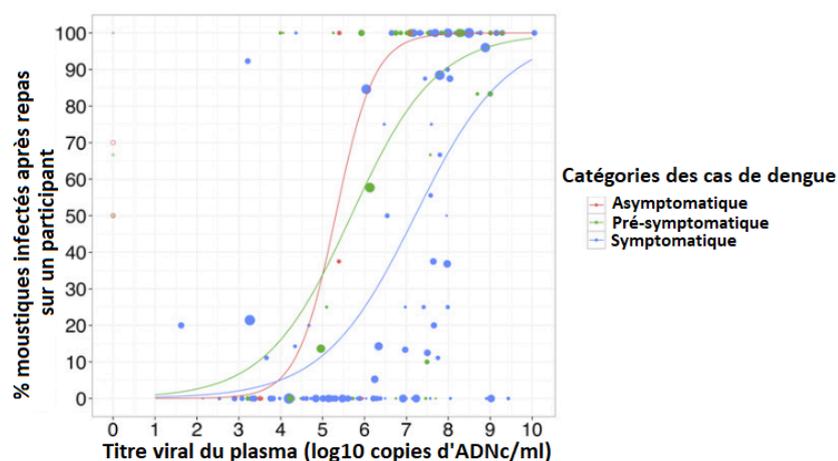


Figure 19 : Profils dose-réponse par catégorie de maladie. Le pourcentage de moustiques *Ae. aegypti* infectés est indiqué en fonction de la virémie (mesurée en copies d'ADNc par millilitre de plasma) pour chaque participant à l'étude ayant permis l'alimentation directe des moustiques. La taille du point est proportionnelle au nombre de moustiques testés par participant. L'étude comprend 8 participants asymptomatiques, 37 présymptomatiques et 117 symptomatiques. Les courbes sont des régressions logistiques des données (excluant les participants avec une virémie indétectable). Graphique extrait et traduit à partir de Duong et al. 2015.

L'estimation des coûts économiques de la dengue est difficile à appréhender, sa dimension multifactorielle engendrant des résultats très disparates entre les différentes études. En résumé, les estimations de la prévalence, de la mortalité, et de la morbidité des cas de dengue sont traduites économiquement en des journées de travail manquées, une baisse de productivité, des coûts liés au décès, ou encore des frais médicaux (détection, soins...) (Qureshi 2020). Elles dépendent donc, entre autres, des estimations réalisées en amont quant aux nombres de cas de dengue et à leur sévérité, mais également du montant des frais de santé et de l'accessibilité des infrastructures de soins, facteurs intrinsèques à la politique de Santé Publique de chaque pays. En effet, les frais médicaux associés à une infection par la dengue sont tributaires du niveau de vie moyen dans chaque pays, et aussi du type de cas de dengue, un cas ambulatoire n'induisant pas autant de frais qu'un cas sévère par exemple. Les frais moyens pour un cas de dengue vont de 56\$ pour les pays en développement d'Afrique subsaharienne à 1146\$ pour les pays très développés tels que les USA et l'Australie (Shepard et al. 2016). De façon globale, il a été estimé que la dengue coûterait entre 8,9 et 39,3 milliards de dollars chaque année (Selck et al. 2014; Shepard et al. 2016), et ce sans compter les symptômes chroniques handicapants faisant suite à la dengue et le financement des programmes de LAV ou de recherche de traitements préventifs et curatifs contre la dengue (Qureshi 2020). Son coût est plus élevé que celui de l'Hépatite B, de l'encéphalite japonaise, et des infections des voies respiratoires supérieures (hors COVID-2019) en Asie du Sud Est, plus élevé que le coût du papillomavirus en Amérique, et aussi deux fois plus élevé que celui de la tuberculose en Inde (Qureshi 2020). Près de 40% des dépenses globales annuelles pour la dengue sont estimées avoir lieu en Asie du Sud Est, 25% en Amérique, et 22% dans la région ouest du Pacifique (Selck et al. 2014). La dengue

peut ainsi représenter un facteur majeur de ralentissement du développement de certains pays, notamment pour les pays à revenus faibles ou intermédiaires, qui sont les plus touchés par la dengue, comme l'Inde par exemple. Cela est d'autant plus vrai que les pays les plus pauvres sont souvent ceux avec les systèmes de protection sociale et de santé les plus précaires. Par exemple, pour un cas de dengue à Puerto Rico, bénéficiaire de la Sécurité Sociale des États-Unis, le ménage prend à sa charge 48% du coût total, l'employeur 7%, l'assurance 24%, et le gouvernement 22%, tandis qu'en Inde, le ménage paie 80% de coût total, appauvrissant encore plus une population déjà parmi les plus pauvres (Qureshi 2020).

3.1.3. Lutte contre la dengue

3.1.3.1. Traitements préventifs

Malgré l'augmentation exponentielle des financements de recherche au cours des deux dernières décennies, aucun vaccin et aucun traitement antiviral d'origine synthétique ou naturelle n'a encore été unanimement approuvé pour combattre efficacement la dengue et sa propagation (Horstick et al. 2015). L'entrave principale au développement d'un vaccin efficace est la nécessité d'une stimulation immunitaire tétravalente, donc efficace contre les quatre sérotypes du DENV, qui perdure dans le temps. Ce paramètre est d'ailleurs un des points faibles du seul vaccin contre la dengue jusqu'alors commercialisé, le vaccin CYD-TDV (de l'anglais « Chimeric Yellow Fever 17D virus-Tetravalent Dengue Vaccine »), qui ne permet qu'une faible immunisation de 34,7% contre le DENV-2 et de 43% contre les formes sévères associées à ce même sérotype (WHO 2018b; Redoni et al. 2020). Ce vaccin tétravalent est un vaccin chimérique conçu sur la base structurelle de la souche vaccinale vivante atténuée 17D de la fièvre jaune, pour laquelle la séquence prM/E est remplacée par celles des quatre sérotypes du DENV. Plus connu sous son nom commercial Dengvaxia®, le vaccin de Pasteur-Sanofi a connu une histoire tourmentée en raison de l'augmentation du risque d'hospitalisation et d'apparition d'une forme sévère lors d'une primo-infection par le DENV chez les personnes vaccinées (Wilder-Smith 2020). Malgré les controverses autour de ce vaccin, il est aujourd'hui autorisé dans une vingtaine de pays (Fatima and Syed 2018; Thomas and Yoon 2019), mais l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et la Haute Autorité de Santé en France préconisent son utilisation uniquement dans le cas de personnes vivant en zone endémique de la dengue, âgées de 9 à 45 ans, et ayant déjà eu une première infection par la dengue avant la vaccination (WHO 2018b; HAS 2021).

Diverses approches sont investiguées pour mettre au point un vaccin tétravalent dont l'utilisation pourrait convenir et protéger une plus large partie de la population que ce qui est permis actuellement par le vaccin CYD-TDV, notamment en termes d'âge et de statut sérologique pré-vaccinal vis-à-vis de la dengue. Il s'agit entre autres des vaccins vivants à virus atténués, dits de seconde génération, car utilisant cette fois-ci la base structurelle du DENV (donc avec ses propres protéines non-structurelles), des vaccins à virus inactivés, des vaccins sous-unitaires recombinants, des vaccins à vecteur viral, et des vaccins à ADN (Deng et al. 2020). Chacune de ces approches a au moins un vaccin en phase d'essai clinique I à III (Redoni et al. 2020; Deng et al. 2020) (Figure 20). Depuis le début de la rédaction de ce manuscrit de thèse, un vaccin a passé avec succès la phase III des essais cliniques (Patel et

al., 2022). Il s'agit du vaccin TDV (Figure 20), aussi connu sous le nom de TAK-003, ou sous son nom commercial QDenga®. Ce vaccin tétravalent à virus vivants atténués du groupe pharmaceutique Takeda est constitué de quatre souches chimériques de la dengue (TDV-1 à TDV-4), une représentante de chaque sérotype (Osorio et al. 2011; Osorio et al. 2015). Elles sont toutes basées sur le squelette génomique de la souche virale atténuée de DENV-2 PDK53 dont les séquences génomiques des protéines PrM et E ont été remplacées afin de correspondre à chaque sérotype (Butrapet et al. 2000; Osorio et al. 2011; Osorio et al. 2015). Par ailleurs, des stratégies innovantes d'immunisation basée sur l'utilisation de la protéine NS1 sont en train de voir le jour, avec par exemple l'utilisation des particules pseudo-virales, des séquences d'ADN, des ARN messagers, des peptides synthétiques, ou encore des antigènes viraux (Liu et al. 2016; Lebeau et al. 2021). Un autre stratégie innovante serait de s'appuyer sur l'inactivation chez les moustiques vecteurs de protéines impliquées dans leur propre infection par le DENV, en rendant ces inhibiteurs accessibles dans le sang de l'hôte humain (Liu et al. 2016). Pour finir, la salive des moustiques à la composition très complexe (Ribeiro et al. 2007) attire, elle aussi, l'intérêt des chercheurs depuis quelques années pour son potentiel en tant que vaccin. Certaines protéines présentes dans celle-ci facilitent l'infection des cellules hôtes par la dengue et l'apparition de formes sévères chez celui-ci, notamment du fait de modulations de son système immunitaire (Schmid et al. 2016; Pingen et al. 2016). Un vaccin dirigé contre ces protéines empêcherait ainsi cet effet facilitant (Manning et al. 2018).

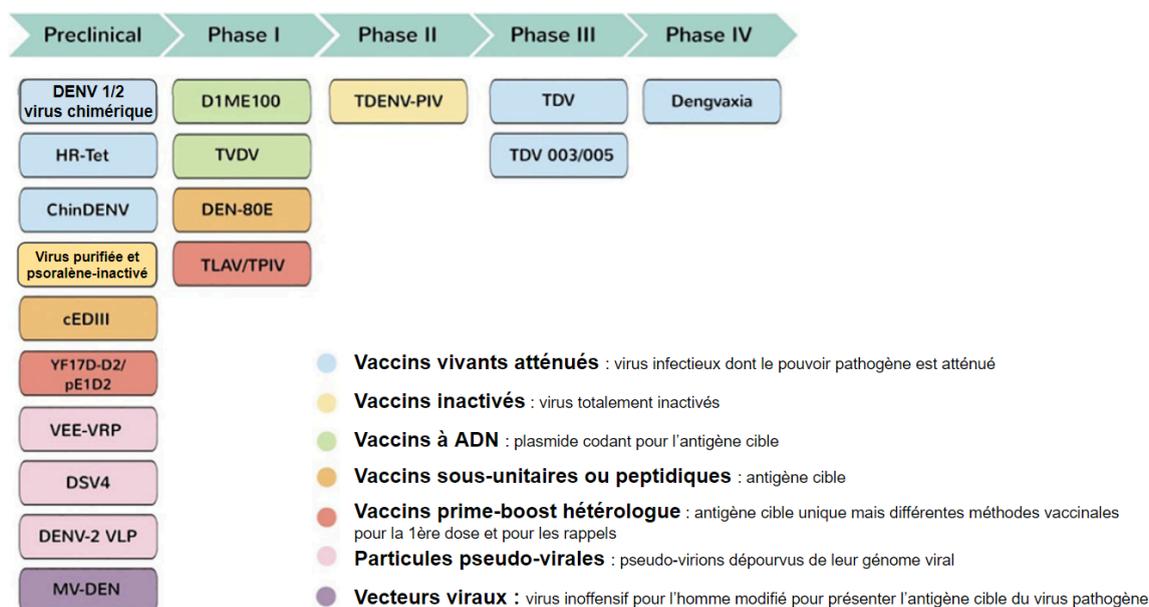


Figure 20 : Liste des vaccins contre la dengue selon leur phase de tests préclinique ou clinique en 2020. Figure extraite, traduite et modifiée à partir de Redoni et al. 2020.

3.1.3.2. Traitements curatifs

En ce qui concerne les traitements thérapeutiques, l'efficacité de nombreux composés antiviraux à action directe (AAD) (i.e. dirigés directement contre les protéines virales) ciblant chacune des protéines structurales et non-structurales du DENV a été prouvée *in cellulo*. En tête des protéines virales du DENV et de leurs fonctions les plus ciblées par ces AAD se trouvent la protéine structurale d'enveloppe (E) pour son rôle lors de l'entrée

de la particule virale infectieuse dans la cellule hôte, la protéine multifonctions non-structurale 5 (NS5), pour son haut degré de conservation et pour son rôle d'ARN polymérase ARN-dépendante, ainsi que l'activité conjointe sérine protéase des protéines non structurales 3 (NS3) et 2B (NS2B) (Troost and Smit 2020). Cependant, presque aucun de ces AAD n'a fourni de résultats satisfaisants *in vivo* sur modèle murin, et un seul ciblant l'ARN polymérase ARN-dépendante a fait l'objet d'un essai clinique, mais encore une fois sans résultats probants (Troost and Smit 2020). Moins sujets à la mise en place de résistance virale que les AAD, d'autres antiviraux, cette fois-ci dirigés contre l'hôte, existent (ADH). Ils ciblent des voies métaboliques, des voies de signalisation cellulaire de l'hôte qui sont contournées ou détournées par le virus à son profit, et ce, à différentes étapes de son cycle de réplication. Les ADH ciblant des enzymes intervenant dans les voies de repliement et de maturation des protéines (α -glucosidase par exemple), et de biosynthèse nucléotidiques (inosine monophosphate déshydrogénase par exemple) font partis des ADH les plus investigués car leurs cibles ont un rôle capital dans le cycle de réplication viral (Troost and Smit 2020). Peu d'ADH ont été testés cliniquement et aucun n'a franchi cette étape avec succès. Un antiviral efficace doit l'être si possible contre plusieurs sérotypes du DENV, être stable pour être acheminé à travers tout le corps en conservant son activité, ne pas être toxique aux doses efficaces, et ne pas induire trop rapidement la mise en place de mécanismes de résistance de la part du virus (Troost and Smit 2020). Les études *in vivo* et *in vitro* actuelles combinent différents AAD et ADH aux cibles diverses, associant ainsi efficacité synergique et meilleure protection face aux mécanismes de résistance virale (Troost and Smit 2020).

3.1.3.3. Méthodes de protection et lutte antivectorielle

Pour l'instant, le meilleur moyen de lutter efficacement contre la dengue est d'avoir recours à la LAV. Tout d'abord, il existe des moyens individuels ou collectifs de protection permettant à la population humaine de prévenir les piqûres des moustiques femelles. Il s'agit notamment des moustiquaires simples ou imprégnées d'insecticides et de divers types de répulsifs. Ces méthodes de protections individuelles et collectives ont déjà montré être efficaces, avec par exemple un recul significatif de l'incidence du paludisme grâce à la distribution et à l'utilisation de moustiquaires imprégnées en Inde (Jana-Kara et al. 1995; Dev and Dash 2008). Pour ces méthodes de protection préventives, la sensibilisation de la population est primordiale afin d'obtenir son efficace participation.

Afin de réduire la densité de la population vectrice, que ce soit au stade larvaire ou adulte, il existe de nombreuses méthodes de LAV de natures diverses; elles peuvent être physiques, chimiques, ou encore biologiques. Elles s'appuient soit sur la destruction ou la modification des caractéristiques biotiques ou abiotiques de l'environnement des moustiques, soit sur l'utilisation de moustiques transgéniques ou paratransgéniques.

- **La lutte physique**

Elle consiste en la destruction des milieux de vie des moustiques. Un exemple connu est l'assèchement des zones marécageuses, et donc l'élimination des gîtes larvaires qu'elles représentent, dans le but d'endiguer le paludisme comme cela a été le cas avec les marais pontins près de Rome en 1932, et de nouveau en 1962 (Sharma 2014).

- **La lutte chimique**

Elle va quant à elle permettre l'élimination des moustiques via l'apport de substances chimiques synthétiques insecticides dans leur environnement. Il existe quatre grandes familles d'insecticides : les organochlorés (comprenant deux groupes : les cyclodiènes telle que la dieldrine, et les molécules de "type dichlorodiphényltrichloroéthane" (DDT) tel que le DDT lui-même), les pyréthrinoïdes (dont la perméthrine et la deltaméthrine), les organophosphorés (dont le malathion), ou les carbamates (dont le carbofurane) (Darriet 2007; Gan et al. 2021). Ces molécules agissent au niveau du système nerveux du moustique en perturbant la régulation de la transmission de l'influx nerveux appelé aussi potentiel d'action. Les molécules de type DDT et les pyréthrinoïdes vont bloquer les canaux sodiques voltage dépendant en position ouverte, position dans laquelle ils permettent la propagation du potentiel d'action (Davies et al. 2007). Leur constante ouverture induite par ces insecticides empêche alors l'arrêt de l'influx nerveux, induisant alors la tétanie puis la mort du moustique (Davies et al. 2007). Les organophosphorés et les carbamates modifient le site actif de l'enzyme acétylcholinestérase qui ne peut alors plus réguler la présence de l'acétylcholine par hydrolyse au niveau des jonctions synaptiques ou neuromusculaires (Fukuto 1990). L'accumulation de ce neurotransmetteur entraîne alors un influx nerveux continu conduisant à la tétanie et à la mort du moustique (Fukuto 1990). A l'inverse, les cyclodiènes (dont la dieldrine) vont entraîner la mort du moustique en le paralysant, ie. en empêchant le potentiel d'action de se propager. En temps normal, le neurotransmetteur inhibiteur GABA (acide γ -aminobutyrique) se fixe aux récepteurs GABA_A, ce qui permet l'ouverture d'un pore laissant entrer les ions chlorure qui inhibent le potentiel d'action. Or, les cyclodiènes vont modifier le bon fonctionnement des récepteurs GABA_A en les maintenant ouverts, ce qui induit une constante inhibition du potentiel d'action, et donc la paralysie du moustique le conduisant à sa mort (Darriet 2007). La lutte chimique comprend aussi des inhibiteurs de la croissance des moustiques, comme le novaluron, affectant les moustiques au cours de leurs mues larvaires ou de leur nymphose (Herath et al. 2024).

- **La lutte biologique**

Elle utilise des éléments biotiques naturellement efficaces contre les moustiques. Elle peut notamment utiliser des prédateurs ou des parasites entomopathogènes des moustiques afin de diminuer la densité de la population. Les prédateurs sont généralement utilisés contre les stades de vie aquatiques des moustiques et peuvent de ce fait être des poissons, dont les tilapias et les guppys par exemple, mais aussi des amphibiens, des crustacés, ou encore des insectes comme les larves de libellules (Kendie 2020; Dambach 2020). Les parasites utilisés pour la lutte biologique sont de natures diverses: bactéries, virus, nématodes, ou encore champignons (Kendie 2020). Par exemple, les bactéries entomopathogènes *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) sont utilisées comme larvicides puisqu'elles produisent naturellement quatre toxines efficaces contre les moustiques sensibles (Vachon et al. 2012). D'autres molécules issues de plantes, de champignons ou d'autres bactéries peuvent également être utilisées en tant que bio-insecticides (Mossa et al. 2018; Gupta et al. 2019).

Il existe aussi des méthodes biologiques qui permettent de réduire la population vectrice naturelle en libérant des moustiques mâles transgéniques sur le terrain. Pour la

technique de l'insecte stérile (TIS), ces mâles peuvent avoir été rendus stériles par irradiation, par exemple, avant d'être libérés sur le terrain pour aller s'accoupler avec les femelles des populations naturelles, rendant ainsi les œufs non viables (Knipling 1955; Knipling 1959). La TIS est notamment étudiée à La Réunion pour faire face aux épidémies d'arbovirus causées par les moustiques vecteurs *Ae. albopictus* (Gouagna et al. 2020) Une autre technique consiste en la libération d'insectes porteurs d'un gène létal dominant (RIDL pour Release of Insects carrying a Dominant Lethal gene en anglais). Brièvement, une fois qu'une souche RIDL homozygote avec une bonne fitness est obtenue, elle peut être élevée en masse en insectarium en présence d'un suppresseur du système RIDL. Les mâles sont ensuite triés et relâchés sur le terrain pour s'accoupler avec les femelles des populations naturelles et faire ainsi diminuer la population vectrice, leur descendance ne pouvant pas atteindre l'âge adulte du fait de l'absence du suppresseur RIDL dans la nature (Thomas et al. 2000; Carvalho et al. 2015). Ces deux techniques nécessitent un élevage de masse, un tri des moustiques selon leur sexe pour sélectionner uniquement les mâles, et que ces mâles aient une fitness suffisante pour rivaliser avec les mâles des populations naturelles dans leur succès d'accouplement. Pour finir, la paratransgénèse est une technique de lutte contre les maladies à transmission vectorielle qui est en plein essor à travers le monde. Elle consiste en la libération de moustiques vecteurs à l'holobionte modifié par transinfection de souches bactériennes naturellement absentes chez la population vectrice cible, et ayant pour effet une diminution de sa compétence vectorielle. C'est le cas de certaines souches de *Wolbachia* qui sont de plus en plus utilisées dans la lutte contre les arbovirus transmis par les *Ae. aegypti* par le Programme Mondial Anti-Moustique (World Mosquito Program 2023). La technique permet de remplacer la population vectrice naturelle par une population infectée avec une souche de *Wolbachia* inhibitrice d'un ou plusieurs arbovirus d'intérêt par interférence virale, remplacement se faisant grâce à l'incompatibilité cytoplasmique induite par *Wolbachia* (Figure 21) (Hoffmann et al. 2011; Ferguson et al. 2015; Flores and O'Neill 2018). Cette technique a notamment montré être efficace à Townsville en Australie, puisque l'incidence de la dengue a pu être réduite de 95% suite à la libération des *Ae. aegypti* paratransgéniques pendant plusieurs années (O'Neill et al. 2019; Ogunlade et al. 2023)).

La méthode wolbachia

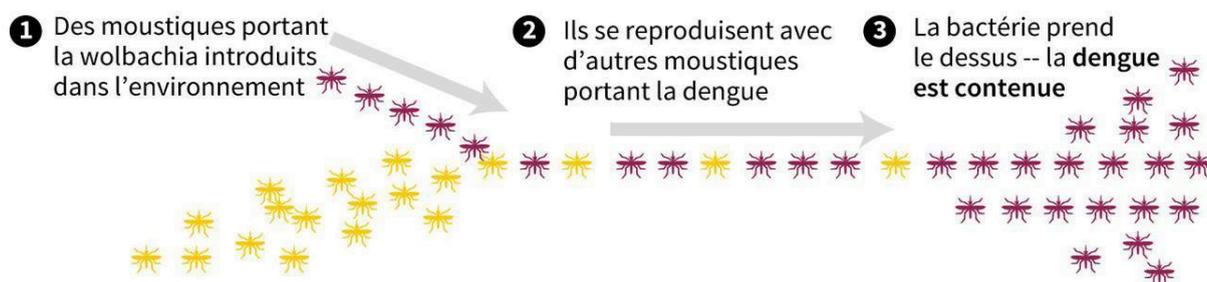


Figure 21 : Méthode de paratransgénèse dans la lutte contre la dengue utilisant la transinfection de la bactérie *Wolbachia* au sein des moustiques vecteurs. 1. La lignée de moustiques transinfectés est relâchée dans l'environnement. 2. Les moustiques de la population vectrice naturelle et de la lignée transinfectée se reproduisent. 3. L'incompatibilité cytoplasmique induite par *Wolbachia* entraîne le remplacement de la population vectrice naturelle par la lignée transinfectée. La souche de *Wolbachia* induisant également une interférence avec certains parasites à transmission vectorielle, ici le virus de la dengue pris pour exemple, l'incidence de la maladie associée au parasite diminue après ce remplacement de la population vectrice. Figure extraite du site web du Programme Mondial Anti-Moustique.

Les stratégies de LAV sont diverses, et le choix de celle(s) à adopter va reposer, entre autres, sur le stade de vie, l'éthologie et l'écologie du vecteur visé ainsi que sur les patterns épidémiologiques de la ou des MTV véhiculées par ce vecteur. Il est important de noter que les différentes stratégies de LAV ne s'excluent pas mutuellement, bien au contraire. Par exemple, à La Réunion la stratégie de LAV employée depuis l'épidémie de CHIKV qui sévit en 2006-2007 consiste à l'utilisation de larvicides, d'adulticides, à la destruction des gîtes larvaires, mais également à des enquêtes épidémiologiques de terrain, et à la sensibilisation et l'implication de la population locale dans les mesures préventives (Dehecq et al. 2011). L'historique de la dengue montre en effet qu'il n'existe pas de solution unique, et que les meilleures chances de combattre cette maladie sont de multiplier les différentes approches : prévention et LAV et, bientôt, thérapeutique. Par ailleurs, du fait de leur toxicité, de leur accumulation dans les chaînes trophiques, de leur forte rémanence, et de l'apparition de nombreuses résistances chez les vecteurs, résistance pouvant même parfois entraîner une augmentation de la compétence vectorielle des moustiques à transmettre certaines MTV (Moltini-Conclois et al. 2018), les insecticides vont être de moins en moins utilisés au profit des méthodes novatrices de transgénèse et paratransgénèse. Cependant, ces termes de moustiques transgéniques ou paratransgéniques peuvent parfois effrayer les populations locales, rendant difficile le déploiement de ces techniques très prometteuses. De ce fait, la communication autour des MTV et des LAV est primordiale pour l'acceptation des stratégies choisies par la population locale et pour son implication. Par ailleurs, les moustiques n'ont pas de frontières et il en va de même pour les maladies qu'ils véhiculent. C'est pourquoi la collaboration internationale quant à la surveillance entomologique et aux déploiements de programmes de LAV globaux est d'une importance capitale dans la prévention et la gestion des épidémies associées à ces maladies, comme en témoigne la création en 2017 du World Mosquito Program (World Mosquito Program 2023). Cet effort international doit aussi inclure la recherche au sens large sur la dengue, que ce soit la recherche appliquée ou la recherche fondamentale. En effet, tous types de recherche visant à mieux comprendre le DENV, les interactions qu'il entretient avec ses hôtes, et son évolution permettent de définir de nouvelles voies préventives ou thérapeutiques, et d'améliorer les différentes méthodes de contrôle. Nos connaissances au sujet de la dengue sont donc essentielles afin de réduire les coûts humains et économiques associés à cette pandémie au devenir très alarmant. Nous allons donc maintenant décrire de façon plus précise ce virus.

3.1.4. Structure, diversité, et cycle du DENV

3.1.4.1. Organisation structurale et fonctionnelle du DENV

La particule virale du DENV, ou virion, de 50 nm de diamètre dans sa forme mature, est constituée dans sa partie la plus externe par une bicouche lipidique originaire de l'hôte dans laquelle sont enchâssées les glycoprotéines structurales virales d'enveloppe (E) et de membrane (prM/M) (Figure 22-A). Cette enveloppe entoure la nucléocapside virale composée d'une couche de protéines structurales de la capsid (C) renfermant en son centre un ARN génomique viral simple brin positif, d'environ 10 700 bases nucléotidiques (Kuhn et

al. 2002; Ma et al. 2004) (Figure 22-A). La séquence de cet ARN génomique viral commence par une région non codante en 5' (5'UTR), suivie dans l'ordre des séquences codantes des trois protéines structurales C, prM/M, et E, puis celles des sept protéines non-structurales (NS) NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b, NS5 (Figure 22-B). Puis, le génome du DENV se termine par une partie non-codante en 3' (3'UTR), ayant pour spécificité de ne pas présenter de queue poly-A (Figure 22).

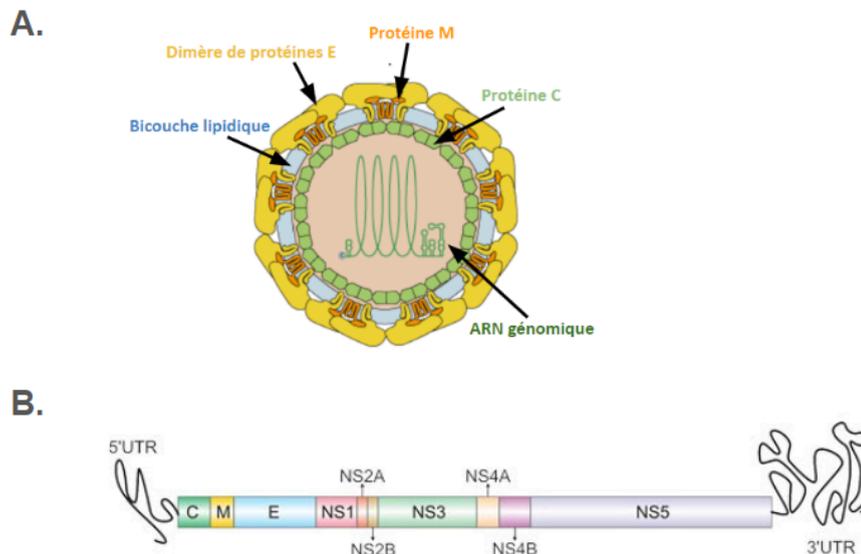


Figure 22 : Organisation structurale du virion et du génome viral de la dengue. Figure A extraite et modifiée à partir de ©ViralZone 2016 (Swiss Institute of Bioinformatics) et Figure B extraite de <https://www.cusabio.com/infectious-diseases/dengue-virus.html>.

D'un point de vue fonctionnel, la compréhension des rôles de chaque partie et chaque protéine du génome viral du DENV continue toujours d'être approfondie, mais voici brièvement les fonctions majeures de chacune d'entre elles. La coiffe de la partie 5'UTR aide à stabiliser l'ARN et à initier sa traduction en protéine. La séquence 5'UTR a aussi un rôle dans la réplication virale notamment via le recrutement de l'ARN polymérase ARN-dépendante (NS5). La protéine C, en plus de son rôle d'emballer l'ARN viral pour former la nucléocapside (Ma et al., 2004), joue un rôle dans l'initiation de la traduction avec la reconnaissance du codon start AUG. Le peptide pr de la protéine de membrane immature, prM, va permettre de dissimuler le peptide de fusion de la protéine E pour ne pas qu'il fusionne avec la membrane hôte au cours de la maturation du virion. Ce peptide va ensuite être clivé par la furine au sein du réseau transgolgien pour laisser place à la protéine mature M, au rôle essentiellement structurale (Chambers 1960; Li et al. 2008). La protéine E est la plus exposée à la surface du virion mature (Zhao et al. 2021), et a de ce fait un rôle primordial dans la reconnaissance et l'interaction avec la cellule hôte. Elle intervient dans la liaison avec les récepteurs de l'hôte, possède le peptide permettant la fusion du virion avec la membrane de la cellule hôte (Zhao et al. 2021), et certaines de ces glycosylations ont très certainement un rôle dans le tropisme cellulaire et l'infectiosité du DENV chez ses hôtes (Mondotte et al. 2007). La protéine NS1 existe sous différentes formes, allant du monomère

dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) à l'hexamère sécrété dans le milieu extracellulaire, en passant par les dimères retrouvés sur les faces internes des membranes du RE et de l'appareil de Golgi, et sur la face membranaire externe des cellules infectées par le DENV (Muller and Young 2013). La protéine NS1 a un rôle dans la réplication et l'assemblage viral (Scaturro et al. 2015; Płaszczycza et al. 2019), mais également dans l'évasion du système immunitaire hôte (Lebeau et al., 2021). La protéine NS2a contribue notamment à la réplication, l'assemblage et la sécrétion des particules virales, ainsi qu'à l'évasion du système immunitaire inné en inhibant l'expression des interférons- β (Muñoz-Jordan et al. 2003; Xie et al. 2013; Xie et al. 2015). La protéine NS2b est cofacteur de la protéase virale NS3 (Falgout et al. 1991; Yusof et al. 2000), avec la formation du site actif en son centre et l'ancrage du complexe protéasique à la membrane du RE par ses parties distales hydrophobes (Falgout et al. 1991; Clum et al. 1997; Erbel et al. 2006; Aleshin et al. 2007). La protéine NS3 a donc une activité protéasique par sa partie N-terminale (Chambers et al. 1990; Falgout et al. 1991) permettant de détacher toutes les protéines de la polyprotéine virale (Chambers et al. 1990; Falgout et al. 1991; Li et al. 2014). Elle est également importante dans la réplication virale et l'assemblage du virion via ses autres activités telles que celles d'ATPase/hélicase, de nucléoside tryptophatase, et d'ARN tryptophatase par sa partie C-terminale (Wang et al. 2009; Li et al. 2014). Les protéines NS4a et NS4b, en plus d'avoir un rôle dans l'évasion du système immunitaire de l'hôte (Muñoz-Jordan et al. 2003), participent toutes deux à la formation du complexe de réplication et à la réplication de l'ARN viral (Scaturro et al. 2015; Płaszczycza et al. 2019). La NS4a va également contribuer à la stabilité et la localisation périnucléaire de ce complexe de réplication (Teo and Chu 2014; Norazharuddin and Lai 2018), et la NS4b va, quant à elle, interagir avec l'hélicase de la NS3, permettant sa dissociation de l'ARN viral simple brin (Umareddy et al. 2006). La protéine NS5 est l'ARN polymérase ARN-dépendante virale, et a de ce fait un rôle essentiel dans la réplication de l'ARN du DENV (Davidson 2009). Elle intervient aussi dans le processus de coiffe de l'ARNm viral via ses activités de méthyltransférase et de guanylyltransférase (Liu et al. 2010), et pourrait également avoir un rôle dans l'inhibition des réponses antivirales de l'hôte (Norazharuddin and Lai 2018).

3.1.4.2. Phylogénie du virus de la dengue

Le DENV est subdivisé en quatre sérotypes, DENV- 1 à DENV-4, qui possèdent une homologie en acides aminés entre eux d'environ 60 %, et qui comprennent chacun différents génotypes (Vasilakis and Weaver 2008; Weaver and Vasilakis 2009) (Figure 23). Le DENV-1 compte 5 génotypes différents notés de I à V, le génotype III est celui regroupant les souches sylvatiques. Le DENV-2, quant à lui, possède le génotype sylvatique d'une part, et les deux génotypes épidémiques/endémiques nommés en fonction de la provenance des souches (bien que cela n'est plus vraiment de sens puisque les souches circulent maintenant largement tout autour du globe), et d'autre part le génotype américain et le génotype asiatique. Ce dernier comprend lui-même quatre lignées: la lignée cosmopolite, la lignée asiatique II, la lignée asiatique I, et la lignée du Sud Est asiatique/américaine. Le DENV-3 est

composé de quatre génotypes épidémiques/endémiques différents notés de I à IV. Très peu de souches sylvatiques ayant été trouvées pour le DENV-3, elles n'apparaissent pas dans les études phylogénétiques (Weaver and Vasilakis 2009; Stica et al. 2022). Pour finir, le DENV-4 possède un génotype sylvatique et trois génotypes épidémiques/endémiques notés de I à III. Il est dorénavant admis que les génotypes épidémiques/endémiques ont évolué au cours des quelques centaines dernières années à partir de souches virales progénitrices sylvatiques de façon indépendante pour chaque sérotype, mais aussi pour certains génotypes d'un même sérotype (Wang et al. 2000; Stica et al. 2022) (Figure 23). Cette diversification vers des génotypes épidémiques/endémiques s'est faite, entre autres, grâce aux espèces vectrices faisant le pont entre cycles sylvatique et urbain, et à l'urbanisation et la densité de population plus importante qui en a découlé (Wang et al. 2000; Moncayo et al. 2004; Vasilakis and Weaver 2008; Weaver and Vasilakis 2009; Stica et al. 2022). En revanche, la localité d'origine du DENV n'est pas encore élucidée, bien qu'il existe actuellement plus de preuves phylogénétiques, écologiques, et entomologiques pour une origine asiatique que pour une origine africaine (Wang et al. 2000; Moncayo et al. 2004; Vasilakis and Weaver 2008; Chen and Vasilakis 2011).

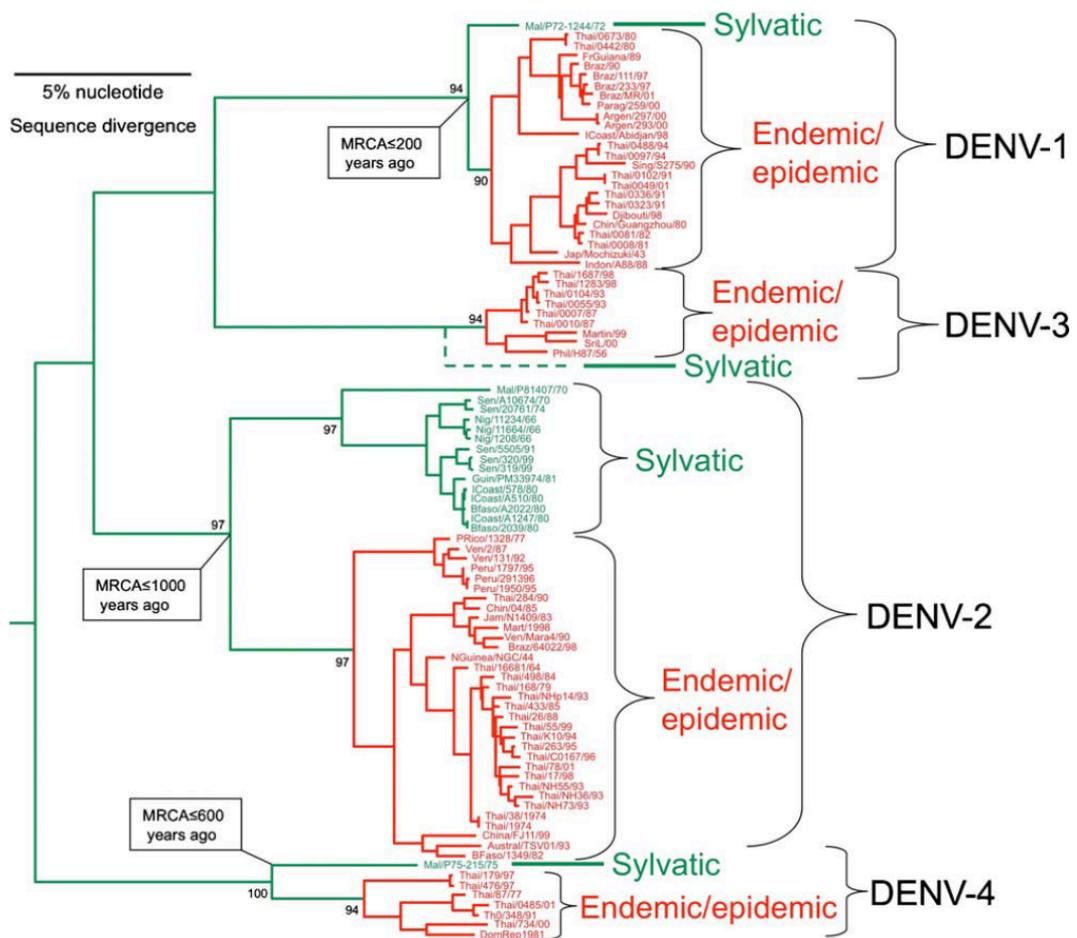


Figure 23 : Arbre phylogénétique des souches DENV des 4 sérotypes, dérivé des cadres de lecture ouverts complets disponibles dans la bibliothèque GenBank. La phylogénie a été déduite à l'aide d'une analyse bayésienne (1 million de réitérations) et toutes les branches horizontales sont mises à l'échelle en fonction du nombre de substitutions par site. Les valeurs de probabilité bayésienne sont indiquées pour les nœuds clés. Les souches de virus sont codées par pays de collecte abrégé/nom de la souche/année de collecte. La figure a été extraite et la légende traduite à partir de Weaver and Vasilakis 2009.

Cette importante diversité du DENV témoigne d'une grande capacité évolutive notamment liée à son taux de mutation, qui comme pour les autres virus ARN, est relativement élevé avec une moyenne d'une mutation par génome et par cycle de réplication (Drake and Holland 1999). Il est principalement attribué à sa polymérase ARN-dépendante (RdRp), sujette aux erreurs, créant au sein de chaque hôte des populations virales avec des variants, appelés quasi-espèces, différents de la souche parentale infectante majoritaire (Kurosu 2011), et qui peuvent avoir des répercussions sur la fitness de la population virale dans son ensemble, sur la transmission ou encore sur la sévérité de l'infection par le DENV (Coffey et al. 2008; Rodriguez-Roche et al. 2016; Cheng et al. 2022). Les études phylogénétiques de la dengue montrent des périodes relativement longues entre la divergence des lignées (Wang et al. 2000; Stica et al. 2022), suggérant une diversification intense suivie d'une extinction de nombreuses lignées (Weaver and Vasilakis 2009). Ce modèle "d'essor et effondrement" observé pour la dengue de façon globale à travers le temps est également retrouvé localement au cours d'épidémies en zone hyperendémique où le remplacement d'un sérotype par un autre impacte la diversité génétique des souches de chacun (Zhang et al. 2005). La diversification telle qu'elle est observée par les études phylogénétiques globales ou locales est en effet le résultat des contraintes exercées par de nombreux facteurs sur la diversité totale de la dengue. Ces facteurs sont notamment l'immunité de la population (à long terme pour un même sérotype et croisée envers les autres sérotypes), la fitness de la population virale, la capacité vectorielle des moustiques, mais également par des facteurs anthropiques telle que la LAV, ou encore par des événements aléatoires (Stica et al. 2022). Un autre facteur important est l'alternance entre hôte vecteur et hôte mammifère nécessaire au maintien de la circulation des génotypes de DENV épidémiques/endémiques. Le DENV doit en effet pouvoir réaliser son cycle de développement au sein d'hôtes très différents, et donc conserver une bonne fitness vis-à-vis de chacun, ce qui peut impacter sa diversification (Vasilakis et al. 2009). Ce cycle de développement du DENV au sein de ses hôtes vecteurs et humains va maintenant être décrit.

3.1.4.3. Cycle viral et tropisme du virus de la dengue

Le cycle viral cellulaire commence par la liaison du virion de DENV à un récepteur de surface de la cellule cible (Cruz-Oliveira et al. 2015). La particule de DENV est alors internalisée par endocytose et, le pH acide de l'endosome dans lequel elle se trouve provoque une modification de la conformation des protéines d'enveloppe et leur fusion avec la membrane de l'endosome (Bartenschlager and Miller 2008; Stiasny et al. 2011) (Figure 24). Ceci permet la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme, puis celle de l'ARN viral simple brin positif une fois la capsid éliminée. Le premier cycle de réplication débute alors par la traduction de l'ARN viral génomique suite à son attachement aux ribosomes du réticulum endoplasmique granuleux (Figure 24) (Bartenschlager and Miller 2008). L'ARN est alors traduit en une unique polyprotéine d'environ 3400 acides aminés qui sera clivée de façon co- et post-traductionnelle par des protéases virales et cellulaires afin d'obtenir les trois protéines structurales et les sept protéines non-structurales décrites précédemment

(Bartenschlager and Miller 2008). Suite à la traduction, le complexe de réplication viral est assemblé et il induit la formation de structures membranaires dérivées du réticulum endoplasmique appelées «vesicle packet» et dont l'invagination et la composition lipidique sont propices à la formation de l'enveloppe virale composée d'une bicouche lipidique (Zhang et al. 2003; Welsch et al. 2009; van den Elsen et al. 2021; Ci and Shi 2021). Ce complexe de réplication est composé de protéines non structurales virales nouvellement traduites, de la protéine NS5, qui comme vu précédemment est l'ARN polymérase ARN-dépendante du DENV, de facteurs cellulaires de l'hôte, ainsi que de l'ARN viral simple brin positif, et il se trouve au sein de l'invagination formée par la «vesicle packet» (Welsch et al. 2009; Gillespie et al. 2010; van den Elsen et al. 2021; Ci and Shi 2021) (Figure 24). Le complexe de réplication réplique l'ARN viral en passant par l'intermédiaire d'un brin matrice d'ARN négatif, et le brin d'ARN positif néo-synthétisé est ensuite empaqueté par les protéines structurales C pour former une nouvelle nucléocapside (van den Elsen et al. 2021). Par bourgeonnement de la membrane du réticulum endoplasmique, cette nucléocapside va être enveloppée par les protéines structurales E et prM enchâssées dans la bicouche lipidique constituant cette membrane, créant ainsi des virions immatures (van den Elsen et al. 2021) (Figure 24). Cet assemblage viral se produit dans le compartiment intermédiaire entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les virions immatures transitent ensuite par les différents compartiments de l'appareil de Golgi pour y être maturés par glycosylations des protéines virales et par clivage du précurseur de la protéine prM par les furines qui va permettre le changement conformationnel de la protéine E conduisant à une particule virale mature (Murugesan and Manoharan 2020) (Figure 24). Les particules virales matures sont acheminées par la voie sécrétoire, puis libérées par exocytose sous forme de virions infectieux (Bartenschlager and Miller 2008) (Figure 24).

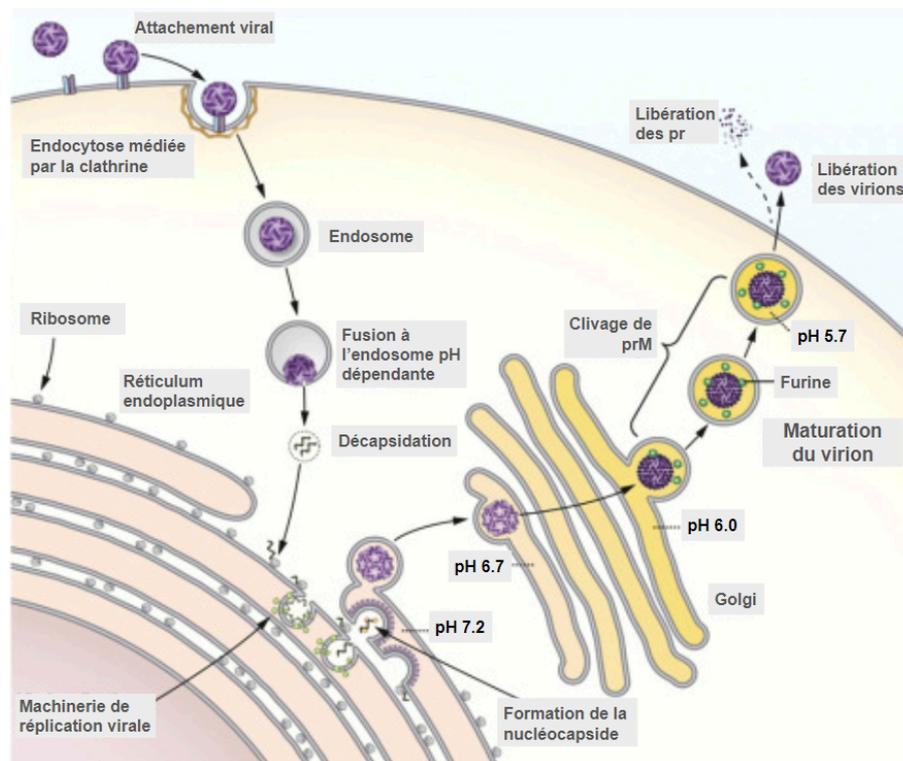


Figure 24: Cycle de réplication du virus de la dengue. La figure a été extraite et traduite de Murugesan and Manoharan 2020.

Chez l'homme, suite à la piqûre infectante d'un vecteur, le DENV infecte et se réplique au sein des cellules résidentes du derme et de l'épiderme à savoir, les cellules de Langerhans, les macrophages dermiques, les kératinocytes, les mastocytes, les cellules endothéliales, les fibroblastes, les cellules dendritiques dermiques ou encore les monocytes dérivés du sang (Wu et al. 2000; Ho et al. 2001; Cerny et al. 2014; Schaeffer et al. 2015; Troupin et al. 2016; Duangkhae et al. 2018). Certaines de ces cellules infectées vont ensuite migrer vers les organes du système lymphatique, i.e. la rate et les ganglions lymphatiques (Troupin et al. 2016). Les cellules résidentes de ces organes vont à leur tour être infectées et répliquer le DENV qui va ensuite se répandre via le système lymphatique et le système circulatoire à d'autres organes dont le foie qui est une cible définitive du DENV (Begum et al. 2019).

Suite à un repas sanguin contenant le DENV, quelques cellules épithéliales de l'intestin moyen du moustique vont s'infecter, infection qui se répand progressivement aux cellules voisines, et bientôt à tout l'intestin moyen et rarement à l'intestin antérieur (Salazar et al. 2007). Le virus se dissémine ensuite de façon quasi-systémique afin d'atteindre les glandes salivaires, puis la salive. Lors de cette dissémination, le virus va infecter de nombreux tissus du vecteur tels que la partie abdominale du système trachéal, le corps gras, les hémocytes, l'oesophage, les tissus de la tête, les ommatidies, les tissus nerveux, les tubes de Malpighi, ou encore les ailes (Salazar et al. 2007; Mousson et al. 2012).

3.2. Principaux moustiques vecteurs du genre *Aedes*

Comme énoncé précédemment, les deux vecteurs majoritaires du DENV à travers le monde sont les *Ae. aegypti* et les *Ae. albopictus*. Les vecteurs moustiques ayant déjà été largement détaillés précédemment dans ce manuscrit, seules certaines spécificités concernant chacune de ces deux espèces vont maintenant être présentées.

3.2.1. *Aedes aegypti*

Les moustiques *Aedes aegypti* appartiennent à la famille des Culicidés et se composent notamment des deux sous-espèces : *Aedes aegypti formosus* (*Aaf*) et *Aedes aegypti aegypti* (*Aaa*). Les *Aaa* sont une sous-espèce domestiquée dérivée d'une ascendance sylvatique originaire des forêts d'Afrique sub-saharienne et dont les représentants actuels sont les *Aaf* (Brown et al. 2014; Powell 2018). Actuellement, l'hypothèse la plus probable quant à la domestication des *Aaa* est qu'elle aurait eu lieu il y a plus de 550 années de cela en Afrique de l'Ouest, région subissant de longs mois de saisons sèches. Pour faire face à ces mois de sécheresse, les réserves d'eau mises en place par les villages se trouvant à l'orée des forêts auraient alors représenté des gîtes de ponte très attractifs pour les femelles *Aaf* ancestrales dont les gîtes naturels étaient asséchés. La proximité de l'Homme aurait ensuite pu conduire les nouvelles générations de moustiques *Aaf* issues de ces réservoirs d'eau à l'inclure dans leur spectre d'hôte pour les repas sanguins et à pondre de nouveau dans ces gîtes anthropiques du fait du maintien de la sécheresse. Progressivement, ces moustiques se seraient ainsi domestiqués et auraient commencé à diverger de leur ancêtre sylvatique, mais sans isolement reproducteur du fait de la proximité entre les villages et la forêt, conduisant à

des populations aux structures génétiques mixtes entre *Aaf* et *Aaa*, appelées *proto-Aaa* (Gloria-Soria et al. 2016). Ces populations mixtes sont aujourd'hui notamment retrouvées au Sénégal et en Angola. Les moustiques des populations *proto-Aaa* auraient alors été introduits depuis l'Afrique de l'Ouest vers l'Amérique du Sud du fait de la traite esclavagiste (Brown et al. 2014; Powell 2018). Puisque déjà adaptés à survivre près de l'Homme, ils auraient ainsi pu survivre lors des traversées de l'Atlantique qui duraient entre deux et quatre mois. C'est suite à cet événement d'introduction, et donc à l'isolement que cela a créé, que les sous-espèces *Aaf* et *Aaa* auraient réellement pu diverger il y a 430 à 550 ans (Brown et al. 2014; Powell 2018). Les études phylogénétiques montrent que les populations d'*Ae. aegypti* du Pacifique et de l'Asie ont dérivé des *Aaa* d'Amérique du Sud il y a 140 à 230 ans de cela (Brown et al. 2014; Powell 2018). Cependant, il semblerait que l'introduction se soit faite dans un premier temps depuis l'Amérique du Sud vers l'Europe, essentiellement le pourtour méditerranéen et de la mer noire, toujours via la traite esclavagiste triangulaire entre Europe, Afrique de l'Ouest et Amérique, puis depuis l'Europe vers l'Asie, le Pacifique et l'Australie après l'ouverture du canal de Suez et l'intensification des échanges commerciaux entre eux (Gloria-Soria et al. 2016; Powell 2018; Kotsakiozi et al. 2018). Avant les années 1950 et l'utilisation massive du DDT pour faire face au paludisme et à la fièvre jaune, les moustiques *Aaa* s'étaient répandus à travers la grande majorité de la ceinture tropicale et subtropicale et même dans des régions plus tempérées comme le pourtour méditerranéen ou de la Mer Noire (Brown et al. 2014; Powell 2018; Kotsakiozi et al. 2018). Aujourd'hui, les *Aaa* sont essentiellement retrouvés dans la ceinture tropicale et subtropicale et, les modèles prédictifs suggèrent qu'ils devraient globalement y rester cantonnés les décennies à venir (Kraemer et al. 2015; Kraemer et al. 2019) (Figure 25).

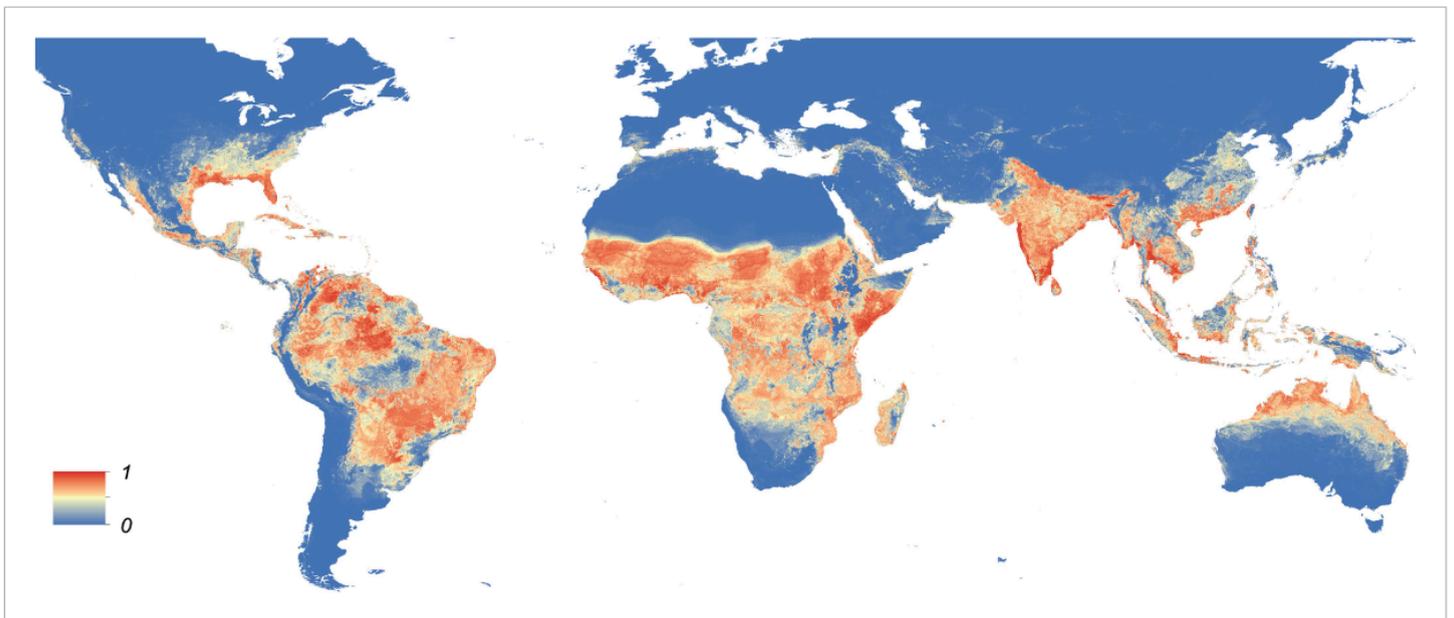


Figure 25 : Prédiction de la distribution d'*Ae. aegypti* au niveau mondial. La carte représente la probabilité d'occurrence (de 0 bleu à 1 rouge) à une résolution spatiale de 5 km × 5 km. La figure a été extraite et la légende traduite de Kraemer et al. 2015.

Les *Ae. aegypti* et leur capacité à transmettre le YFV et le DENV sont à la base de la découverte du concept de transmission vectorielle comme énoncé précédemment (Reed et al. 1901; Bancroft 1906). Depuis, leur facilité à être élevés en insectarium a permis de multiplier les études sur la compétence des *Ae. aegypti* à transmettre des pathogènes, et ils ont ainsi démontré être les vecteurs principaux des arbovirus les plus graves par leur incidence, leur morbidité et/ou leur mortalité pour l'Homme: le YFV, le DENV, le CHIKV, et le ZIKV (Souza-Neto et al. 2019). Les *Ae. aegypti* sont également capables de transmettre de nombreux autres arbovirus tels que le virus Mayaro, le Virus de l'encéphalite équine de l'Ouest, le WNV, ou encore le virus de la rivière Ross (Souza-Neto et al. 2019). Les *Ae. aegypti* possèdent différentes caractéristiques qui font d'eux de si bons vecteurs (Brady and Hay 2020). Leur domestication est une des caractéristiques essentielles à une bonne compétence vectorielle puisqu'elle permet l'ouverture du filtre de rencontre entre les deux hôtes du cycle des arbovirus, à savoir le moustique et l'Homme, de façon continue, avec une préférence pour les repas sanguins pris sur l'Homme s'élevant à plus de 90% (Scott and Takken 2012). Par ailleurs, la fréquence de ces repas sanguins sur l'Homme est aussi augmentée par la domestication des *Ae. aegypti*. En effet, du fait d'une proximité et d'une haute disponibilité à la fois en hôtes pour le repas sanguin et en gîtes d'oviposition, les *Ae. aegypti* ont moins besoin de se déplacer. Or, le vol étant une des raisons principales pour laquelle les moustiques ont besoin de l'énergie fournie par les repas de sucre, ceux volant moins ont donc moins besoin de ce type de repas, et peuvent alors favoriser la prise de repas sanguins, augmentant le risque de transmission de pathogènes (Brady and Hay 2020). D'autres paramètres du pattern d'alimentation de ces moustiques expliquent aussi cette forte aptitude à la vection des populations d'*Ae. aegypti*. Ces derniers prennent leur repas de sang majoritairement durant le jour, les exposant à plus de risque d'interruption du repas de la part de leur hôte, ce qui a pour effet de multiplier le nombre de repas de sang lors d'un même cycle gonotrophique et le nombre d'hôtes différents sur lesquels ces repas sanguins sont pris, multipliant en parallèle le risque de transmission de pathogènes (Scott and Takken 2012). Par ailleurs, ces moustiques ont une importante capacité d'adaptation à leur milieu, que ce soit par la résistance à la dessiccation des oeufs, par le processus de "stacking" par lequel les larves sont capables de ralentir leur nymphose pour attendre d'avoir plus de ressources disponibles et avoir ainsi un meilleur développement, ou par le fait que les femelles peuvent pondre dans différents gîtes lors d'un même cycle gonotrophique (Reiter 2007; Farnesi et al. 2015; Brady and Hay 2020). Cette capacité d'adaptation, associée à la limitation à l'exposition aux prédateurs et aux dures conditions environnementales extérieures, permettent une meilleure probabilité de survie des populations d'*Ae. aegypti* et donc augmente leur capacité vectorielle quant à la transmission d'arbovirus (Brady and Hay 2020). Pour finir, l'utilisation d'une grande diversité de gîtes d'oviposition (i.e. nature, taille, et localisation) ainsi que le rapide développement de résistance aux insecticides chez cette espèce rendent les méthodes conventionnelles de lutte anti-vectorielle moins efficaces, ce qui favorise indirectement la capacité vectorielle des populations d'*Ae. aegypti* en n'impactant pas de façon optimale leur survie (WHO 2009; Moyes et al. 2017; Brady and Hay 2020).

À La Réunion, les *Ae. aegypti* correspondent à la sous-espèce *Aaa* (Delatte et al. 2011) et ont été décrits pour la première fois en 1901 (Boussès et al. 2013). La compétition induite par l'introduction des *Ae. albopictus* dans les années 1920s, probablement accélérée par l'utilisation massive du DDT pour lutter contre les vecteurs du paludisme, a presque fait disparaître les *Ae. aegypti* de l'île dans les années 1950s (Bagny et al. 2009; Boussès et al. 2013). Plusieurs facteurs peuvent expliquer ce déclin face à *Ae. albopictus*, à savoir une fitness négativement impactée par des températures s'écartant faiblement des 25°C et par des densités de populations élevées, ainsi qu'une moins bonne aptitude à la compétition pour les ressources qu'*Ae. albopictus* (Bagny Beilhe et al. 2013). Pour ces raisons, le nombre de gîtes larvaires présentant des *Ae. aegypti* ainsi que leur densité relative sur l'île ont progressivement diminué (Bagny et al. 2009). Dans les années 1980s, les *Ae. aegypti* n'étaient plus retrouvés dans les gîtes artificiels, indiquant un recul géographique de ces moustiques hors des zones urbaines et périurbaines (Bagny et al. 2009). Ils ont ainsi été cantonnés, à partir des années 1980s et jusqu'à présent, à quelques refuges au sein de ravines sèches, majoritairement à l'Ouest de l'île, à une altitude inférieure à 500 mètres (Salvan and Mouchet 1994; Boussès et al. 2013; Boussès et al. 2018). Les *Ae. aegypti* de La Réunion ne sont de ce fait pas présents au sein des foyers infectieux et c'est pourquoi ils n'ont pas été et ne sont pas incriminés dans les épidémies passées ou présentes de CHIKV et de DENV enregistrées sur l'île.

3.2.2 *Aedes albopictus*

Les moustiques de l'espèce *Aedes albopictus* (ou moustique tigre) sont morphologiquement très proches de ceux de leur espèce sœur *Ae. aegypti*, certaines caractéristiques permettant tout de même de les distinguer comme, par exemple, la présence d'écailles blanches formant une bande centrale sur le thorax des *Ae. albopictus* comparée à une forme de lyre sur celui des *Ae. aegypti* (Walter Reed Biosystematics Unit 2020; Walter Reed Biosystematics Unit 2021). L'espèce *Ae. albopictus* est originaire des forêts d'Asie du Sud Est (Smith 1956) et, en quelques décennies, elle a colonisé tous les continents, sauf l'Antarctique, (Paupy et al. 2009; Benelli et al. 2020; Swan et al. 2022) (Figure 26). Les récentes études de phylogéographie ont montré que les trois lignées ancestrales d'Asie du Sud Est s'étaient ainsi propagées au reste des continents, du fait des flux migratoires humains, avant de se diversifier en de nouvelles lignées dans certains lieux d'introduction (Manni et al. 2017; Vega-Rúa et al. 2020). Les *Ae. albopictus* ayant une distance de vol plutôt limitée de quelques centaines de mètres (Vavassori et al. 2019), ils se dispersent de façon locale suite à leur introduction par d'autres biais, notamment via le transport automobile (Delaunay et al. 2012). Puis, ces nouvelles lignées et les lignées ancestrales ont continué à se propager du fait de la globalisation des échanges, augmentant continuellement l'aire de répartition de ces moustiques et créant des événements de ré-invasions multiples à travers le globe (Manni et al. 2017; Vega-Rúa et al. 2020) (Figure 26).

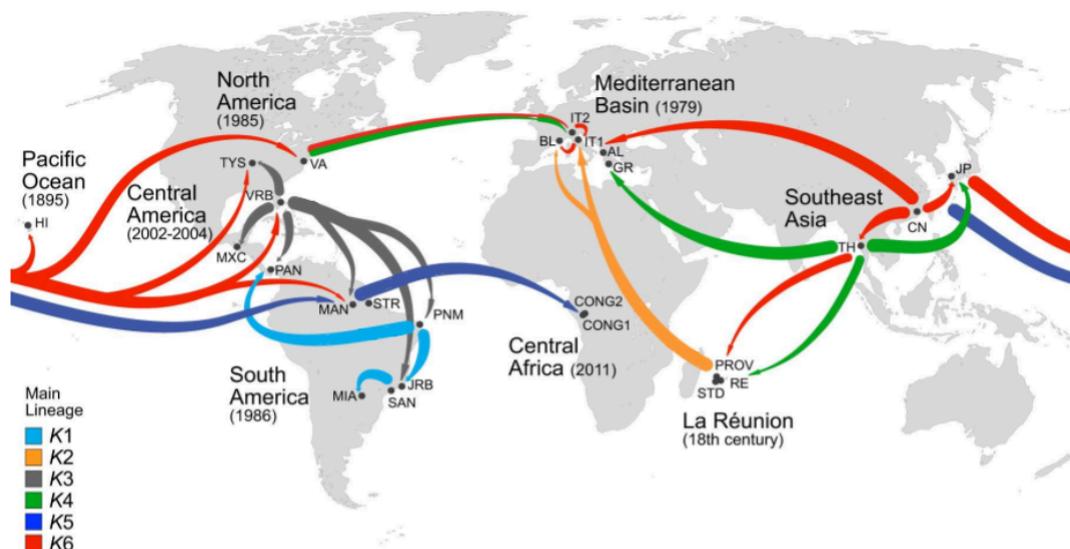


Figure 26 : Représentation géographique de la propagation mondiale d'*Aedes albopictus* mettant en évidence l'ascendance commune des différentes lignées dérivées de ces moustiques. K1 à K6 représentent les différentes lignées génétiques principales d'*Ae. albopictus*. Les dates entre parenthèses indiquent les dates d'introduction des lignées de moustiques dans les différentes localités référencées. Figure extraite et modifiée à partir de Vega-Rúa et al. 2020.

Certaines caractéristiques des *Ae. albopictus* peuvent expliquer leur caractère très invasif et leur rapide propagation au niveau mondial au cours des dernières décennies (Benedict et al. 2007; Bonizzoni et al. 2013). Dans un premier temps, et comme pour les *Ae. aegypti*, leur propagation est favorisée par la résistance des œufs à la dessiccation qui peut aller jusqu'à plusieurs mois (CDC 2022), facilitant ainsi leur transport et leur introduction. En effet, ces dernières années, l'aire de distribution de ce moustique a augmenté de façon significative, probablement favorisée par le transport des œufs via le commerce international des pneus usés (Reiter and Sprenger 1987) et des plantes exotiques (Enserink 2008). Par ailleurs, ses oeufs peuvent entrer en diapause si leur ascendance est exposée à des photopériodes plus courtes avant de les pondre (signe annonciateur de l'hiver dans les régions tempérées) et, ils peuvent ainsi résister à des températures basses, parfois même en dessous de 0°C (Kobayashi et al. 2002). Les adultes de certaines populations peuvent également survivre et même maintenir une activité biologique (piqûre, vol, reproduction) à des températures basses allant de 10°C à -5°C (Mitchell 1995; Kobayashi et al. 2002; Delatte et al. 2009). Ces caractéristiques ont permis à l'espèce *Ae. albopictus* de coloniser des zones aux climats tempérés. Par exemple, depuis sa première occurrence en France métropolitaine en 1999, ses introductions répétées mais contrôlées de 2000 et 2006, et l'établissement non contrôlé de plusieurs populations au niveau de la Côte d'Azur en 2004, les *Ae. albopictus* ont depuis colonisé l'ensemble des régions et la grande majorité des départements du pays (Scholte and Schaffner 2007). Pour finir, sa capacité d'adaptation à différents milieux, anthropisés ou naturels, ainsi que son large spectre d'hôtes pour les repas sanguins, étant à la fois anthropophile et zoophile, lui offrent une certaine plasticité écologique qui la rende compétitive et lui permettent une colonisation de différents milieux assez aisément (Paupy et al. 2009; Boussès et al. 2018; Pereira-dos-Santos et al. 2020).

Tout d'abord définis plus comme une nuisance du fait de leur rapide propagation et de leur caractère anthropophile, les moustiques *Ae. albopictus* n'étaient pas réellement considérés comme une menace pour la santé humaine (Gratz 2004). En effet, les données présentées dans la littérature n'étaient alors que trop rarement complètes pour pouvoir confirmer le réel statut vecteur de ces moustiques vis-à-vis d'arbovirus, avec par exemple des moustiques retrouvés infectés sur le terrain par un virus donné mais sans donnée disponible sur leur compétence à le transmettre (Gratz 2004). Cependant, leur implication dans les épidémies de Chikungunya entre les années 2004 et 2007 dans la zone du SOOI, au Gabon, et dans le pourtour méditerranéen en Europe (Vazeille et al. 2007; Bonilauri et al. 2008; Leroy et al. 2009) et, dans les épidémies de dengue en Chine, au Japon, dans le SOOI, ou encore en Europe (Kobayashi et al. 2018; Wei et al. 2021; Hafsia et al. 2022; Cochet et al. 2022; Santé Publique France 2024b) ont fait passer leur statut de nuisance à celui de vecteur avéré. De plus en plus de données sont disponibles pour les arbovirus d'intérêt en santé humaine que sont le DENV, le CHIKV, et le ZIKV et, ensemble, ces données témoignent du risque sanitaire important que représentent ces vecteurs retrouvés maintenant sur l'ensemble des continents (Paupy et al. 2009; Vanlandingham et al. 2016; Pereira-dos-Santos et al. 2020; Bohers et al. 2020; Gloria-Soria et al. 2020; Obadia et al. 2022). Les capacités de résistance et de diapause des œufs associées à l'efficacité de la transmission verticale ces virus d'intérêt par les femelles à leur descendance font de ces moustiques une espèce réservoir potentielle, permettant le maintien du virus en période inter-épidémique (Lequime et al. 2016; Smartt et al. 2017; Ferreira-de-Lima and Lima-Camara 2018). De plus, bien que plus d'études soient nécessaires, la répartition à la fois urbaine et rurale des moustiques tigres, leur large spectre d'hôtes pour les repas sanguin, ainsi que leur capacité à s'infecter et à transmettre certaines zoonoses en font des vecteurs pouvant jouer le rôle de pont entre cycle zoonotique et Homme, représentant une menace supplémentaire pour la santé humaine (Vanlandingham et al. 2016; Pereira-dos-Santos et al. 2020; Garcia-Rejon et al. 2021). Pour finir, les *Ae. albopictus* sont naturellement infectées par deux souches de *Wolbachia*: *wAlbA* et *wAlbB*). Dépendamment des interactions populations vectrices x parasites observées, ces bactéries ont montré pouvoir affecter, ou non, les différents paramètres de la compétence vectorielle des moustiques tigres à transmettre des arbovirus, comme pour la dengue par exemple (Mousson et al. 2012; Joanne et al. 2017; Wei et al. 2021). Les prendre en considération dans les études de compétence vectorielle est donc une nécessité quand les modèles biologiques sont les *Ae. albopictus*.

A La Réunion, *Ae. albopictus* a été décrit pour la première fois en 1913, bien que son installation se serait produite lors des flux migratoires humains depuis l'Asie du Sud-Est plusieurs siècles auparavant (Edwards 1920; Vega-Rúa et al. 2020). Les dernières preuves phylogénétiques montrent en effet que deux lignées ancestrales d'Asie du Sud Est auraient colonisé l'Ouest de La Réunion au 18^{ème} siècle, puis se seraient par la suite étendue au reste de l'île en se diversifiant en une nouvelle lignée à l'Est (Vega-Rúa et al. 2020). Aujourd'hui, les moustiques *Ae. albopictus* de La Réunion présentent une importante diversité génétique entre les individus sans structuration spatiale (Latreille et al. 2019), résultats qui peuvent être expliqués par ces événements d'introductions multiples et de diversification au sein d'une petite île aux conditions environnementales et anthropiques permettant le brassage

génétique des populations de moustiques. L'importance des mouvements humains quotidiens entre les différentes localités de l'île ainsi que la présence de gîtes larvaires abondants tout autour de celle-ci et toute l'année, sont des facteurs qui peuvent notamment faciliter ce brassage (Delatte, Paupy, et al. 2008; Hafsia et al. 2022). Qui plus est, les *Ae. albopictus* de la Réunion sont génétiquement proches, entre-autres, des populations contemporaines malgaches, américaines, chinoises, japonaises, thaïlandaises ou de France métropolitaine (Mousson et al. 2005; Maynard et al. 2017; Vega-Rúa et al. 2020). Comme expliqué précédemment, certaines de ces similarités peuvent être expliquées par les introductions passées, distinctes, mais avec des lignées ancestrales provenant d'un même fond génétique, tandis que d'autres peuvent être expliquées par des évènements récents d'importation/d'exportation de moustiques du fait de la globalisation des échanges (Manni et al. 2017; Vega-Rúa et al. 2020) (Figure 26). *Aedes albopictus* est, avec *Culex quinquefasciatus*, l'espèce de moustiques la plus abondante sur l'île de La Réunion (Boussès et al. 2018). Son aire de répartition s'étend à travers toute l'île, que ce soit en milieu urbain, péri-urbain ou même rural puisqu'elle a aussi été retrouvée dans des zones agricoles, comme les champs de canne à sucre, mais également dans des ravines ombragées et des espaces forestiers non habités (Le Goff et al. 2016; Boussès et al. 2018). Limités par l'altitude, les *Ae. albopictus* sont globalement retrouvés jusqu'à 800 mètres d'altitude tout au long de l'année (Delatte, Paupy, et al. 2008) (Figure 27). Toutefois, en été, ils sont retrouvés à des altitudes encore plus élevées, atteignant les 1200 mètres, au sein des cirques et hauts plateaux de La Réunion, exception faite pour le cirque de Salazie où ils sont aussi présents en hiver (Delatte, Paupy, et al. 2008) (Figure 27). À La Réunion, les *Ae. albopictus* posent des problèmes majeurs en santé publique de par leur rôle de vecteurs, confirmé lors de l'épidémie de chikungunya en 2005-2006 (Vazeille et al. 2007), et supposé lors des épidémies de dengue ayant eu lieu lors des dernières décennies (Hafsia et al. 2022). Ils sont les vecteurs incriminés pour ces épidémies de dengue du fait de leur forte abondance et de leur omniprésence sur toutes les zones d'incidence de l'île (Delatte, Dehecq, et al. 2008). Comme mentionné précédemment, les études antérieures de compétence vectorielle des *Ae. albopictus* de La Réunion à transmettre le DENV n'ont pas permis d'obtenir des résultats homogènes et clairs du fait de conditions expérimentales non suffisamment proches de la réalité de terrain (Paupy et al. 2001; Vazeille et al. 2010; Mousson et al. 2012). Pour les mêmes raisons, le rôle de *Wolbachia* dans ces résultats de compétence vectorielle (Mousson et al. 2012) peut aussi être remis en question. Aujourd'hui, notre compréhension de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. albopictus* de La Réunion à transmettre le DENV reste à approfondir, surtout au vue de la nouvelle épidémie de dengue sans précédent qui a lieu sur l'île depuis fin 2017 (Hafsia et al. 2022). Cette amélioration de notre compréhension des interactions entre vecteur et virus passe, dans un premier temps, par une vision claire du contexte historique de la dengue à La Réunion et dans le SOOI. Ces recherches bibliographiques ont fait l'objet d'une revue qui va maintenant être présentée.

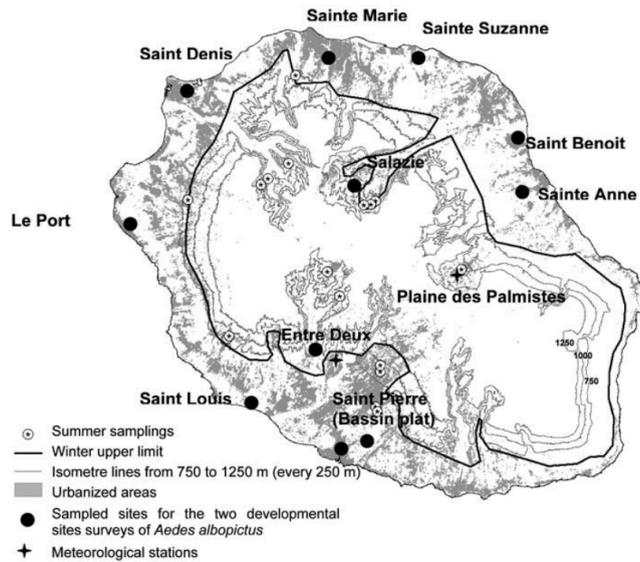


Figure 27 : Limite hivernale de la répartition des d'*Aedes albopictus* à La Réunion. La ligne noire représente l'altitude la plus élevée pour laquelle des *Ae. albopictus* ont été retrouvés au cours de la saison hivernale. Les points étoilés représentent les altitudes les plus élevées où des *Aedes albopictus* ont été retrouvés pendant la saison estivale. Les points noirs représentent les sites échantillonnés pour les deux enquêtes de terrain sur les sites de reproduction d'*Ae. albopictus* menées, respectivement, au cours de l'été et de l'hiver 2006. La figure a été extraite et la légende traduite à partir de Delatte, Dehecq, et al. 2008a.

3.3. Publication 1 : « Overview of dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: A systematic review »

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

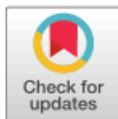
REVIEW

Overview of dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: A systematic review

Sarah Hafsia¹, Marion Haramboure^{2,3,4,5}, David Arthur Wilkinson¹, Thierry Baldet^{4,5}, Luce Yemadje-Menudier⁶, Muriel Vincent⁶, Annelise Tran^{2,3,4,5}, Célestine Atyame¹, Patrick Mavingui^{1*}

1 UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical) CNRS 9192-INSERM 1187-IRD 249-Université de La Réunion, île de La Réunion, France, **2** CIRAD, UMR TETIS, Sainte-Clotilde, île de La Réunion, France, **3** TETIS, Univ Montpellier, AgroParisTech, CIRAD, CNRS, INRAE, Sainte-Clotilde, île de La Réunion, France, **4** CIRAD, UMR ASTRE, Sainte-Clotilde, île de La Réunion, France, **5** ASTRE, Université Montpellier, CIRAD, INRAE, Sainte-Clotilde, île de La Réunion, France, **6** Santé publique France, Saint Denis, La Réunion, France

* patrick.mavingui@cnrs.fr



OPEN ACCESS

Citation: Hafsia S, Haramboure M, Wilkinson DA, Baldet T, Yemadje-Menudier L, Vincent M, et al. (2022) Overview of dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis* 16(7): e0010547. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010547>

Editor: Chukwunonso Nzelu, University of Calgary, CANADA

Published: July 28, 2022

Copyright: © 2022 Hafsia et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by the European Regional development Fund (RUNDENG 20201640-00222937 to PM, DIRE2018-1182 to SH) and the Interreg (VECTOBIOMES RE0009962 to PM). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing interests: The authors have declared that no competing interests exist.

Abstract

Background

Dengue is the world's most prevalent mosquito-borne viral disease. It is endemic in many tropical and subtropical countries and represents a significant global health burden. The first reports of dengue virus (DENV) circulation in the South West Indian Ocean (SWIO) islands date back to the early 1940s; however, an increase in DENV circulation has been reported in the SWIO in recent years. The aim of this review is to trace the history of DENV in the SWIO islands using available records from the Comoros, Madagascar, Mauritius, Mayotte, Seychelles, and Reunion. We focus in particular on the most extensive data from Reunion Island, highlighting factors that may explain the observed increasing incidence, and the potential shift from one-off outbreaks to endemic dengue transmission.

Methods

Following the PRISMA guidelines, the literature review focused queried different databases using the keywords "dengue" or "*Aedes albopictus*" combined with each of the following SWIO islands the Comoros, Madagascar, Mauritius, Mayotte, Seychelles, and Reunion. We also compiled case report data for dengue in Mayotte and Reunion in collaboration with the regional public health agencies in these French territories. References and data were discarded when original sources were not identified. We examined reports of climatic, anthropogenic, and mosquito-related factors that may influence the maintenance of dengue transmission independently of case importation linked to travel.

Findings and conclusions

The first report of dengue circulation in the SWIO was documented in 1943 in the Comoros. Then not until an outbreak in 1976 to 1977 that affected approximately 80% of the population of the Seychelles. DENV was also reported in 1977 to 1978 in Reunion with an estimate of nearly 30% of the population infected. In the following 40-year period, DENV circulation was qualified as interepidemic with sporadic cases. However, in recent years, the region has experienced uninterrupted DENV transmission at elevated incidence. Since 2017, Reunion witnessed the cocirculation of 3 serotypes (DENV-1, DENV-2 and DENV-3) and an increased number of cases with severe forms and deaths. Reinforced molecular and serological identification of DENV serotypes and genotypes circulating in the SWIO as well as vector control strategies is necessary to protect exposed human populations and limit the spread of dengue.

Introduction

Dengue is the most widespread arboviral infection in the world, with half of the world's population living in at-risk areas [1,2]. It largely spreads in tropical and subtropical regions, affecting at least 128 different countries [1–3]. Although the majority of about 390 million dengue cases estimated worldwide each year are asymptomatic, about 96 million report symptoms [3]. The disease can range from dengue fevers (DFs), with mild symptoms, to much more severe forms called dengue hemorrhagic fever [4]. Each year, an estimated 20,000 deaths are causally linked to dengue infections [5,6].

Dengue virus (DENV) has a positive-sense single-stranded linear RNA genome (11 kilobases). It belongs to the genus *Flavivirus*, which includes other mosquito-borne RNA viruses of medical importance, such as Yellow Fever, West Nile, Japanese encephalitis and Zika. Historically, dengue is thought to have emerged more than a thousand years ago [7,8]. The first isolations of DENV were achieved in the 1940s [9–11]. From 1948 to 1956, serological characterization identified the existence of 4 different DENV serotypes, DENV-1 to DENV-4 [7,8,11,12]. More recently, molecular analyses have highlighted the diversity of DENV genotypes belonging to each of the serotypes [7,13,14].

DENV is transmitted to humans by mosquito vectors, mainly *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* [15, 16]. Long-term immunity to a single infecting serotype can last for several decades [17]. Cross-immunity between heterologous serotypes can also exist, but does not prevent sympatric cocirculation of multiple serotypes during outbreaks [7,13,14]. Previous DENV infection may lead to more severe disease upon infection by a secondary serotype (i.e., secondary infection), through “antibody-dependent enhancement” (ADE), one of the main causes of severe and lethal DENV infections [18,19].

Observations of DF have been increasing since the end of the World War II [20]. Models predict that populations located in at-risk areas will increase from 3.5 billion today to 6.1 billion by 2080, the majority constrained to the tropical and subtropical belt [2]. The areas where DENV is only epidemic could become endemic or hyperendemic, and prevalence in areas where DENV is already endemic or hyperendemic is expected to increase significantly [2]. According to the Centers for Disease Control and Prevention, epidemic defines a sudden increase in cases of a disease above the expected norm in a given area, endemic refers to a disease with a constant or usual prevalence in a given area, and hyperendemic describes a disease

with a persistent high prevalence in a given endemic area [21]. However, for DENV, “hyperendemic” can also refer to endemic circulation of multiple DENV serotypes [7,8].

The intensification of DENV circulation is associated with parameters that are strongly marked in the tropical and subtropical areas, namely (i) human population growth and associated substandard housing and unplanned urbanization; (ii) high vector population densities and lack of effective vector control methods; (iii) scarcity of resources for DENV prevention, surveillance, and treatment; and (iv) intensification of maritime and air traffic facilitating the import/export of vectors or DENV cases [22]. Due to their reduced connectivity and smaller size, island ecosystems, such as those of the South West Indian Ocean (SWIO), provide ideal settings for the study of factors that influence DENV circulation [23].

The SWIO islands include Madagascar, and the archipelagos of the Mascarenes (with Reunion, Mauritius, and Rodrigues), the Comoros (with Grande Comore, Mohéli, Anjouan, and Mayotte), the Seychelles (Fig 1), as well as numerous uninhabited islets known as the Iles Eparses (Europa, Juan de Nova, Glorieuses, and Tromelin). All inhabited SWIO islands have experienced sporadic dengue epidemics and are colonized by *Ae. aegypti* and/or *Ae. albopictus* vectors, with tropical climates favorable to their abundance [24]. Unlike many SWIO islands, Reunion, a French overseas territory, has a well-developed infrastructure providing healthcare services that allow for thorough surveillance of dengue cases as well as significant resources for vector control [25].

This review proposes to (i) retrace the history of DENV in the SWIO islands (the Comoros, Madagascar, Mauritius, Mayotte, Seychelles, and Reunion); (ii) decipher factors involved in the occurrence of DENV outbreaks in recent years; and (iii) summarize the control measures implemented. We explore whether DENV transmission is evolving toward endemicity, particularly in Reunion where epidemiological data are relatively abundant.

Methods

The literature review applied the PRISMA (preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses) guidelines [26]. We used published data on DENV by searching in the PubMed and Google Scholar databases using the keywords “dengue” or “*Aedes albopictus*” simultaneously with each of the SWIO islands the Comoros, Madagascar, Mauritius, Mayotte, Seychelles, and Reunion. After sorting, each article was read in full. We also compiled an extensive database by extracting information from French dengue case reports in Reunion and Mayotte since 2007. These data were provided by the regional unit of the French national public health agency (<https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien>) in collaboration with the French Indian Ocean health agencies (ARS-OI and CIRE-OI). Only nonconfidential data records were used, and we did not have access to clinical data, impairing the use of guideline such as RECORD [27]. References reporting no original empirical data were disregarded. Overall, we examined 29 publications and 224 reports (168 from Reunion and 56 from Mayotte). We identified observational, interventional, and population-based records and extracted data to evaluate the number of serologically confirmed cases as well as severe forms and deaths. Missing fields as a result of broad data heterogeneity meant that multivariate meta-analyses were inappropriate. Thus, compiled data were used to examine trends in disease incidence and severity.

Results

Updating history of DENV circulation in the SWIO islands

The first dengue outbreak was documented in 1943 in the Comoros [28]. A dengue outbreak was reported in Reunion Island in 1977 to 1978 involving DENV-2 and *Ae. albopictus* as vector

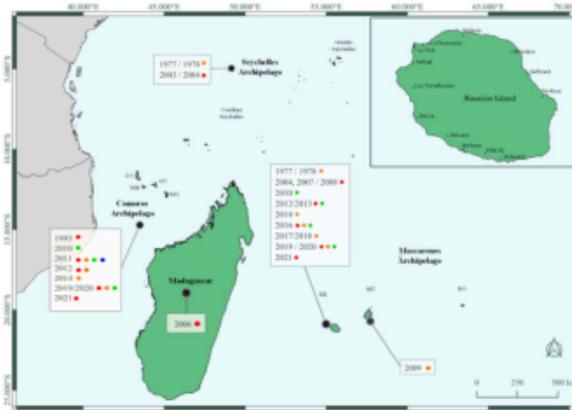


Fig 1. Islands of the southwestern Indian Ocean. The enlargement on the top right details the map of Reunion Island with the locations of the main cities. The rectangles show the dengue history in the region. The different dates correspond to the DENV outbreaks, and the colored circles represent the serotypes responsible for these outbreaks, red for DENV-1, orange for DENV-2, green for DENV-3, and purple for DENV-4. Cartographic data: administrative boundaries for Mayotte and Reunion Island come from OpenStreetMap; administrative boundaries for other countries come from ICPAC Geoportal. Software: QGIS3.10. Map was created using QGIS. Basemap: GADM data (<https://www.gadm.org/data.html>). AN, Anjouan; CS, Coralline Seychelles; DENV, dengue virus; GADM, Global Administrative Areas; GC, Grande Comore; GS, Granitic Seychelles; MH, Mohéli; MU, Mauritius; MY, Mayotte; RE, Reunion Island; RO, Rodrigues.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010547.g001>

[29], with approximately 30% of the population infected [30]. Viral isolation from patient serum [31] also confirmed the spread of DENV-2 infection by *Ae. albopictus* in the Seychelles in 1976 to 1977, infecting nearly 80% of the population [32]. In 1993, DENV-1 outbreak occurred on the Comoros with *Ae. aegypti* as vector [33,34].

After a period described as “inter-epidemic” with sporadic cases, “micro-epidemics” occurred in the 2000s. First in the Seychelles, between 2003 and 2004, with more than 400 patients diagnosed and active transmission of DENV-1 confirmed by entomological studies [35]. Then in Reunion in 2004, 228 cases were diagnosed in the west of the island with DENV-1 and *Ae. albopictus* as the main vector [36]. The same DENV-1 serotype caused an outbreak in Toamasina, eastern Madagascar, 2 years later in 2006 [37]. DENV-1 was also implicated in small outbreaks in Reunion in 2007 and 2008 with 28 and 44 autochthonous cases, respectively (Fig 1). Occurrence of dengue-like syndromes was demonstrated by a sentinel surveillance system deployed in Madagascar between 2007 and 2008 [38]. *Ae. albopictus* was also suspected in the transmission of 234 DENV-2 cases in Mauritius in 2009 [39]. In 2010, autochthonous cases of DENV-3 were reported for the first time in the region, in the Comoros [40], Mayotte and Reunion (with 54 and 18 autochthonous cases, respectively) [41]. A 2011 seroepidemiological survey in the Comoros showed the circulation of different arboviruses, including the 4 DENV serotypes at high rates [42]. For example, as many as 80% of about 300 individuals had neutralizing antibodies to DENV on the island of Grande Comore [42]. In contrast, in 2008 a serological survey among 1,825 volunteer blood donors in Reunion revealed an overall seroprevalence of 3.1%, suggesting a population mostly naive for dengue infection [43]. In 2012, both DENV-1 and DENV-2 were implicated in an outbreak in Mayotte with 43 autochthonous cases, while in Reunion, DENV-1 and DENV-3 were diagnosed in 31 and 21 autochthonous cases in 2012 and in 2013, respectively. Then in 2014, only DENV-2 was reported in SWIO: The Comoros, Mayotte, and Reunion Island (with 470 and 29 autochthonous cases, respectively) [41]. Only 6 autochthonous cases were reported in Reunion 1 year later. In Mayotte, no dengue cases were

reported between 2015 and 2018. In 2019, a new outbreak was observed in Mayotte with 186 confirmed cases related to DENV-1. This outbreak was uninterrupted and was followed by a highest transmission of DENV-1 in 2020 with 4,305 confirmed cases [41]. In addition, the first severe cases (including hemorrhage, hepatic injury, and vasoplegia) and 8 associated deaths were reported in Mayotte in 2020 [41]. No autochthonous cases of dengue have been reported since the end of 2020 in Mayotte [41].

Following the microepidemics described in Reunion between 2004 and 2015, a surveillance system was set up by the CIRE-OI (cellule interrégionale d'épidémiologie Océan Indien) that allowed more efficient monitoring of DENV outbreaks and the identification of DENV variants circulating on the island. These data (number of cases, severity and DENV serotypes) highlight a shift of epidemiological profile of dengue in Reunion from 2016, as detailed below.

Epidemiology of dengue in Reunion Island

Number of confirmed cases and incidence rate of dengue. Following low-level DENV circulation from 2004 to 2015, a considerable increase in the annual number of dengue cases was reported from 2016. In 2016, the number of cases was 231 (221 autochthonous cases and 10 imported cases) with an incidence rate of 26 autochthonous cases per 100,000 people (Fig 2). A slight decrease in the annual number of cases was observed in 2017 with 103 dengue cases (94 autochthonous and 9 imported cases) and an incidence rate of 11 autochthonous cases per 100,000 people. During the period 2018 to 2021, the total annual number of autochthonous dengue cases increased significantly: 6,759 in 2018, 18,217 in 2019, 16,414 in 2020, and 29,577 in 2021. The population incidence was 790, 2,127, 1,916, and 3,448 autochthonous cases per 100,000 population in 2018, 2019, 2020, and 2021, respectively.

DENV serotypes circulating in Reunion Island. The 4 DENV serotypes have been detected in Reunion since 1977 to 1978: the 3 serotypes DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in

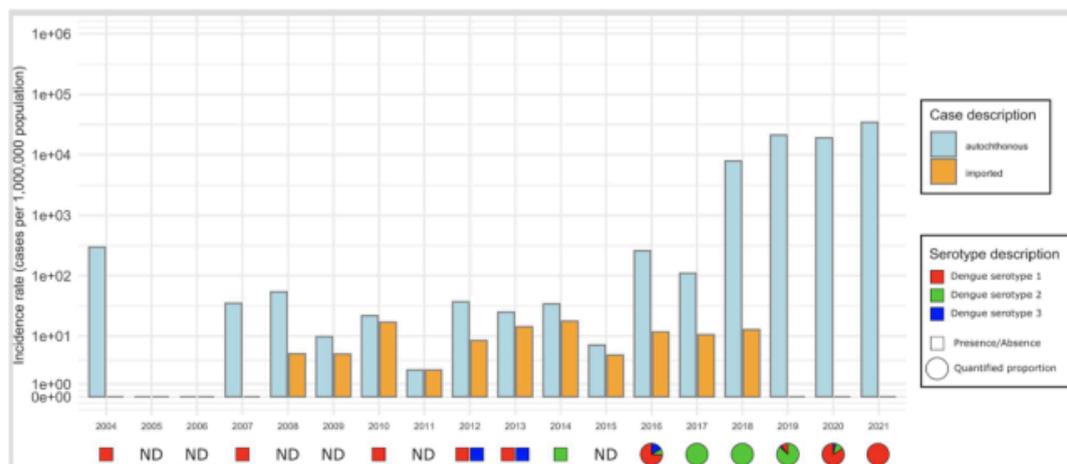


Fig 2. Incidence of autochthonous dengue cases per million population in Reunion from 2004 to 2021. Incidence is expressed in cases per million population for visualization purposes. The distribution of DENV serotypes are given for autochthonous cases based on the number of samples serotyped in 2016 (93 out of 221), 2017 (94 out of 94), 2018 (950 out of 6,770), 2019 (883 out of 18,217), 2020 (836 out of 16,414), and 2021 (978 out of 29,577). DENV, dengue virus; ND, unavailable data.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010547.g002>

Table 1. Summary of the number of confirmed cases of dengue and severe dengue disease in Reunion from 1977 to 2021.

Year	Total number of cases	Autochthonous cases	Imported cases	Dengue severity			DENV serotypes
				Hospitalizations	Severe cases	Deaths	
1977 to 1978	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2 ^a
2004	228	228	ND	ND	ND	ND	1 ^a
2005	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2006	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2007	28	28	ND	7	0	0	1 ^a
2008	48	44	4	ND	ND	ND	1 ^a , 3 ⁱ
2009	12	8	4	ND	ND	ND	2 ⁱ
2010	32	18	14	1	0	0	1 ⁱ , 3 ^{ai} , 4 ⁱ
2011	4	2	2	6	0	0	ND
2012	38	31	7	0	0	0	1 ^a , 3 ^a
2013	33	21	12	4	0	0	1 ^{ai} , 3 ^{ai}
2014	44	29	15	0	0	0	2 ^{ai}
2015	10	6	4	0	0	0	ND
2016	231	221	10	18	3	0	1 ^a , 2 ^a , 3 ^a
2017	103	94	9	14	0	0	1 ⁱ , 2 ^{ai} , 4 ⁱ
2018	6,770	6,759	11	154	27	6	2 ^a
2019	18,217	18,217	ND	620	75	14	1 ^a , 2 ^a , 3 ^a
2020	16,414	16,414	ND	787	108	22	1 ^{ai} , 2 ^{ai} , 3 ^a
2021*	29,577	29,577	ND	1,111	245	33	1 ^a

When serotyping was performed, the origin (i.e., from autochthonous or imported cases) is given.

^aSerotype identified in autochthonous cases.

ⁱSerotype identified in imported cases.

*In 2021, data available only from January to the beginning of October.

ND, unavailable data.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010547.t001>

autochthonous cases and the 4 serotypes DENV-1, DENV-2, DENV-3, and DENV-4 in imported cases (Table 1).

For autochthonous cases, DENV-1 was the only serotype circulating on the island in 2004, 2007, 2008, and 2021. Only DENV-2 circulated in 2009, 2014, 2017 and 2018 (Fig 2). DENV-3 was first detected on the island in 2010 and was the only serotype detected that year. After this first detection, DENV-3 cocirculated with DENV-1 in 2012 and 2013 and the cocirculation of the 3 serotypes DENV-1, DENV-2, and DENV-3 was reported in 2015 to 2016, 2019, and 2020 [41,44].

Data on DENV serotype distributions were often partial or incomplete; we thus limited our interpretation of serotype abundances in autochthonous cases to samples tested between 2017 and 2021 (Table 1). During this period, DENV-1 and DENV-2 were predominant, and a small number of coinfections were detected in 2019 and 2020 (Fig 2). In 2021, only DENV-1 was reported between January and August.

Dengue severity in Reunion Island. As observed in other countries, the clinical signs described in most reported dengue cases in Reunion are classic DF symptoms. Data regarding the severity of dengue combine reported hospitalizations due to symptoms such as respiratory distress, thrombopenia, lethargy, renal and hepatic failure, and/or more severe symptoms such as dengue shock syndrome (DSS), as well as a small number of cases of dengue hemorrhagic fever (DHF) and death. The first severe case of dengue was described in 2016 and the first dengue-related death in 2018. This recent severity of dengue in Reunion may be related with a

significant increase in the number of cases and hospitalizations coinciding with the cocirculation of 3 DENV serotypes (DENV-1, DENV-2, and DENV-3) since 2016 (Table 1, Fig 2).

Strikingly, several severe ophthalmological cases related to DENV-1 infection have been reported, notably in 2020 and 2021 [41]. From 2019 to and 2021, secondary infections (individual who already had DF in the past) were reported in several patients, accounting for 6.7% of confirmed cases in 2020. Deaths in patients with secondary infections increased from 0 in 2018 to 7% in 2019, 18% in 2020, and 24% in 2021. The median age of dengue-infected patients is about 40. Severe forms and deaths mostly occurred in older patients with comorbidities such as diabetes and hypertension. However, increasing numbers of dengue-induced mortalities have been observed in younger patients (including children) without comorbidities [41].

Trends of transmission seasonality and the geographic distribution of dengue cases in Reunion Island from 2017 to 2021. Strong seasonal patterns in dengue incidence were observed in Reunion from 2017 to 2021. Outbreak peaks were observed between March and June, corresponding to the end of the austral summer, which is typically hot and humid, and then gradually decreases from June to July during the austral winter. From 2017 onward, a low level of DENV circulation was observed until the end of the year, unlike previous years when transmission stopped during the austral winter. This persistence of DENV during the interepidemic period is a new trend that may favor a rapid increase in cases early in the year.

The geographic distribution of dengue cases during the 2016 to 2020 outbreaks revealed a contrasting pattern in Reunion. Generally, the southern and western parts of the island are the most affected, while dengue incidence is generally low in the eastern and central parts. In 2016, the first cases were reported in Saint Joseph in the south of the island, then the dengue wave spread to the west and the north. In 2017, 2018 and 2019, most dengue cases occurred in the west, notably in the cities of Saint Paul, Saint Louis, and La Possession, and in the south especially in Saint Pierre and Petite-Île. Unlike previous years, the 2020 dengue outbreak was characterized by the circulation of DENVs in the west of the island at the beginning of the outbreak. Thereafter, the number of cases increased rapidly and a wider geographic spread was observed. In 2020, most DENV-3 cases were reported in the east, in particular in Saint André, while overall DENV circulation in this city was low. For 2021, the west of the island is the most affected, particularly in the cities of Le Port, La Possession, and Saint Paul. Several factors related to DENV genotypes, human populations, mosquito vectors, and environmental and weather, as well as the interactions between these factors, may explain the observed spatiotemporal distribution of dengue cases in Reunion over the past few years. We have also examined how some of these factors may explain the epidemiology of dengue in Reunion.

Factors affecting the emergence and spread of DENV in Reunion Island

Human demographics. Reunion Island covers an area of 2,512 km² for a population of about 850,000 inhabitants, with an average density of 339.8 inhabitants per km². Between 2007 and 2012, the population increased by an average of 1% per year and since 2012, the population increased by 0.5% [45]. The population is expected to reach 1 million by 2030. Due to the mountainous nature of the center of the island, more than 50% of the population is located in coastal areas, where the density can reach over 1,000 inhabitants per km² [46]. The main cities are Saint Denis in the north (147,931 inhabitants), Saint Paul in the west (104,519 inhab.), and Saint Pierre in the south (84,212 inhab.) (Fig 1).

From 2016 to 2021, a majority of dengue cases (approximately 95%) were observed in the western and southern coastal areas in dense population centers [43]. However, although equally densely populated, the northern region reported only a small percentage (approximately 3%) of cases, suggesting that demographic characteristics alone do not explain dengue

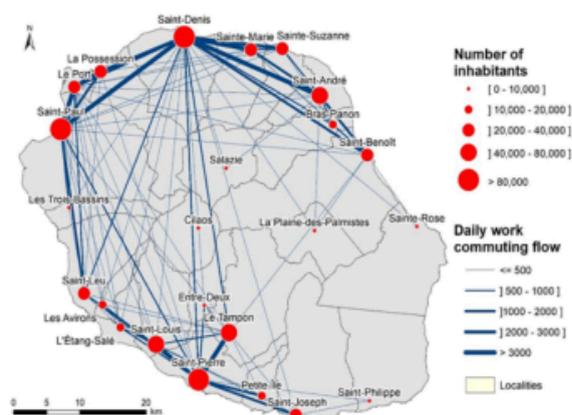


Fig 3. Population and daily commuting mobilities, Reunion Island, 2016. Population and daily commuting mobilities, Reunion Island, 2016. Census and mobility data are open data available from <https://www.insee.fr/fr/statistiques>; base map: French national geographic institute, BD TOPO—data available under the open license Etalab 2.0 (<https://geoservices.ign.fr/bdtopo>).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010547.g003>

transmission in Reunion. As far as we know, the relationship between demography and dengue circulation [47] has not been studied in Reunion.

Geographic mobility of human populations. Geographic mobility into and within Reunion contribute to the introduction and spread of DENV. The 2 airports (Roland Garros and Pierrefonds) handle over 2.5 million passengers a year, a number increasing on average by 3.5% per year since 2005. Most of Reunion's air traffic is with Mauritius and mainland France. However, there are many direct and indirect air links with Southeast Asia, where dengue is endemic, thus facilitating the potential introduction of new dengue serotypes/genotypes to the island [41]. Indeed, from 2008 to 2020, between 1 and 9 confirmed dengue cases were imported each year from Asia (Cambodia, India, Indonesia, Malaysia, Myanmar, the Philippines, Sri Lanka, and Thailand), neighboring Indian Ocean islands (the Comoros archipelago, Madagascar, the Maldives, and the Seychelles), Oceania (French Polynesia), but also Central America (Nicaragua), South America (French Guiana and Brazil), the French Caribbean islands (Guadeloupe and Martinique), and Africa (Tanzania) [44]. Of note, in 2015 to 2016, 3 different serotypes (DENV-1, DENV-2, and DENV-3) were identified in 3 travelers returning from Indonesia and Malaysia [44], highlighting the diversity of DENV variants regularly introduced to the island. Also, comparison of the complete DENV-2 genomes from Reunion (2018) and Seychelles (2016) revealed 99.8% identity [48], suggesting that these DENV strains may have circulated between the SWIO islands.

Within the island, population movements are continuous between all areas resulting in active daily interconnection (Fig 3). After a dengue introduction into a given area of the island, the circulation of the virus is progressive, spreading mainly locally around an epicenter through the vectors. Human population movement may contribute to the emergence of new epicenters, notably when outbreak spreads throughout the island, even in remote locations from the original epicenter.

Climatic factors. The climate of Reunion is subtropical, characterized by 2 seasons: the austral winter (or “dry season”) from May to October, with mild temperatures (average minima of 17 to 20°C and average maxima of 26 to 28°C_a, at sea level), less precipitation and trade winds blowing regularly from the east; the austral summer (or “rainy season”), from

November to April, with higher temperatures (average minima ranging from 21 to 24°C, and average maxima from 28 to 31°C, at sea level), humidity and rainfall (<http://www.meteofrance.re/climat/description-du-climat>). Local variations in climate are pronounced due to the highly uneven relief and different wind exposures. The east is exposed to oceanic humidity brought by the trade winds and registers some world rainfall records, with cumulative measures exceeding 10 meters per year in some places (annual maximum of 15,931 mm), and even in the dry season, rainfall remains significant. Conversely, the western leeward side of the island benefits from the shelter of the relief and is much drier (annual minimum of 183 mm).

Even if some contrasts exist, this subtropical climate is suitable for the development of the dengue vector, *Ae. albopictus*, throughout the year, particularly on the coastal parts of the island [24,49]. This annual persistence seems to be more marked in recent years with mosquito densities remaining relatively high on the coast during the austral winter. The current dengue outbreak is occurring under favorable conditions as records of temperatures have been reported since 1971: 2019 was the warmest year recorded since measurements began over 50 years ago (Fig 4). Indeed, warmer temperatures favor the development of vectors from aquatic to adult stages (see next section), as well as dengue transmission, by shortening the extrinsic incubation period and increasing vector competence [50]. Interestingly, the first 2 dengue outbreaks in Reunion (1977 and 2004) occurred during hot years with above-normal annual temperatures (Fig 4). The impact of rainfall on current dengue outbreaks is less clear. Indeed, 2017 was classified by Météo France as the third wettest year since 1972, whereas 2019 was the sixth driest year in 50 years.

Entomological and environmental factors. Twelve mosquito species including *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* are recorded in Reunion [51]. As in Madagascar, Mauritius and Seychelles, *Ae. albopictus* is the main dengue vector in Reunion [16]; only a few populations of *Ae. aegypti* persist in certain isolated areas [49]. *Ae. albopictus* is present throughout the island and remains active up to 1,200 m [24]. The abundance of *Ae. albopictus* is high during the austral summer, with a peak in March, although some variation is observed across the island [52]. Temperatures positively impact the development of aquatic stages [53]. Likewise, precipitation favors the creation of breeding sites, which are necessary for larval development [24]. However, heavy rainfall can sometimes wash out breeding sites, increasing mortality of aquatic stages [54].

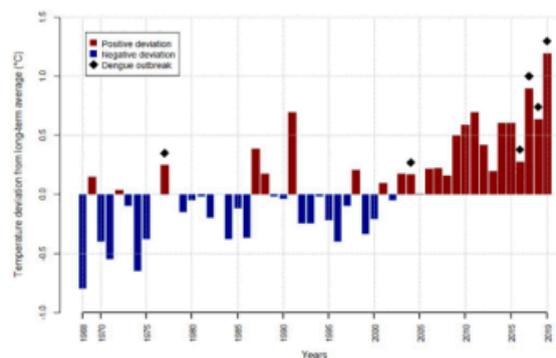


Fig 4. Average annual temperature in Reunion Island, 1968 to 2019 (deviation from long-term average). Black diamonds indicate dengue outbreaks.

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010547.g004>

Biotic factors, and in particular human behavior, also have an important effect on the population dynamics of *Ae. albopictus*. The storage of water in containers (e.g., flower plates or vases) provides breeding sites, which can be productive even during dry seasons [24]. These anthropogenic breeding sites favor the transmission and endemicity of dengue in tropical areas as observed for *Ae. aegypti* [55,56]. In Reunion, the monitoring of breeding sites conducted by the Regional Health Agency indicates that anthropogenic sites are more numerous in the western part of the island [52]. Indeed, the drier climate in this region obliges the inhabitants to store water. These reasons (higher temperature, and breeding site availability throughout the year), may partly explain the higher abundances of *Ae. albopictus* in the west of the island, and the higher DENV transmission.

Control strategies against DENV in Reunion Island and SWIO islands

In the absence of specific treatments to control human infection by DENVs, the availability of vaccines would be the preferred method to reduce worldwide DENV transmission, both in local populations and travelers. However, a tetravalent vaccine with a high level of protection against all DENV serotypes is not yet available. Moreover, the Dengvaxia vaccine is currently subject to safeguards [57] and its use is not recommended for French overseas territories. Therefore, controlling *Ae. albopictus* populations, the main vector of DENV in the SWIO islands, is the only affordable measure to limit the transmission of DENV.

The current implementation of vector control against *Ae. albopictus* in Reunion and the other SWIO islands is mainly based on mechanical suppression of the breeding sites and chemical treatments with insecticides. In Reunion, since 2007, vector control programs are performed using *Bti* (*Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins) for larval control and deltamethrin (pyrethroids) against adults [58]. In Mauritius, in addition to deltamethrin-based adulticide treatments, temephos (organophosphate) is used against larvae. However, the effectiveness of vector control is limited by the difficulty of accessing private gardens that do not allow an exhaustive coverage of the areas to be treated [24] and by the multiplicity of cryptic breeding sites, making their treatment difficult. Besides, the control of mosquito populations using insecticides is increasingly threatened by the selection of resistance mechanisms and is disfavored due to the associated collateral environmental damage.

In recent years, several alternative, innovative and environmentally-friendly methods have been developed to control *Ae. albopictus* [59–61]. Among these methods, the sterile insect technique (SIT) is based on the principle of releasing males rendered sterile by irradiation, into the environment to mate with wild females [62,63]. These females will therefore not produce viable embryos, resulting in the population reduction. Pilot trials have been conducted in Italy to reduce *Ae. albopictus* populations [64,65], and a field trial is ongoing in Reunion [66]. In addition to SIT, incompatible insect technique (IIT) is also considered. IIT relies on the use of the maternally inherited Alphaproteobacteria *Wolbachia* to induce sterility in target populations through the cytoplasmic incompatibility (CI) phenotype. In mosquitoes, *Wolbachia* induce a form of embryonic death or CI resulting from sperm-egg incompatibility occurring when *Wolbachia* infected males mate with uninfected females or females infected with an incompatible *Wolbachia* strain [67]. IIT targeting *Ae. albopictus* has been successfully applied in a field trial in the United States [68]. In Reunion, IIT facilitated by the use of a selective sexing-strain [69] has shown promising results for controlling mosquito populations. WHO recommend integrated mosquito management to sustainably reduce their densities and arbovirus transmission [70]. Combining SIT and IIT technologies [71] has been shown to have an enhanced impact on *Aedes* control in China and Thailand [72,73].

Discussion

This review provides an update on dengue outbreaks in the SWIO region and discusses factors that may explain the uninterrupted circulation of the virus since 2017 in Reunion leading to an endemic situation. Based on recent public health data, we showed that different dengue serotypes are currently circulating in the islands of the SWIO region where competent mosquito vectors are present. This is consistent with a more widespread trend observed across the tropical belt and even beyond in subtropical and temperate regions colonized by *Aedes* vectors [8,20]. Besides the morbidity and mortality induced by each serotype, data suggest that the successive or cocirculation of DENV-1, DENV-2, and DENV-3 serotypes in Reunion may have contributed to the increase in disease severity through the ADE effect [19]. Indeed, the epidemiological profile of DENV has significantly changed since 2017 in Reunion with an increased incidence of both mild and severe disease, including in young patients. In addition, populations in the SWIO islands, including Reunion, experience a high prevalence of preexisting chronic conditions such as diabetes and heart disease, making comorbidities in local DENV infection common, and thus representing aggravating factors for the development of severe forms and deaths [74]. Another striking change is the increasing appearance of DENV-1-related ophthalmic disorders since late 2020.

Despite a reinforced vector control program, the increased DENV incidence observed in Reunion these last 4 years is not an exception worldwide. It may be explained by several factors such as (i) the human population of Reunion has increased 1.6 times in less than 30 years, 36% of whom are under 20 years old, and most of them were naive to DENV; (ii) human behaviors such as mobility, use of water storage containers; (iii) environmental and climatic factors that show, respectively, a deterioration of natural environments and an increase in temperatures; and (iv) the abundant vector populations of *Ae. albopictus* that are maintained almost year-round, including during the winter period.

The DENV outbreak that started in 2017 persists until today, suggesting that DENV has become endemic in Reunion. Mayotte seems to follow the same shift as Reunion, as previous microepidemics without severe cases have been replaced by a continuous circulation since 2019, with low level circulation during interepidemic periods. Due to the increasing public health burden caused by DENV in the SWIO islands, as well as the shift in DENV-associated pathologies, it is clear that DENV should be categorized as a major public health priority in the region, requiring multilevel control and intervention measures. Because Reunion and Mayotte are French territories welcoming many international travelers each year, they can be considered as a potential sources of DENV introduction to Europe and the world. Increased importation of DENV into southern Europe where *Ae. albopictus* has recently established, could present a serious health risk to European populations.

Limitations

We queried 2 bibliographic databases and cross-referenced the information with exhaustive data from health agencies. We cannot exclude the possibility that some articles may have escaped us, in particular concerning the dating of the first SWIO outbreaks, since the gray literature indicates earlier dates. The lack of access to detailed clinical data prevented the application of any protocol or meta-analysis. The lack of completeness of serology and its heterogeneity may have introduced a bias in our estimates of disease incidence.

Conclusions

Despite the implementation of a reinforced surveillance of dengue as a compulsory disease and years of vector control program mainly based on insecticides, the DENV circulation that

was sporadic is tending toward an endemic pattern in Reunion and probably in the SWIO region. Thus, emphasizing the fact that this health risk must be addressed through a holistic approach at the regional and global levels.

Key Learning Points

- Strong socioeconomic links exist between the South West Indian Ocean (SWIO) islands and Southeast Asia (especially China, Thailand, and India), the region of the world most affected by dengue, which may facilitate the regular introduction of dengue virus (DENV) serotypes/genotypes into the region.
- Climatic (temperature and rainfall) and anthropogenic (demography and human activities) factors in the west of Reunion favor the abundance of *Aedes albopictus* populations and consequently the transmission of dengue.
- Certain indicators illustrate the endemic trend of dengue in Reunion: (i) uninterrupted circulation of DENV since 2017 in a mostly naive population; (ii) cocirculation of different serotypes; and (iii) an increase number of cases with severe forms and deaths.
- Conventional vector control actions (mechanical suppression of breeding sites and treatments with insecticides) must be reinforced by alternative methods as part of an integrated strategy. In this context, pilot trials of sterile insect technique (SIT) and incompatible insect technique (IIT) are underway against *Ae. albopictus* in Reunion.

Top Five Papers

1. Vasilakis N, Weaver SC. Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence. In: *Advances in Virus Research* [Internet]. Elsevier; 2008 [cited 2021 May 19]. p. 1–76. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065352708004016>
2. Saeed O, Asif A. Dengue virus disease; the origins. In: *Dengue Virus Disease* [Internet]. Elsevier; 2020 [cited 2021 May 19]. p. 9–16. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128182703000023>
3. Messina JP, Brady OJ, Golding N, Kraemer MUG, Wint GRW, Ray SE, et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol*. 2019 Sep;4(9):1508–15.
4. Delatte H, Gimonneau G, Triboire A, Fontenille D. Influence of Temperature on Immature Development, Survival, Longevity, Fecundity, and Gonotrophic Cycles

of *Aedes albopictus*, Vector of Chikungunya and Dengue in the Indian Ocean. *J Med Entomol.* 2009 Jan 1;46(1):33–41.

5. Tran A, Mangeas M, Demarchi M, Roux E, Degenne P, Haramboure M, et al. Complementarity of empirical and process-based approaches to modelling mosquito population dynamics with *Aedes albopictus* as an example—Application to the development of an operational mapping tool of vector populations. *PLoS ONE.* 2020 Jan 17;15(1):e0227407.

Acknowledgments

The authors are grateful to all general practitioners, clinicians (CHU Reunion), and laboratories for biological analyses involved in the dengue surveillance allowing to recording the dengue cases occurring in Reunion.

References

1. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6: e1760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760> PMID: 22880140
2. Messina JP, Brady OJ, Golding N, Kraemer MUG, Wint GRW, Ray SE, et al. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol.* 2019; 4:1508–1515. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8> PMID: 31182801
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 2013; 496:504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060> PMID: 23563266
4. World Health Organization. Dengue and severe dengue. World Health Organ 2021. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (accessed July 8, 2021).
5. Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, et al. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis.* 2016; 16:712–723. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00026-8) PMID: 26874619
6. About Dengue: What You Need to Know | Dengue | CDC 2019. <https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html> (accessed July 8, 2021).
7. Vasilakis N, Weaver SC. Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence. In: Maramorosch K, Shatkin AJ, Murphy FA, editors. *Adv. Virus Res.*, vol. 72, Elsevier; 2008, p. 1–76.
8. Gubler DJ. Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: History and Current Status. In: Bock G, Goode J, editors. *Novartis Found. Symp.*, Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; 2008, p. 3–22.
9. Sabin AB, Schlesinger RW. Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science.* 1945; 101:640–642. <https://doi.org/10.1126/science.101.2634.640> PMID: 17844088
10. Sabin AB, Young I. A Complement Fixation Test for Dengue. *Exp Biol Med.* 1948; 69:478–480. <https://doi.org/10.3181/00379727-69-16761p> PMID: 18106662
11. Hotta S. Experimental Studies on Dengue: I. Isolation, Identification and Modification of the Virus. *Jour. Infect Dis.* 1952; 90:1–9. <https://doi.org/10.1093/infdis/90.1.1> *Infectious Diseases*, vol. 90, no. 1, Jan. 1952, pp. 1–9. PMID: 14888958
12. Hammon WMD, Rudnick A, Sather GE. Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand. *Science.* 1960; 131:1102–1103. <https://doi.org/10.1126/science.131.3407.1102> PMID: 14399343
13. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol.* 2009; 9:523–540. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003> PMID: 19460319

14. Chen R, Vasilakis N. Dengue—Quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011; 3:1562–1608. <https://doi.org/10.3390/v3091562> PMID: 21994796
15. Kramer MUG, Reiner RC Jr, Brady OJ, Messina JP, Gilbert M, et al. past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol*. 2019; 4:854–863. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y> PMID: 30833735
16. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes Infect*. 2009; 11:1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005> PMID: 19450706
17. Sabin AB. Research on Dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*. 1952; 1:30–50. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1952.1.30> PMID: 14903434
18. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 2013; 158:1445–1459. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1645-3> PMID: 23471635
19. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, et al. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*. 2017; 358:929–932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836> PMID: 29097492
20. Brady OJ, Hay SI. The global expansion of dengue: how *Aedes aegypti* mosquitoes enabled the first pandemic arbovirus. *Annu Rev Entomol*. 2020; 65:191–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024918> PMID: 31594415
21. CDC. Principles of Epidemiology. Lesson 1 Section 11, CDC 2012. <https://www.cdc.gov/csels/dsepd/ss1978/lesson1/section11.html>.
22. Saeed O, Asif A. Dengue virus disease; the origins. In: Saeed O, Qureshi AI, editors. *Dengue Virus Dis. Orig. Outbreak*, Elsevier; 2020, p. 9–16.
23. Tortosa P, Pascalis H, Guernier V, Cardinale E, Le Corre M, Goodman SM, et al. Deciphering arboviral emergence within insular ecosystems. *Infect Genet Evol*. 2012; 12(1333–1339). <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.024> PMID: 22504353
24. Delatte H, Dehecq JS, Thiria J, Domerg C, Paupy C, Fontenille D. Geographic Distribution and Developmental Sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) During a Chikungunya Epidemic Event. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2008; 8:25–34. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0649> PMID: 18171104
25. Benkimoun S, Atyame C, Haramboure M, Degenne P, Thebault H, et al. Dynamic mapping of dengue basic reproduction number. *Results in Physics*. 2021; 29(104687).
26. Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DA. The PRISMA Group. Preferred reporting items for systematic reviews and meta-analyses: the PRISMA statement. *PLoS Med*. 2009; 6(e1000097). <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097> PMID: 19621072
27. Benchimol EI, Smeeth L, Guttman A, Harron K, Moher D, Petersen I, et al. The reporting of studies conducted using observational routinely-collected health data (RECORD) statement. *PLoS Med*. 2015; 12:e1001885. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001885> PMID: 26440803
28. McCarthy DD, Brent RH. An account of an outbreak of dengue in Dzaoudi. Comoro Islands. *E. Afr Med J*. 1943; 20:293–298.
29. Coulanges P, Clerc Y, Jousset FX, Rodhain F, Hannoun C. Dengue on Réunion. Isolation of a strain at the Pasteur Institute of Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1979; 72:205–209. PMID: 554772
30. Kles V, Michault A, Rodhain F, Mevel F, Chastel C. A serological survey regarding Flaviviridae infections on the island of Réunion (1971–1989). *Bull Soc Pathol Exot*. 1994; 87:71–76. PMID: 8061530
31. Metselaar D, Grainger CR, Oei KG, Reynolds DG, Pudney M, Leake CJ, et al. An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull World Health Organ*. 1980; 58:937–943. PMID: 6971192
32. Calisher CH, Nuti M, Lazuick JS, Ferrari JDM, Kappus KD. Dengue in the Seychelles. *Bull World Health Organ*. 1981; 59:619–622. PMID: 6976229
33. Boisier P, Morvan J, Laventure S, Charrier N, Martin E, Ouledi A, et al. Dengue 1 epidemic in the Grand Comoro Island (Federal Islamic Republic of the Comores). March–May 1993. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1994; 74:217–229. PMID: 7840689
34. Ouledi A, Toyb M, Aubry P, Gaüzere B-A. Health history and health challenges in the Union of The Comoros in 2012. *Médecine Santé Trop*. 2012; 22:346–354. <https://doi.org/10.1684/mst.2013.0135> PMID: 23485662
35. D'Ortenzio E, Balleydier E, Baville M, Filleul L, Renault P. Dengue à la Réunion et dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien. *Médecine Mal Infect*. 2011; 41:475–479. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2010.11.021> PMID: 21295427

36. Pierre V, Thiria J, Rachou E, Sissoko D, Lassale C, Renault P. Epidémie de dengue 1 à la Réunion en 2004. 2005.
37. Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes J-M, Zeller H, et al. Outbreak of Dengue and Chikungunya Fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14:1135–1137. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071521> PMID: 18598641
38. Randrianasolo L, Raelina Y, Ratsitorahina M, Ravolomanana L, Andriamandimby S, Heraud J-M, et al. Sentinel surveillance system for early outbreak detection in Madagascar. *BMC Public Health*. 2010; 10:31. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-10-31> PMID: 20092624
39. Issack MI, Pursam VN, Barkham TMS, Ng L-C, Inoue M, Manraj SS. Reemergence of Dengue in Mauritius. *Emerg Infect Dis*. 2010; 16:716–718. <https://doi.org/10.3201/eid1604.091582> PMID: 20350397
40. Gautret P, Simon F, Askling HH, Bouchaud O, Leparco-Goffart I, Ninove L, et al. Dengue type 3 virus infections in European travellers returning from the The Comoros and Zanzibar, February–April 2010. *Euro Surveill*. 2010; 15:19541. <https://doi.org/10.2807/ese.15.15.19541-en> PMID: 20429996
41. Santé Publique France. Points Epidémiologiques—Dengue—Océan Indien <https://www.santepubliquefrance.fr/recherche/#search=dengue&themes=dengue®ions=Oc%C3%A9an%20Indien> (accessed September 8, 2021).
42. Dellagi K, Salez N, Maquart M, Larrieu S, Yssouf A, Silai R, et al. Serological Evidence of Contrasted Exposure to Arboviral Infections between Islands of the Union of The Comoros (Indian Ocean). *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10:e0004840. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004840> PMID: 27977670
43. Larrieu S, Michault A, Polycarpe D, Schooneman F, D'Ortenzio E, Filleul L. data outbreaks: a constant risk for Reunion Island. Results from a seroprevalence study among blood donors. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014; 108:57–59. <https://doi.org/10.1093/trstmh/trt110> PMID: 24356127
44. Vincent M, Larrieu S, Vilain P, Etienne A, Solet J-L, François C, et al. From the threat to the large outbreak: dengue on Reunion Island, 2015 to 2018. *Euro Surveill*;2019:24. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900346> PMID: 31771702
45. Sui-Seng S. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. 853 700 habitants au 1er janvier 2017. INSEE Flash La Réunion-Mayotte. 2019:167.
46. Besson L. Institut National de la Statistique et des Etudes Economiques. Un Réunionnais sur quatre vit dans les Hauts. INSEE Flash La Réunion-Mayotte. 2017;89.
47. Marti R, Li Z, Catry T, Roux E, Mangeas M, Handschumacher P, et al. A Mapping Review on Urban Landscape Factors of Dengue Retrieved from Earth Observation Data, GIS Techniques, and Survey Questionnaires. *Remote Sens*. 2020; 12:932. <https://doi.org/10.3390/rs12060932>
48. Pascalis H, Biscornet L, Toty C, Hafsia S, Roche M, Desprès P, et al. Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Epidemic Strains from Reunion Island and the Seychelles. *Microbiol Resour Announc*. 2020; 9. <https://doi.org/10.1128/MRA.01443-19> PMID: 31974157
49. Boyer S, Foray C, Dehecq J-S. Spatial and Temporal Heterogeneities of *Aedes albopictus* Density in La Reunion Island: Rise and Weakness of Entomological Indices. *PLoS ONE*. 2014; 9:e91170. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0091170> PMID: 24637507
50. Guo X-X, Zhu X-J, Li C-X, Dong Y-D, Zhang Y-M, Xing D, et al. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for DEN2-43 and New Guinea C virus strains of dengue 2 virus. *Acta Trop*. 2013; 128:566–570. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.006> PMID: 23962388
51. Boussès P, Dehecq JS, Brengues C, Fontenille D. Inventaire actualisé des moustiques (Diptera: Culicidae) de l'île de La Réunion. Océan Indien. *Bull Société Pathol Exot*. 2013; 106:113–125. <https://doi.org/10.1007/s13149-013-0288-7> PMID: 23681758
52. Tran A, Mangeas M, Demarchi M, Roux E, Degenne P, Haramboure M, et al. Complementarity of empirical and process-based approaches to modelling mosquito population dynamics with *Aedes albopictus* as an example—Application to the development of an operational mapping tool of vector populations. *PLoS ONE*. 2020; 15:e0227407. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227407> PMID: 31951601
53. Delatte H, Gimonneau G, Triboire A, Fontenille D. Influence of Temperature on Immature Development, Survival, Longevity, Fecundity, and Gonotrophic Cycles of *Aedes albopictus*, Vector of Chikungunya and Dengue in the Indian Ocean. *J Med Entomol*. 2009; 46:33–41. <https://doi.org/10.1603/033.046.0105> PMID: 19198515
54. Dieng H, Rahman GMS, Abu Hassan A, Che Salmah MR, Satho T, Miake F, et al. The effects of simulated rainfall on immature population dynamics of *Aedes albopictus* and female oviposition. *Int J Biometeorol*. 2012; 56:113–120. <https://doi.org/10.1007/s00484-011-0402-0> PMID: 21267602
55. Barrera R. Considerations for Disrupting Dengue Virus Transmission; Ecology of *Aedes aegypti* and Current (Nongenetic) Methods of Control. In: Adelman ZN, editor. *Genet. Control Malar. Dengue*, Elsevier; 2015, p. 103–24.

56. Barrera R, Amador M, MacKay AJ. Population Dynamics of *Aedes aegypti* and Dengue as Influenced by Weather and Human Behavior in San Juan, Puerto Rico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011; 5:e1378. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001378> PMID: 22206021
57. Thomas SJ, Yoon I-K. A review of Dengvaxia: Development to deployment. *Hum Vaccines Immunother*. 2019; 15:2295–2314. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1658503> PMID: 31589551
58. Dehecq J-S, Bavielle M, Margueron T, Mussard R, Filleul L. La réémergence du chikungunya à La Réunion en 2010: évolution des actions de lutte antivectorielle. *Bull Société Pathol Exot*. 2011; 104:153–160. <https://doi.org/10.1007/s13149-010-0121-5> PMID: 21181327
59. Achee NL, Grieco JP, Vatandoost H, Seixas G, Pinto J, Ching-NG L, et al. Alternative strategies for mosquito-borne arbovirus control. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13:e0006822. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006822> PMID: 30605475
60. Faraji A, Unlu I. The Eye of the Tiger, the Thrill of the Fight: Effective Larval and Adult Control Measures Against the Asian Tiger Mosquito, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in North America. *J Med Entomol*. 2016; 53:1029–1047. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw096> PMID: 27354440
61. Flores HA, O'Neill SL. Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. *Nat Rev Microbiol*. 2018; 16:508–518. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0025-0> PMID: 29777177
62. Dunn DW, Follett PA. The sterile insect technique (SIT)-an introduction. *Entomol Exp Appl*. 2017; 164:151–154.
63. Proverbs MD. Induced Sterilization and Control of Insects. *Annu Rev Entomol*. 1969; 14:81–102. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.14.010169.000501> PMID: 4882184
64. Bellini R, Calvitti M, Medici A, Carrieri M, Celli G, Maini S. Use of the Sterile Insect Technique Against *Aedes albopictus* in Italy: First Results of a Pilot Trial. In: Vreysen MJB, Robinson AS, Hendrichs J, editors. *Area-Wide Control Insect Pests*, Dordrecht: Springer Netherlands; 2007, p. 505–15.
65. Bellini R, Balestrino F, Medici A, Gentile G, Veronesi R, Carrieri M. Mating Competitiveness of *Aedes albopictus* Radio-Sterilized Males in Large Enclosures Exposed to Natural Conditions. *J Med Entomol*. 2013; 50:94–102. <https://doi.org/10.1603/me11058> PMID: 23427657
66. Gouagna LC, Damiens D, Oliva CF, Boyer S, Le Goff G, Brengues C, et al. Strategic Approach, Advances, and Challenges in the Development and Application of the SIT for Area-Wide Control of *Aedes albopictus* Mosquitoes in Reunion Island. *Insects*. 2020; 11:770. <https://doi.org/10.3390/insects11110770> PMID: 33171885
67. Yen JH, Barr AR. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature*. 1971; 232:657–658. <https://doi.org/10.1038/232657a0> PMID: 4937405
68. Mains JW, Brelsfoard CL, Rose RI, Dobson SL. Female Adult *Aedes albopictus* Suppression by Wolbachia-Infected Male Mosquitoes. *Nat Sci Rep*. 2016; 6:33846. <https://doi.org/10.1038/srep33846> PMID: 27659038
69. Lebon C, Benlali A, Atyame C, Mavingui P, Tortosa P. Construction of a genetic sexing strain for *Aedes albopictus*: a promising tool for the development of sterilizing insect control strategies targeting the tiger mosquito. *Parasit Vectors*. 2018; 11:658. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3212-y> PMID: 30583741
70. World Health Organization, Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. *Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control*. WHO and TDR. Geneva: 2009.
71. Atyame CM, Labbé P, Lebon C, Weill M, Moretti R, Marini F, et al. Comparison of Irradiation and Wolbachia Based Approaches for Sterile-Male Strategies Targeting *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*. 2016; 11:e0146834. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0146834> PMID: 26765951
72. Zheng X, Zhang D, Li Y, Yang C, Wu Y, Liang X, et al. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature*. 2019; 572:56–61. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1407-9> PMID: 31316207
73. Kittayapong P, Ninphanomchai S, Limohpasmanee W, Chansang C, Chansang U, Mongkalagoon P. Combined sterile insect technique and incompatible insect technique: The first proof-of-concept to suppress *Aedes aegypti* vector populations in semi-rural settings in Thailand. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13:e0007771. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007771> PMID: 31658265
74. Toledo J, George L, Martinez E, Lazaro A, Han WW, Coelho GE, et al. Relevance of Non-communicable Comorbidities for the Development of the Severe Forms of Dengue: A Systematic Literature Review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10:e0004284. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004284> PMID: 26727113

La réalisation de cette revue nous a permis d'ancrer un peu plus le projet de thèse dans la réalité épidémiologique de la dengue à La Réunion. Se rendre compte que le pattern de la dengue évoluait sous nos yeux, et de façon sans précédent sur l'île, nous a fait ajuster nos priorités de recherche, sans pour autant changer notre hypothèse générale. Pour rappel, cette dernière était que les interactions multipartites entre *Wolbachia*, *Ae. albopictus*, et DENV définissent la trajectoire et le devenir des épidémies de dengue à La Réunion. Par le biais de cette revue nous avons en effet pu identifier des questions dont les réponses pourraient aider, entre autres, les services de lutte anti-vectorielle à gérer efficacement les futures épidémies dans un nouveau contexte sanitaire qu'est l'endémisation de la dengue sur l'île. Le projet de thèse n'était alors plus uniquement d'étudier l'effet de *Wolbachia* sur la compétence vectorielle des *Ae. albopictus* de La Réunion, comme ce qui avait été initialement prévu, mais de mettre cet effet en relation avec les patterns épidémiologiques particuliers observés au sein de l'île du fait de ce nouveau contexte sanitaire. De ce fait, nous avons décidé d'étudier un peu moins en détails les mécanismes moléculaires d'interactions tripartites entre moustiques, *Wolbachia*, et DENV, mais de façon plus approfondie leur rôle dans l'hétérogénéité spatiale de l'incidence de la dengue sur l'île en s'appuyant sur le matériel biologique local et contemporain de l'épidémie. Le mémoire expérimental ci-après présente ces travaux de recherches selon trois axes: (i) une description des souches de DENV circulant à La Réunion, (ii) la mesure de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. albopictus* de La Réunion vis-à-vis des souches locales de DENV en lien avec leur densité en *Wolbachia*, et (iii) la mesure de la compétence vectorielle des *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* de la zone du SOOI quant à la transmission de différents arbovirus d'intérêt.

Mémoire expérimental

1. Description des DENV circulant à La Réunion

1.1. Introduction

La synthèse bibliographique permet de constater que la mise en place de cycle épidémique du DENV, dépend notamment des interactions entre le génotype du vecteur moustique d'une part et celui de la souche de DENV d'autre part (Kramer and Ciota 2015). Cela a été montré à de nombreuses reprises par des études *in cellulo* et *in insecta* (Lambrechts et al. 2009; Fansiri et al. 2013; Guo et al. 2013; Quintero-Gil et al. 2018; Wei et al. 2021). Par ailleurs, ces interactions ne sont pas des paramètres figés dans le temps. Elles peuvent notamment évoluer au gré des mutations qui surviennent au sein des génomes viraux. Ces mutations peuvent, par exemple, favoriser la transmission par un vecteur donné des souches virales les arborant, augmentant ainsi l'ouverture du filtre de compatibilité. Cela a été le cas lors de l'épidémie de Chikungunya à La Réunion en 2005-2006 puisqu'une mutation A226V sur le gène E a conduit à une meilleure transmission par *Ae. albopictus* (Schuffenecker et al. 2006; Vazeille et al. 2007).

A La Réunion, le vecteur impliqué dans l'interaction avec le virus de la dengue (DENV) est le moustique tigre *Ae. albopictus*. De récentes analyses génomiques microsatellites et de polymorphisme nucléotidique entre et au sein de différentes populations d'*Ae. albopictus* échantillonnées à travers toute l'île de La Réunion, ont permis de démontrer une diversité génétique importante au sein des populations, sans pour autant qu'il y ait de différenciation génétique entre elles (Sherpa et al. 2018; Latreille et al. 2019). Pour ce qui est du DENV, et comme mentionné précédemment, l'épidémie débuté depuis fin 2017 a fait intervenir la circulation conjointe et/ou successive de trois différents sérotypes du DENV, le sérotype 4 étant le seul à ne pas avoir encore été détecté chez des cas autochtones depuis le début de cette épidémie (Hafsia et al. 2022). Le sérotype 2 a été le seul sérotype détecté de 2017 à fin 2019, puis des cas autochtones liés à des infections par les sérotypes 1 et 3 ont également commencé à être mis en évidence. Le sérotype 1 est ensuite progressivement devenu majoritaire sur les deux autres au cours de l'année 2020, jusqu'à être l'unique sérotype détecté en 2021.

Les travaux menés dans la première partie consistaient à caractériser génétiquement les souches de ces différents sérotypes de DENV circulant depuis fin 2017 à 2021 à La Réunion. Cela nécessitait la recherche et l'acquisition d'échantillons de sang et/ou de plasma de cas autochtones de DENV à La Réunion au cours de cette épidémie. Par ailleurs, une circulation inter-île de la dengue au sein de la région du SOOI ayant déjà été suggérée précédemment, des échantillons des Seychelles ont également été récupérés auprès des partenaires de l'UMR PIMIT. Ces acquisitions sont explicitées en détail dans la section suivante. Les échantillons exploitables (volume, quantité et qualité d'ARN viral) ont ensuite été séquencés. Les informations issues du séquençage ont renseigné sur les génotypes en présence lors de l'épidémie de La Réunion, mais également sur leurs origines potentielles, ou tout du moins sur leur filiation géographique, grâce à la réalisation de phylogénies.

1.2. Échantillonnage et détection des virus

Les acquisitions d'échantillons ont été faites par des prélèvements sanguins chez des patients volontaires à La Réunion et aux Seychelles. Les échantillons des Seychelles ont été collectés par le Ministère de la Santé des Seychelles lors des épidémies de dengue de janvier 2015 à décembre 2016. A La Réunion, les échantillons provenaient de patients volontaires ou inclus dans les projets de cohortes CARBO (Cohort of patients Infected by an Arbovirus) et DEMARE (Epidemiological study of DEngue virus infections in MAdagascar and REunion Island).

Les premiers travaux menés sur les prélèvements de deux patients réunionnais ont été rapportés dans une publication où j'ai été coauteure et qui est présentée dans la prochaine section (1.3. Publication 2: "Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Epidemic Strains from Reunion Island and the Seychelles").

Le projet CARBO (NCT01099852 sur clinicaltrials.gov) est une cohorte regroupant les données personnelles et échantillons de patients infectés par un arbovirus en France. Le projet a été initié à l'Hôpital Universitaire de La Martinique en 2010 et s'est étendu à La Réunion (CARBO-Réunion) à partir de 2018 suite au début de l'épidémie de dengue. A La Réunion, le projet est mené par le CHU et les échantillons sont conservés au Centre de Ressources Biologiques (CRB) de La Réunion. Certains échantillons ont pu être transférés au laboratoire PIMIT pour analyse. Le projet DEMARE porté par le Global Health Institute (Université de Genève) a été mené en collaboration avec le CHU de La Réunion et le laboratoire PIMIT. Il consiste en une étude épidémiologique dont l'objectif est de déterminer l'importance et le rôle des cas asymptomatiques de dengue dans la transmission du virus à La Réunion. Pour cela, des prélèvements sanguins ont été effectués sur des volontaires asymptomatiques vivant autour du lieu de résidence de cas autochtones déclarés lors de l'épidémie de 2019 à 2020. L'étude DEMARE, à laquelle j'ai pu contribuer, a d'ailleurs été valorisée par un article pour lequel je fais partie des co-auteurs (voir en Annexe 1. Publication 6 : "Investigation of Dengue Infection in Asymptomatic Individuals during a Recent Outbreak in La Réunion." De Santis et al., 2023). Ces deux projets de cohortes ont été approuvés par le Comité de Protection des Personnes en France, et des consentements écrits ont été recueillis auprès de chaque participant. Au cours de ce travail de thèse, un total de 216 échantillons de CARBO-Réunion et 397 échantillons de DEMARE ont été récupérés. A ces échantillons réunionnais se sont ajoutés 9 échantillons provenant de l'épidémie des Seychelles de 2016 et traités durant le stage de Master 2 de Mme Barbar Tatiana, que j'ai encadrée techniquement au cours de cette thèse. Le plasma de chacun de ces échantillons de sang a été récupéré par centrifugation, et l'ARN qui en a été extrait a ensuite été testé par des RT-qPCR sérotypes-spécifiques afin d'identifier les prélèvements positifs aux différents sérotypes de DENV (DENV-1 à -4). Cette méthodologie, empruntée à l'Institut Pasteur, a été mise en application au sein du laboratoire PIMIT. Les échantillons positifs et présentant une quantité suffisante d'ARN, presque uniquement des échantillons de DENV-1 (fin 2019 à 2021), ont été sélectionnés pour le séquençage du génome complet. Ces séquençages des souches de DENV-1 ont fait l'objet d'un article dont je suis co-première auteure, et qui est présenté dans la section 1.4. Publication 3: "Genetic characterization of Dengue virus serotype 1 circulating in Reunion Island, 2019-2021, and the Seychelles, 2015-2016".

1.3. Publication 2: “Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Epidemic Strains from Reunion Island and the Seychelles”



GENOME SEQUENCES



Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Epidemic Strains from Reunion Island and the Seychelles

Hervé Pascalis,^a Leon Biscornet,^{a,b} Céline Toty,^a Sarah Hafsia,^a Marjolaine Roche,^a Philippe Després,^a Célestine Atyame Nten,^a Justin Bibi,^c Meggy Louange,^{b,c} Jude Gedeon,^{b,c} Patrick Mavingui^a

^aUMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical, Université de La Réunion, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, Plateforme de Recherche CYROI, Sainte Clotilde La Réunion, France

^bInfectious Disease Surveillance Unit, Seychelles Public Health Laboratory, Public Health Authority, Ministry of Health, Victoria, Seychelles

^cDisease Surveillance and Response Unit, Epidemiology and Statistics Section, Public Health Authority, Ministry of Health, Victoria, Seychelles

ABSTRACT Dengue virus has recently reemerged in the southern Indian Ocean islands, causing outbreaks in Reunion Island and the Seychelles. In the present study, we determined the complete genome sequences of closely related clinical isolates of dengue virus type 2 circulating in the Seychelles in 2016 and Reunion Island in 2018.

Like many tropical regions in which competent mosquito vectors are present, the islands of the southwestern Indian Ocean have experienced a renewal of human pathogenic arbovirus emergence (1, 2). Indeed, dengue virus type 2 (DENV-2), belonging to the *Flavivirus* genus (*Flaviviridae* family), has reemerged, causing outbreaks in Reunion Island and the Seychelles. Between December 2017 and April 2019, 49,000 DENV-2-infected cases with 428 hospitalizations were recorded in Reunion Island (3, 4). In the Seychelles, 1,967 suspected cases with 215 hospitalizations were reported between January 2015 and December 2016 (5).

Here, we report the whole-genome sequencing of two DENV-2 strains, namely, RUJul, isolated from Saint-Gilles, Reunion Island, in 2018, and RU16417, isolated from Victoria, Seychelles, in 2016. Sera were collected from patients with dengue symptoms (fever, myalgia, headache, asthenia, and thrombocytopenia) and without recent travel history. RNA was extracted using the QIAamp kit (Qiagen). cDNA was synthesized using ProtoScript II with random primers (New England) and was purified using the QIAquick kit (Qiagen). Libraries were prepared with the Nextera XT kit (Illumina) and subjected to paired-end sequencing (2 × 250 bp) on an Illumina HiSeq 4000 system (Genoscreen). The total read counts were approximately 1,034,620 (RUJul) and 622,542 (RU16417). The read quality was assessed by FastQC (6). Adapters and leading and trailing low-quality bases (Q scores of <30) or N bases were removed using Trimmomatic software (7). Trimmed reads, ranging from 64 to 250 bases, were assembled by mapping to a reference Thai DENV-2 genome (GenBank accession number NC_001474) using Bowtie2 v2.1.0 (8). The numbers of reads that mapped to the reference genome were 498,356 (RUJul) and 264,288 (RU16417), giving coverage of 7× and 15×, respectively, with similar GC contents of 45%. Untranslated regions (UTRs) were further amplified by rapid amplification of cDNA ends (RACE) PCR using the SMARTer RACE 5'/3' kit (TaKaRa) with RNA extracted from culture supernatants of Vero E6 cytopathic cells resulting from infection with viremic patient sera (passage 1), and they were then Sanger sequenced (Genoscreen).

UTRs of 93 nucleotides (5' UTR) and 452 nucleotides (3' UTR) were manually added, and the resulting genomic sequences of about 10,724 nucleotides were aligned with a DENV reference set and annotated using Geneious (9). BLASTN analysis with multiple alignment revealed that the two genomes shared 99.8% identity and exhibited 93%

Citation Pascalis H, Biscornet L, Toty C, Hafsia S, Roche M, Després P, Atyame Nten C, Bibi J, Louange M, Gedeon J, Mavingui P. 2020. Complete genome sequences of dengue virus type 2 epidemic strains from Reunion Island and the Seychelles. *Microbiol Resour Announc* 9:e01443-19. <https://doi.org/10.1128/MRA.01443-19>

Editor Jelle Matthijssens, KU Leuven

Copyright © 2020 Pascalis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International license.

Address correspondence to Patrick Mavingui, patrick.mavingui@cns.fr.

Received 18 November 2019

Accepted 20 December 2019

Published 23 January 2020

Downloaded from <http://mra.asm.org/> on January 24, 2020 by guest

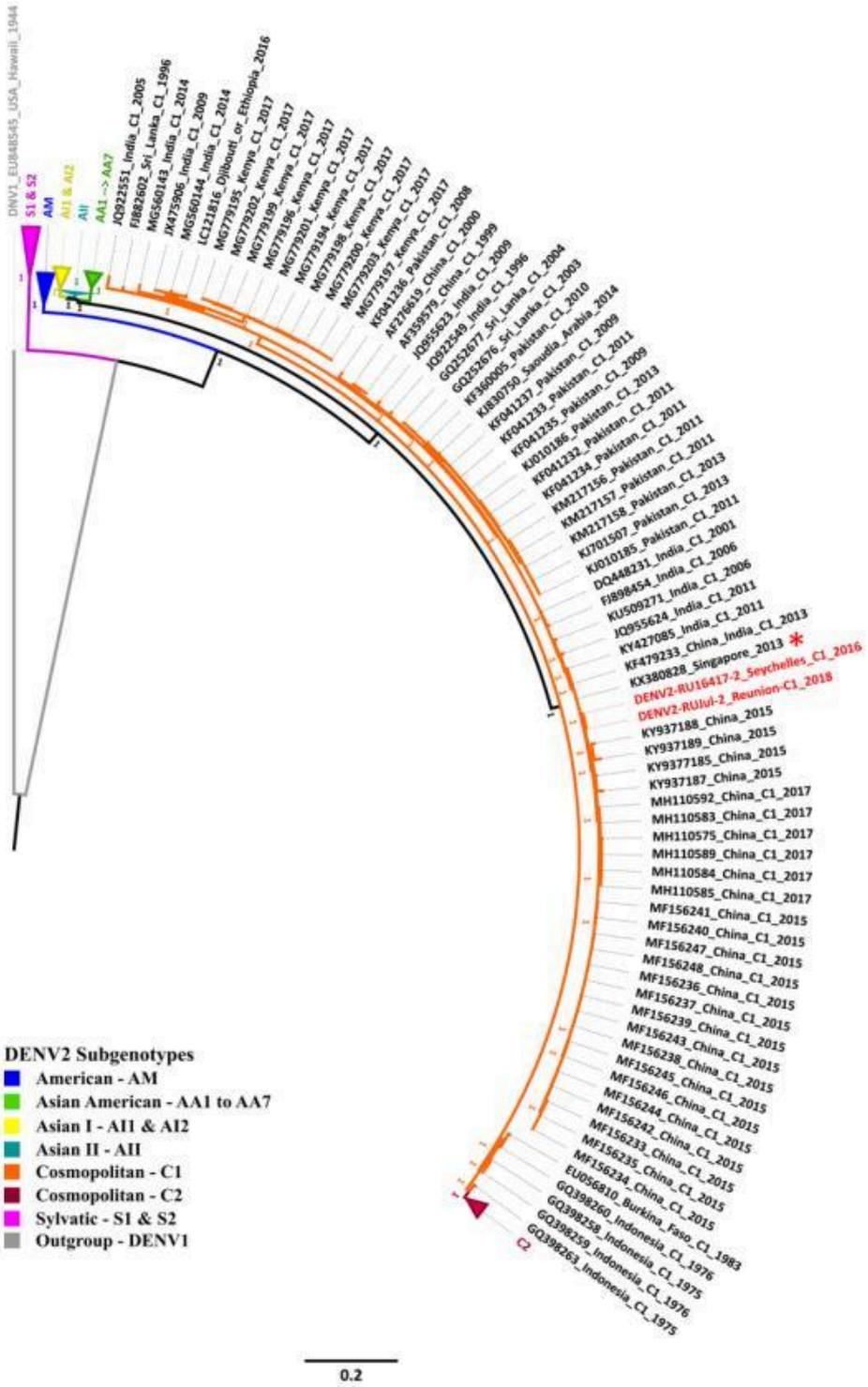


FIG 1 Phylogenetic tree analysis of DENV-2 strains. PhyML v3.0 software (12) was used to produce a maximum likelihood tree with the best-fit nucleotide substitution model (GTR+G+I), with complete genome sequences ($n = 230$) of selected (Continued on next page)

Downloaded from <http://mra.asm.org/> on January 24, 2020 by guest

FIG 1 Legend (Continued)

reference strains. Support values were calculated using the Bayes method implemented in PhyML. The clades of the other subgenotypes have been collapsed for clarity. A DENV-1 sequence was included as an outgroup. The scale bar indicates nucleotide substitutions per site. Strains in the tree are reported with the following information: GenBank accession number, country, subgenotype, and collection date. The two strains reported in this study are shown in red, and the closest sequence (GenBank accession number *KX380828*) is represented by a red asterisk. The phylogenetic tree was edited with FigTree v1.4.4 software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>).

identity with the genomic sequence of a DENV-2 strain from Thailand (GenBank accession number *KX380828*). Phylogenetic analysis of the two genomes with full sequences available for representative DENV strains (10) positioned the RUJUL and RU16417 strains within DENV-2 Cosmopolitan genotype lineage I (Fig. 1), confirming previous results (11). Genome annotation identified the expected polyprotein of about 3,754 amino acids, including 3 structural proteins (C, prM/M, and E) and 7 nonstructural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5) flanked by the UTRs described. Despite dengue virus outbreaks in the southwestern Indian Ocean, few complete genomes are currently available. The DENV-2 genomes provided here will allow better assessment of the evolutionary epidemiological history, considering the specific regional contexts regarding viral introduction, circulation, and stages of endemicity.

Data availability. The assembled genomes were deposited in GenBank under accession numbers *MN272404* (RUJUL) and *MN272405* (RU16417). Raw data are available in the NCBI SRA under BioProject accession number *PRJNA575805*.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the officials of the Ministry of Environment and Energy, the Ministry of Health, and the Seychelles Bureau of Standards for their assistance in obtaining the required permits, and we thank David Wilkinson for sequence submission.

This work was funded by PIMIT funds provided by the French institutions Reunion University, INSERM, CNRS, and IRD, FEDER INTERREG V Ocean-Indien 2014 to 2020 under convention GURDTI/2017-0788-6877, and the consortium ZIKAlliance project (European Union Horizon 2020 program under grant 735548). The funders had no role in study design, data collection and interpretation, or the decision to submit the work for publication.

REFERENCES

- Gould E, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. 2017. Emerging arboviruses: why today. *One Health* 4:1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>.
- Leta S, Beyene TJ, De Clercq EV, Amenu K, Kraemer MUG, Revie CW. 2018. Global risk mapping for major diseases transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int J Infect Dis* 67:25–35. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.11.026>.
- Santé Publique France. 2017. Surveillance de la dengue à la Réunion: point épidémiologique au 11 décembre 2017. Santé Publique France, Saint-Maurice, France. <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2017/surveillance-de-la-dengue-a-la-reunion.-point-epidemiologique-au-11-decembre-2017>.
- Santé Publique France. 2019. Surveillance de la dengue à la Réunion: point épidémiologique au 30 avril 2019. Santé Publique France, Saint-Maurice, France. <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2019/surveillance-de-la-dengue-a-la-reunion.-point-epidemiologique-au-30-avril-2019>.
- Ministry of Health. 2017. Health of our nation: health sector performance report 2017. Ministry of Health, Victoria, Seychelles. <http://www.health.gov.sc/wp-content/uploads/summary-hspr.pdf>.
- Andrews S. 2010. FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Bolger AM, Lohse M, Usadel B. 2014. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30:2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
- Langmead B, Salzberg SL. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods* 9:357–359. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Meintjes P, Drummond A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28:1647–1649. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
- Ali A, Ali I. 2017. The complete genome phylogeny of geographically distinct dengue virus serotype 2 isolates (1944–2013) supports further groupings within the Cosmopolitan genotype. *PLoS One* 10:e138900. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138900>.
- Pascal H, Turpin J, Roche M, Krejbich P, Gadea G, Atyame Nten C, Després P, Mavingui P. 2019. The epidemic of dengue virus type-2 Cosmopolitan genotype on Reunion Island relates to its active circulation in the southwestern Indian Ocean neighboring islands. *Heliyon* 5:e01455. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e01455>.
- Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Syst Biol* 59:307–321. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syq010>.

1.4. Publication 3: “Genetic characterization of Dengue virus serotype 1 circulating in Reunion Island, 2019- 2021, and the Seychelles, 2015-2016”

Hafsia et al. *BMC Infectious Diseases* (2023) 23:294
<https://doi.org/10.1186/s12879-023-08125-y>

BMC Infectious Diseases

RESEARCH

Open Access



Genetic characterization of dengue virus serotype 1 circulating in Reunion Island, 2019–2021, and the Seychelles, 2015–2016

Sarah Hafsia^{1†}, Tatiana Barbar^{1†}, David A Wilkinson¹, Célestine Atyame¹, Leon Biscornet², Justin Bibi³, Meggy Louange², Jude Gedeon², Olga De Santis⁴, Antoine Flahault⁴, André Cabie⁵, Antoine Bertolotti⁶ and Patrick Mavingui^{1*}

Abstract

Background An unprecedented increase in the number of cases and deaths reported from dengue virus (DENV) infection has occurred in the southwestern Indian ocean in recent years. From 2017 to mid-2021 more than 70,000 confirmed dengue cases were reported in Reunion Island, and 1967 cases were recorded in the Seychelles from 2015 to 2016. Both these outbreaks displayed similar trends, with the initial circulation of DENV-2 which was replaced by DENV-1. Here, we aim to determine the origin of the DENV-1 epidemic strains and to explore their genetic characteristics along the uninterrupted circulation, particularly in Reunion.

Methods Nucleic acids were extracted from blood samples collected from dengue positive patients; DENV-1 was identified by RT-qPCR. Positive samples were used to infect VERO cells. Genome sequences were obtained from either blood samples or infected-cell supernatants through a combination of both Illumina or MinION technologies.

Results Phylogenetic analyses of partial or whole genome sequences revealed that all DENV-1 sequences from Reunion formed a monophyletic cluster that belonged to genotype I and were closely related to one isolate from Sri Lanka (OL752439.1, 2020). Sequences from the Seychelles belonged to the same major phylogenetic branch of genotype V, but fell into two paraphyletic clusters, with greatest similarity for one cluster to 2016–2017 isolate from Bangladesh, Singapore and China, and for the other cluster to ancestral isolates from Singapore, dating back to 2012. Compared to publicly available DENV-1 genotype I sequences, fifteen non-synonymous mutations were identified in the Reunion strains, including one in the capsid and the others in nonstructural proteins (NS) (three in NS1, two in NS2B, one in NS3, one in NS4B, and seven in NS5).

Conclusion In contrast to what was seen in previous outbreaks, recent DENV-1 outbreaks in Reunion and the Seychelles were caused by distinct genotypes, all likely originating from Asia where dengue is (hyper)endemic in many countries. Epidemic DENV-1 strains from Reunion harbored specific non-synonymous mutations whose biological significance needs to be further investigated.

[†]These authors contributed equally to this work.

*Correspondence:
Patrick Mavingui
patrick.mavingui@cirs.fr

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



© The Author(s) 2023. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

Keywords Dengue, Outbreaks, Genetics, Genomes, Reunion Island, Seychelles

Background

Dengue virus (DENV) is the most widespread mosquito-borne flavivirus worldwide. More than 390 million people in over 129 countries are exposed to dengue virus infections with an estimated 20,000 deaths every year [1, 2]. DENV is transmitted through the bite of infected female mosquitoes belonging to the *Aedes* genus; the species *Aedes aegypti* being a primary vector while *Aedes albopictus* plays a secondary role [3]. The DENV genome consists of a positive-sense single-stranded linear RNA of approximately 11 kilobases. Four DENV serotypes (DENV-1 to DENV-4) are currently known. Molecular analyses have highlighted the diversity of DENV genotypes belonging to each of the four serotypes [4, 5].

The southwestern Indian ocean islands have a history of periodic outbreaks of DENV, but Reunion Island has been an exception in recent years. Since an outbreak of the virus in 2017, there has been continuous circulation of DENV on the island with over 70,000 confirmed cases between 2017 and 2022 (Table 1). This continuous presence of the virus on the island may suggest that dengue has become endemic [6].

At the beginning of the epidemic wave, DENV-2 was the first serotype detected on the island [9, 10]. At the end 2019, among the 25,000 confirmed cases and 20 deaths, DENV-2 still represents the major serotype, but a few cases of DENV-1 and DENV-3 were also reported [11]. During the course of the epidemic, DENV-1 was also observed to co-circulate with DENV-2, and rapidly became the dominant serotype. DENV-1 was the only identified serotype among the 29,577 confirmed cases by week 35 in 2021 [12]. A similar trend was also observed in the Seychelles where an outbreak of DENV-2 started in 2015, being replaced by DENV-1 in 2016 (MOH Seychelles). Interestingly, the DENV-2 strains that circulated at the beginning of these outbreaks are 99.8% similar to each other and 93% similar to a 2013 strain from Singapore, indicating a single introduction of DENV-2, presumably from Asia [10]. As DENV-1 subsequently succeeded DENV-2 in these two islands, it would be

interesting to see whether the DENV-1 outbreaks were also initiated by a single introduction event.

In 2021, DENV-1 circulation in Reunion coincided with a significant increase of severe cases and hospitalizations when compared to 2018 and 2019 [12]. For instance, several severe ophthalmological cases related to DENV-1 infection were reported, notably in 2020 and 2021 [12]. Moreover, while severe forms and deaths were most frequently observed in older patients with comorbidities such as diabetes and hypertension, increasing numbers of DENV1-induced mortalities were observed in younger patients (including children) without comorbidities [12]. Although such an increase in severity was observed for the first time in Reunion, these symptoms were already described in Asia where dengue is endemic [13, 14]. To investigate whether the current epidemic DENV-1 strains from Reunion and the Seychelles were similar to each other and to those known in Asia, we performed whole-genome sequencing and phylogenetic analyses to trace their origin and explore some genetic features.

Methods

Origin of samples

Biological samples from Reunion Island were originated from two different collections. The CARBO collection consisted of a prospective cohort of patients with arbovirus infections, registered on clinicaltrials.gov (NCT01099852). The CARBO was started by the University Hospital of La Martinique in 2010 and extended to include patients from Reunion in 2018. The other collection, DEMARE, was established as part of an epidemiological cross-sectional study conducted in 2019–2020. Both collections were approved by The French Committee for the Protection of Individuals. Written consent was obtained from all participants. Blood samples from the Seychelles were collected by the Ministry of health of the Seychelles during outbreaks between January 2015 and December 2016.

Bloods were collected from serologically confirmed patients presenting one or several dengue symptoms including fever, myalgia, headache, asthenia and

Table 1 Circulation of DENV from 2017 to mid-2022 in Reunion

Year*	Number of confirmed cases	Number of serotyped cases (TotS)	DENV-1/TotS	DENV-2/TotS	DENV-3/TotS
2017	94	94	0	1	0
2018	6,759	950	0	1	0
2019	18,217	883	0.118	0.880	0.002
2020	16,414	838	0.85	0.12	0.03
2021	29,655	978	1	0	0
2022	1,129	329	1	0	0

*Data were obtained from [6] and Santé Publique France [7, 8].

thrombocytopenia and without recent travel history. To increase the probability of detecting the presence of viral RNA, the samples used in the study were from patients included in the cohort within the first seven days of the onset of symptoms. Collections were performed by accredited professionals in 10 mL EDTA tubes. Within the two hours after collection, samples were centrifuged at 2,000 g for 10 min at 20 °C. Supernatants were transferred into new tubes, homogenized by inversion, aliquoted into new 2 mL tubes, labeled, then frozen and stored at -80 °C until used.

Viral RNA extraction and amplification

To ascertain the presence and the amount of DENV-1 RNA in the selected samples, a reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) was performed. Briefly, total nucleic acids were extracted from the serum samples using the QIAamp® Mini Kit purification according to the manufacturer's recommendation (QIAGEN). For RT-qPCR, we used the QIAGEN OneStep kit following the manufacturer's instructions (QIAGEN). A mixed solution was prepared with RNA template (5 µl), a Taq-Man probe (FAM-ACACCTCAAGCTAA-TAMRA) and primers (Forward 5'-GAACATGGRACAAYTG-CAACYAT-3'; Reverse 5'-CCGTAGTCDGTCAGCT-GTATTTTC-3') specific to DENV-1. The thermocycler program consisted of a retrotranscription step of 45 min at 45 °C, denaturation for 5 min at 95 °C followed by 40 cycles of amplification (72 °C for 5 s and 56 °C for 60 s). Viral RNA copy number was estimated against a standard curve following the methodology published by the HAS (Haute Autorité de Santé, France). Plasmids containing targeted DENV-1 were synthesized by GeneCust (France) and used as the standard curve at concentrations of 10¹ to 10⁸ RNA copy per µl.

The E gene was amplified to confirm RT-qPCR-positive samples. cDNA was synthesized from extracted RNA using the ProtoScript® II Reverse Transcriptase Kit with random primers following the manufacturer's instructions (New England BioLab, USA) and amplified using a nested PCR protocol, as previously described [9]. Briefly, we designed degenerated primers targeting a fragment (~700–800 bp) of the E gene encoding the envelope protein. The first round of amplification reaction was performed with primers DNV1-E-F1 (CAC TGG TGG AAG AAC AAG ACG C) and DNV1-E-R2 (CMA CDG AYG TGA ACA CYC CTC C) generating an approximately 1100-bp fragment. The second round used the primers DNV1-E-F2 (ACG GAG CTC TYA CAT TGG ACT G) DNV1-E-R2 (CMA CDG AYG TGA ACA CYC CTC C) and generated a 750-bp fragment. PCR amplification was performed on a PCR System 2700 Thermocycler (ABI Applied Bio-system™). Amplification programs were as follows: 94 °C for 2 min; 3 cycles of 95 °C for 5 s, 60 °C for

30 s, 72 °C for 30 s; 3 cycles of 95 °C for 5 s, 55 °C for 30 s, 72 °C for 30 s; and 28 cycles of 95 °C for 5 s, 50 °C for 30 s, 72 °C for 1 min 30 s; 72 °C for 7 min. Amplified products were checked first on electrophoresis gel (Additional file) then samples showing amplicons of expected sizes were Sanger sequenced (Genoscreen, Lille, France).

Virus isolation

Viral isolation assays were conducted by inoculating the DENV-1 PCR-positive sera from viremic patients onto Vero E6 cell monolayers. Cultures were checked every day. When cytopathic effects were observed, supernatants (passage 1) were collected by centrifugation and stored at -80 °C. The presence of viral RNA was confirmed by RT-qPCR, as above, and by titration of viral infectious particles using plaque-forming unit assay [10].

Sequencing and genomic analysis

Genomic data were generated using either Oxford Nanopore Technologies (MinION) sequencing based on the amplicon tiling protocol, or Illumina shotgun sequencing, or by combining data from both sequencing platforms [15].

For Illumina sequencing, libraries were generated from 10 ng of cDNA using the Celero™ PCR Workflow with Enzymatic fragmentation (DNA-Seq) following the manufacturer's instructions. Sequencing was performed on the MiSeq platform, with 1 * 170 bp single-end reads. Demultiplexed sequences were provided by the sequencing company (Biofidal, Lyon, France). Sequences were quality trimmed and adapters removed using Trimmomatic v0.39 [16]. Trimmed reads were mapped to reference sequence NC_001477.1 using bowtie2 [17]. Geneious v9.1.8 [18] was used to inspect and curate mapped sequence data.

For Oxford Nanopore Technology's MinION sequencing, an amplicon tiling protocol was used in conjunction with DENV1 primers from the Oxford Centre for Arbovirus Discovery, Diagnostics, Genomics and Epidemiology (<https://www.caddecentre.org/protocols/>). Briefly, cDNA was amplified in two independent PCR reactions. PCR products were pooled, dA-tailed using the NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module then barcoded using the Nanopore Native Barcoding Expansion kit (EXP-NBD104). Barcoded amplicons were then purified using a 0.4x volume of AMPure-XP SPRI beads, washing the beads with an excess volume of Nanopore's small fragment buffer (SFB) to ensure that un-ligated barcode molecules were removed. Purified amplicons were then pooled in equimolar proportions before adapter ligation and sequencing, following the manufacturer's instructions. The sequencing run was left for 24 h and stopped when predicted coverage exceeded 1000-fold for each genome. Base-calling and demultiplexing were

performed using guppy (v4.0.11). Base-calling used default parameters in accurate mode, and demultiplexing was performed using the “require_barcode_both_ends” parameter to minimize sample crosstalk. Reads were then assembled using Medaka v1.0.3 (<https://nanoporetech.github.io/medaka/>) mimicking the ARTIC network bioinformatics standard operating procedure for SARS-CoV-2 sequencing (<https://artic.network/ncov-2019/ncov2019-bioinformatics-sop.html>), subsampling amplicon coverage to 400x and using genome accession NC_001477.1 for read mapping. Geneious v9.1.8 was used to inspect and curate mapped sequence data. Consensus base-calling required a minimum of 30-fold coverage.

For samples from the Seychelles, only partial genomic assemblies were obtained by this method, as not all primer pairs produced amplified products. The partial assembly data were thus combined with Sanger sequence data from the envelope region of the genome to produce contiguous consensus sequences that spanned a 4,838 bp region at the 5' end of the DENV genome. This region corresponded to base positions 156–4,994 of the reference genome NC_001477.1 and contained genetic data from the capsid, membrane glycoprotein, envelope, NS1, NS2a and NS2b regions of the genome.

Phylogenetic analysis

Global phylogenetic comparisons were carried out using the E-gene, which is typically used for identifying dengue genotypes [5]. The E-gene region was extracted from all reference sequences in the NCBI database using custom scripts. Alignments were generated using MAFFT [19], and the alignment was curated by eye in Geneious v9.1.8. IQTree2 (v2.1.3) was used to identify optimal

substitution model parameters and to generate a bootstrapped maximum-likelihood phylogeny with 1000 replicates. Phylogenetic tree representations were generated in R, using the “ggtree” package [20].

Results

General characteristics

Among the 30 blood samples from Reunion and 14 from Seychelles collected within the first seven days of the onset of symptoms, only nine (PR1583, PR1615, PR1914, PR4443, PR4453, PR4463, PR4483, PR6594, P0409) of 2019 to 2021 outbreaks from Reunion and four (DS16177, DS16229, DS16232, DS16233) of 2016 outbreak from Seychelles tested positive for DENV-1 by RT-qPCR were further analyzed (Table 2). A higher viral titer was detected for the two samples PR1583 and PR6594 with approximately 10^7 RNA copies/ μ L. These two samples were used to infect VERO cells allowing the isolation of DENV-1 strains named RUN1-1583 and RUN1-6594, respectively, isolates which were also further analyzed (Table 2). Sequencing with Illumina generated complete genome sequences for 5 blood samples (PR4443, PR4453, PR4463, PR4483, PR6594) and the isolate RUN1-6594 (one passage) from Reunion. MinION technology allowed sequencing of almost complete genomes for 3 sera (PR1615, PR1914, P0409) and the isolate RUN1-1583 (one passage) from Reunion. The sequence of each isolated strain was identical to that obtained from the corresponding blood sample. Using MinION technology, only partial sequences were obtained from the four Seychelles samples. Upon sequence inspection, mismatches were identified in the DENV1_3, DENV1_11 and DENV1_12 primer pairs which may explain inefficient amplification of DENV1 genotype V. Further optimization of the

Table 2 Biological samples and DENV isolates used in this study

Sample	Origin	Biological material	Sequencing technology	Coverage	Viral isolation	Genbank Accession
RUN1-1583	Reunion, 2019	Supernatant, cDNA	MinION, Illumina	Complete	Yes	ON631277
PR1615	Reunion, 2019	Serum, cDNA	MinION	Complete*	No	ON631275
PR1914	Reunion, 2019	Serum, cDNA	MinION	Complete*	No	ON631274
PR4443	Reunion, 2020	Serum, cDNA	Illumina	Complete	No	ON631283
PR4453	Reunion, 2020	Serum, cDNA	Illumina	Complete	No	ON631282
PR4463	Reunion, 2020	Serum, cDNA	Illumina	Complete	No	ON631281
PR4483	Reunion, 2020	Serum, cDNA	Illumina	Complete	No	ON631280
PR6594	Reunion, 2021	Plasma, cDNA	Illumina	Complete	No	ON631278
RUN1-6594	Reunion, 2021	Supernatant, cDNA	Illumina	Complete	Yes	ON631279
P0409	Reunion, 2020	Plasma, cDNA	MinION, Illumina	Complete	No	ON631276
DS16177	Seychelles, 2016	Serum, cDNA	MinION	Incomplete, 71.2%	No	ON631270
DS16229	Seychelles, 2016	Serum, cDNA	MinION	Incomplete, 88.4%	No	ON631271
DS16232	Seychelles, 2016	Serum, cDNA	MinION	Incomplete, 76.9%	No	ON631272
DS16233	Seychelles, 2016	Serum, cDNA	MinION	Incomplete, 76.9%	No	ON631273

*Genome coverage is considered complete for Illumina data if the sequence obtained mapped to more than 98% of the DENV-1 reference sequence (Genbank accession number NC_001477.1). The amplicon tiling protocol for MinION used primer positions that did not amplify 155 bp at the 5' extremity, nor 575 bp at the 3' extremity of each genome, thus complete contiguous sequences using MinION map to 93% of the same reference sequence.

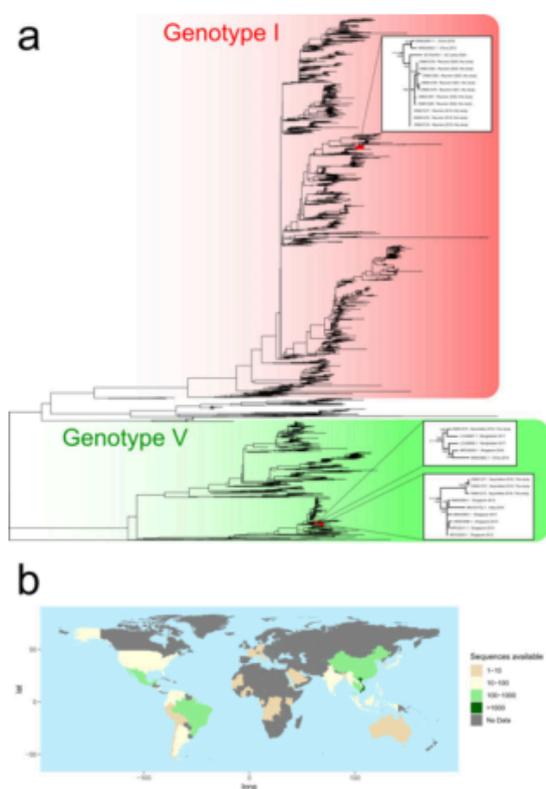


Fig. 1 Phylogenetic analyses of DENV. (a) Phylogenetic tree generated using a 4,838-bp region of the DENV genome (positions 156 to 4,994 of NC_001477.1). Inset are zoomed representations of the tree topology and bootstrap values for regions relevant to sequences generated as part of this study. (b) A graphical representation of the country of origin data for sequences included in the phylogenetic analysis

amplicon tiling protocol would be required to allow efficient amplification and sequencing of all DENV-1 genotypes by this method.

Phylogeny

Phylogenetic analyses of the approximately 5000-bp genomic region of 3,891 publicly available sequences

showed that all sequences from Reunion Island found in 2019, 2020 and 2021 belonged to genotype I of DENV-1 (Fig. 1a), and possessed nearly identical sequences, forming a monophyletic cluster in the phylogeny. These sequences showed greatest similarity (99.5% identity) to one isolate from Sri Lanka in 2020 (Accession number OL752439.1) and two sequences from China in 2016 (Accession numbers MN933661 and MN933663). Sequences from the Seychelles belonged to the same major phylogenetic branch of DENV-1 genotype V, but fell into two paraphyletic clusters (Fig. 1a). DS16177 showed greatest similarity (>99% identity) to sequences from 2016 to 2017 isolated in Bangladesh, Singapore and China, whereas DS16229, DS16232, DS16233 and DS16243 showed greatest similarity to numerous ancestral isolates from Singapore, dating back to 2012. However, interpretations of isolate origins should consider the strong sampling bias that exists in available DENV sequence data (Fig. 1b).

Further extending the phylogenetic comparison to include whole genomic data (Additional file) provided no strong evidence for the introduction of separate lineages in Reunion, as all whole genome sequences showed >99.8% identity (between 0 and 19 SNPs).

Major non-synonymous mutations

Fifteen non-synonymous amino acid changes were specifically observed in all Reunion DENV-1 full genome sequences compared with other DENV-1 genotype I sequences publicly available (Fig. 2). Mutations consisted of N90S in the C gene, R989K, N1068S and K1116R in NS1, I1389M, V1451I and E1487K in NS2B, A2271T in NS4B. Seven mutations H2620Y, K2881R, V2906I, E3052D, S3059A, V3179I and I3322V were observed in NS5. As only partial sequences were generated from the Seychelles samples, reconstruction of full polyprotein was not possible, thus precluding the analysis of amino acid changes.

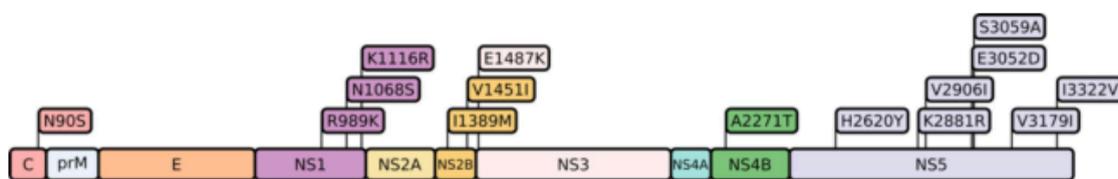


Fig. 2 Schematic representation of conserved mutations identified within isolates from Reunion. Position numbers are expressed relative to the first conserved start methionine of all polyprotein sequences belonging to DENV1 as defined in [28]. Mutations are expressed relative to the majority amino acid sequence of DENV1 genotype I sequences from the same dataset. Positions are colored by mature protein: C, Capsid; prM, premembrane; E, envelope; NS, Nonstructural. A: Alanine; D: Aspartic acid; E: Glutamic acid; H: Histidine; I: Isoleucine; K: Lysine; M: Methionine; N: Asparagine; R: Arginine; S: Serine; T: Threonine; V: Valine; Y: Tyrosine

Discussion

Since the recent dengue outbreak started in late 2017, uninterrupted transmission has occurred in Reunion Island. From 2017 to mid 2022, more than 70,000 confirmed cases were reported [6–8]. Circulation of DENV-2 in 2018 was followed by a major co-circulation of DENV-2 and DENV-1 at the end of 2019 and during 2020, with few cases of DENV-3. In 2021 and 2022, DENV-1 was the only serotype identified in Reunion Island [6]. The Seychelles were also confronted to dengue outbreaks years before (2015–2016) with a similar trend starting with DENV-2 which was replaced by DENV-1 [6].

Using phylogenetic analyses, we showed that the DENV-1 sequences from Reunion were closely related to a 2020 strain circulating in Sri Lanka, whereas those from the Seychelles showed a greatest similarity for isolates from Bangladesh, Singapore and China. This result suggested that the DENV-1 epidemic strains in Reunion and Seychelles were probably imported from Asian countries. We identified a single DENV-1 lineage belonging to genotype I that circulated in Reunion since its emergences at the end of 2019 and subsequently in 2020 and 2021. On the contrary, two lineages of DENV-1 of genotype V occurred in the Seychelles in 2016. It should be noted that these are likely partial descriptions of the total genetic diversity of DENV on the two islands due to the limited sample availability for our study. Even so, our results were distinct to previous observations in the region where similar viral epidemic strains usually occurred in contemporary outbreaks. For instance, between 2003 and 2004 an outbreak caused by DENV-1 serotype started in the Seychelles [21] and then spread in Reunion [22]. The same DENV-1 serotype was involved in an outbreak in Toamasina, eastern Madagascar, two years later in 2006 [23], but a regional link could not be established as no sequence was found. More recently, dengue outbreaks due to DENV-2 occurred in 2016 in the Seychelles and then in 2018 in Reunion, and it was shown to involve the same cosmopolitan sub-lineage I [9, 10]. Moreover, the link of dengue outbreaks between these two islands has been demonstrated by the presence of dengue cases in Reunion imported from the Seychelles whether in 2016 [7] or in 2017 [8].

The presence of two distinct sub-lineages of DENV-1 in the Seychelles suggests at least two introduction events. Conversely, the full-genome phylogenetic analysis (Additional file) strongly suggests that sequenced DENV-1 genotype I strains in Reunion originated from a single introduction event. In these two countries, DENV-1 displaced the previously circulating DENV-2. The displacement phenomenon was also reported among genotypes of the same dengue serotype. For instance, during the DENV-2 outbreaks in several South American countries,

the American genotype was replaced by the Asian genotype [24]. In some cases, lineage replacements were associated with an increased clinical severity [24, 25]. In Reunion, the introduction and subsequent dominance of DENV-1 was accompanied by severe cases with peculiar symptoms, notably the maculopathy. Ophthalmic complications associated with dengue, with certain dependence to serotype, have been increasingly described in recent times [13, 26]. The possible link between maculopathy observed in Reunion dengue patients and the emerging lineage DENV-1 genotype I needs to be further investigated.

Moreover, the probable single introduction of the DENV-1 genotype I in Reunion may have been accompanied by a discrete micro-evolution event since fifteen exclusive non-synonymous mutations were found in different proteins, including capsid, NS1, NS2B, NS3, NS4B, and NS5. Such local micro-evolution events have been observed in Asia, as shown for instance in the Hunan province where several mutations were seen in DENV-2 outbreak (2018) after importation from neighboring areas having higher incidence of dengue [27]. The micro-evolution event in either structural or non-structural proteins can be neutral or under positive or negative selection with an impact in disease epidemiology [27, 28]. For instance, mutations in NS1 have been shown to influence production and secretion with impact on NS1 ELISA-based dengue detection in clinical samples [29]. In addition, it was shown that mutations involving changes from basic to acidic residues or vice versa tend to affect NS1 surface expression and secretion patterns of flavivirus with impact in host immunity [29, 30]. Here, mutations were observed also in both NS2B and NS5, two proteins that play a pivotal role in the activity of NS3 protease, the latter being also a therapeutic target against flaviviruses [31]. Strikingly, when studying mutations in NS2B of the flavivirus Zika, researchers found one particular mutation able to enhance transmission potential and to confer escape from pre-existing DENV immunity [32]. When analyzing several natural dengue variants from dengue severe patients, from mild to fatal cases, a link was established between mutations in NS5 and the virulent DENV phenotypes [33]. Whether the mutations found in DENV-1 epidemic strain played a role in dengue severe cases observed in Reunion needs to be further investigated. Particular attention should be paid in the three mutations (R989K, N1068S and K1116R) located in NS1, since expression of this nonstructural glycoprotein has been linked to dengue disease severity [14, 34, 35]. In addition, as NS1 antigen is a marker for routine diagnosis in rapid detection of dengue virus infection [36], the impact of these mutations on the efficiency of the tests may require further control.

Conclusion

The southwestern Indian ocean region is usually subject to dengue outbreaks with co-occurrence of a given dengue serotype alternating intense circulation and inter-epidemic periods. In contrast to what was observed previously, uninterrupted dengue circulation is occurring and we showed that recent DENV-1 outbreaks in Reunion and the Seychelles were caused by distinct genotypes, all probably originating from Asia. Strikingly, the unique DENV-1 genotype I lineage circulating during three consecutive years in Reunion harbored non-synonymous mutations whose biological significance need to be further investigated.

Abbreviations

DENV	Dengue virus
DENV-1	Dengue virus serotype 1
DENV-2	Dengue virus serotype 2
DENV-3	Dengue virus serotype 3
NS	Nonstructural protein
CARBO	Cohorte arboviruses
DEMARE	Observational cross-sectional epidemiological study conducted in Madagascar and La Réunion

Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08125-y>.

Supplementary Material 1
Supplementary Material 2
Supplementary Material 3
Supplementary Material 4

Acknowledgements

All physicians who participated in CARBO. The INSERM Research and Action Targeting Emerging Infectious Disease (REACTing) network who prepared the CARBO protocol. The CHU of Martinique and CHU of La Reunion for this collaboration.

Author contributions

S.H and T.B: molecular analyses, investigation, writing-review and editing; D.A.W: molecular analyses, investigation, methodology, visualization, writing-original draft; C.A: supervision, writing-review and editing; J.B, M.L and J.G: supervision; L.B: molecular analyses, sample acquisition, investigation; O.D.S: sample acquisition, investigation; A.F and A.C: funding acquisition; A.B: conceptualization, investigation, writing-original draft, funding acquisition; P.M: conceptualization, formal analysis, investigation, writing-original draft, funding acquisition, writing-review and editing. All authors reviewed and approved the final manuscript.

Funding

This work was supported in part by the European Regional Development Fund (ERDF) through the RUNDENG project, number RE0022937, and the INTERREG through the VECTOBIOEMES project, number RE0009962. The CARBO Cohort was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC, 2009, n° 29–01), the French network for Research and Action targeting emerging infectious diseases (REACTING). The DEMARE collection was funded by the Swiss National Foundation for Scientific Research (SNFSR), project number 17953. S.H and T.B were supported by a PhD degree scholarship from Reunion University (Ecole doctorale STS) funded by DIRED/20181182 from the Conseil Régional de La Réunion.

Availability of data and material

The datasets generated and analysed during the current study are available in the Genbank repository under the accession numbers ON631270, ON631271, ON631272, ON631273, ON631274, ON631275, ON631276, ON631277, ON631278, ON631279, ON631280, ON631281, ON631282, ON631283. Data from the CARBO study are not publicly available to protect patient privacy. They can be requested at the Department of research and innovation, Martinique University Hospital 97261 Fort-de-France.

Declarations

Ethics approval and consent to participate

The study was approved by the French National Agency for the Safety of Medicines and Health Products (ANSM) (n°DRCB 2010-A00282-37) and by the committee for the protection of individuals. All procedures were performed in accordance with relevant guidelines and regulations and written and signed informed consent was obtained from all participants included. Blood samples from the Seychelles were collected by the Ministry of Health of the Seychelles during outbreaks between January 2015 and December 2016.

Consent for publication

Not applicable.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT), Université de La Réunion, CNRS 9192, INSERM U1187, IRD 249, Plateforme CYROI, Sainte Clotilde, La Réunion, France

²Public Health Authority, Ministry of Health, Victoria, Seychelles

³Disease Surveillance and Response Unit, Epidemiology and Statistics Section, Public Health Authority, Ministry of Health, Victoria, Seychelles

⁴Institute of global health, Faculty of Medicine, University of Geneva, Geneva, Switzerland

⁵CHU de Martinique, service de maladies infectieuses et tropicales,

INSERM, CHU de Martinique, PCCEI, Univ Montpellier, Univ Antilles,

INSERM, EFS, CIC1424 Fort-de-France, Montpellier, France

⁶Service des Maladies Infectieuses - Dermatologie, CHU Réunion, INSERM CIC1410, Saint Pierre, Saint Pierre, La Réunion, France

Received: 19 June 2022 / Accepted: 28 February 2023

Published online: 05 May 2023

References

1. World Health Organization. Dengue and severe dengue. World Health Organ. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (accessed July 8, 2021).
2. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496:504–7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>.
3. Kramer MUG, Reiner RC Jr, Brady OJ, Messina JP, Gilbert M, et al. Past and future spread of the arbovirus vector *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol*. 2019;4:854–63. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>.
4. Vasilakis N, Weaver SC. Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence. In: Maramorosch K, Shatkin AJ, Murphy FA, editors. *Adv. Virus Res.*, vol. 72, Elsevier; 2008, p. 1–76. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00401-6)
5. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 2009;9:523–40. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>.
6. Hafsia S, Haramboure M, Wilkinson DA, Baldet T, Yemadje-Menudier L, Vincent M, et al. Overview of dengue outbreaks in the southern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: a systematic review. *PLoS Neg Trop Dis*. 2022;16:e0010547. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010547>.

7. Santé Publique France. Points Épidémiologiques - Dengue - Océan Indien <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2016/surveillance-de-la-dengue-a-la-reunion.-point-au-08-avril-2016>.
8. Santé Publique France. Points Épidémiologiques - Dengue - Océan Indien <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2017/surveillance-de-la-dengue-a-la-reunion.-point-au-05-fevrier-2017>.
9. Pascalis H, Turpin J, Roche M, Krejbich P, Gadea G, Atyame Nten C, et al. The epidemic of dengue virus type-2 cosmopolitan genotype on Reunion Island relates to its active circulation in the Southwestern Indian Ocean neighboring islands. *Helyon*. 2019;5:e01455. <https://doi.org/10.1016/j.helyon.2019.e01455>.
10. Pascalis H, Biscornet L, Toty C, Hafsia S, Roche M, Desprès P, et al. Complete genome sequences of Dengue Virus type 2 epidemic strains from Reunion Island and the Seychelles. *Microbiol Resour Announc*. 2020;9. <https://doi.org/10.1128/MRA.01443-19>.
11. Santé Publique France. Points Épidémiologiques - Dengue - Océan Indien <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2019/surveillance-de-la-dengue-a-la-reunion.-point-au-24-decembre-2019>.
12. Santé Publique France. Points Épidémiologiques - Dengue - Océan Indien <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2021/surveillance-de-la-dengue-a-la-reunion.-point-au-7-decembre-2021> (accessed May 8, 2022).
13. Hernandez-Delgado MA, Salvador B, Valdez-Garcia JE. Dengue fever: ophthalmological perspective. *Int J Trop Dis*. 2021;4:047.
14. Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. Current understanding of the pathogenesis of dengue virus infection. *Curr Microbiol*. 2021;78:17–32. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>.
15. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes directly from clinical samples. *Nat Protoc*. 2017;12:1261–76. <https://doi.org/10.1038/nprot.2017.066>.
16. Bolger AM, Lohse M, Usadel B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics*. 2014;30:2114–20.
17. Langmead B, Salzberg S. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat Methods*. 2012;9:357–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
18. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012;28:1647–9. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts199>.
19. Katoh K, Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol*. 2013;30:772–80. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
20. Yu G, Smith DK, Zhu H, Guan Y, Lam TT. ggtree: an R package for visualization and annotation of phylogenetic trees with their covariates and other associated data. *Mol Biol Evol*. 2017;30:28–36. <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
21. D'Ortenzio E, Balleydier E, Baville M, Filleul L, Renault P. Dengue à la Réunion et dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien. *Médecine Mal Infect*. 2011;41:475–9. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2010.11.021>.
22. Pierre V, Thiria J, Rachou E, Sissoko D, Lassale C, Renault P. Épidémie de dengue-1 à la Réunion en 2004. *Journées INVS*. https://www.invs.sante.fr/publications/2005/jvs_2005/poster_13.pdf
23. Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reyes J-M, Zeller H, et al. Outbreak of Dengue and Chikungunya Fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1135–7. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071521>.
24. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997;230:244–51. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8504>.
25. Ramos-Cantañeda J, Bareto dos Santos F, Martínez-Vega R, Galvão de Araujo JM, Joint G, Sarti E. Dengue in Latin America: systematic review of molecular epidemiological trends. *PLoS Neg Trop Dis*. 2017;11:e00005224. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005224>.
26. Chee E, Sims JL, Jap A, Hock Tan B, Oh H, Che S-P. Comparison of prevalence of dengue maculopathy during two epidemics with different predominant serotypes. *Am J Ophthalmol*. 2009;140:910–3.
27. Guan J, He Z, Qin M, Deng X, Chen J, Duan S, et al. Molecular characterization of the viral structural protein genes in the first outbreak of dengue virus type 2 in Hunan province, inland China in 2018. *BMC Infect Dis*. 2021;21:166. <https://doi.org/10.1186/s12879-021-05823-3>.
28. Stica CJ, Barrero RA, Muttay RZ, Devine GJ, Philipps MJ, Frentieu FD. Global evolutionary history and dynamics of dengue viruses inferred from whole genome sequences. *Viruses*. 2022;14:703. <https://doi.org/10.3390/v14040703>.
29. Ghosh A, Sukla S, Nath H, Saha R, De A, Biswas S. Non-structural protein 1 (NS1) variants from dengue virus clinical samples revealed mutations that influence NS1 production and secretion. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2022;41:803–14. <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04441-4>.
30. Youn S, Cho H, Fremont DH, Diamond MS. A short N-terminal peptide motif on flavivirus nonstructural protein NS1 modulates cellular targeting and immune recognition. *J Virol*. 2010;84:9516–32. <https://doi.org/10.1128/JVI.00775-10>.
31. Teramoto T, Choi KH, Padmanabhan R. Flavivirus proteases: The viral Achilles heel to prevent future pandemics. *Antiviral Research* 2023; 210:105516 2023
32. Regla-Nava JA, Wang Y-T, Fontes-Garfias CR, Liu Y, Syed T, Susantono M, et al. A Zika virus mutation enhances transmission potential and confers escape from protective dengue virus immunity. *Cell Rep*. 2022;39:110655. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2022.110655>.
33. Cheng D, Huang S-W, Chin W-X, Hung S-J, Tsai H-P, Chu JH, et al. Impact of intrahost NS5 nucleotide variations on dengue virus replication. *Front Microbiol*. 2022;13:894200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.894200>.
34. Paranavitane SA, Gomes L, Kamaladasa A, Adikari TN, Wickramasinghe N, Jeevawandana C, et al. Dengue NS1 antigen as a marker of severe clinical disease. *BMC Infect Dis*. 2014;14:570. <https://doi.org/10.1186/s12879-014-0570-8>.
35. Puerta-Guardo H, Glasner DR, Harris E. Dengue virus NS1 disrupts the endothelial glycocalyx, leading to hyperpermeability. *PLoS Pathog*. 2016;12:e100. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005738>.
36. Costa VG, Marques-Silva AC, Moreli ML. A meta-analysis of the diagnostic accuracy of two commercial NS1 antigen ELISA tests for early dengue virus detection. *PLoS ONE*. 2014;9:e94655. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094655>.

Publisher's note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

1.5. Discussion et perspectives

Ces travaux permettent de mettre en évidence la circulation régionale active de souches de DENV au sein des îles du Sud Ouest de l'Océan Indien (SOOI). Cette circulation se serait à minima produite entre les Seychelles et La Réunion entre 2016 et 2018, dates de collection respectives dans ces îles des échantillons contenant DENV-2 séquencés et appartenant tous à la lignée I du génotype cosmopolite. Les génomes de ces souches de DENV-2 seychelloise et réunionnaise ont montré un pourcentage d'identité très élevé de 99.8%, pouvant être le témoignage d'un unique événement d'introduction dans le SOOI qui se serait poursuivi par une circulation entre les différentes îles de cette zone. La phylogénie réalisée a également permis de montrer que l'origine de cette introduction serait très certainement asiatique avec un pourcentage d'identité de 93% avec une souche de DENV-2 qui a circulé à Singapour en 2013 (Sung et al. 2016). Pour le DENV-1, en revanche, il a été démontré que les échantillons prélevés à La Réunion de 2019 à 2021 et aux Seychelles en 2016 n'appartiennent pas aux mêmes génotypes. La Réunion ne présente qu'un cluster monophylétique de souches de DENV-1 du génotype I, synonyme d'un événement d'introduction unique de ce sérotype dans l'île. En revanche, les échantillons des Seychelles se répartissent dans deux clusters différents au sein du génotype V du DENV-1, suggérant alors des événements d'introductions indépendants entre eux et avec celui de La Réunion. La phylogénie indique d'ailleurs des filiations spatiales et des temporalités d'introduction diverses pour les souches épidémiques de DENV-1 circulant sur chacune de ces îles. Cependant, toutes semblent génétiquement proches de souches asiatiques (Chine, Singapour, Sri Lanka, Bangladesh).

Ces travaux sont intéressants puisqu'ils permettent de mettre en évidence à la fois l'existence d'importations longues distances fréquentes de souches de dengue depuis les lointains continents, ici le continent asiatique, vers les îles de la région du SOOI (la réciproque étant très certainement vraie elle aussi), mais également l'existence d'une circulation régionale, non systématique, des souches de dengue entre les îles de cette même région. Il faut toutefois être vigilant car la phylogénie dépend de l'effort d'échantillonnage global. Or, pour les données de séquençage du DENV, cet effort est biaisé vers l'Amérique et l'Asie, où de nombreuses données sont disponibles. Cela n'est cependant vrai que pour certains pays de ces continents, généralement les plus développés. A l'inverse, très peu de données sont disponibles en Afrique et dans les îles du SOOI par exemple. Il peut donc y avoir un biais important dans les phylogénies du fait de ces disponibilités très disparates, et même si cela ne devait pas changer le génotype d'appartenance des souches réunionnaises et seychelloises testées dans ces travaux, cela pourrait modifier leur proximité génétique avec les autres souches du même génotype. Elles pourraient alors être plus proches de souches d'autres pays d'Asie, voire même de souches provenant d'autres continents comme le continent africain, celui-ci ayant vraisemblablement connu des importations/exportations de DENV depuis et vers l'Asie cette dernière décennie (Neto et al. 2022; Letizia et al. 2022). Les origines d'introduction potentielles des souches ayant circulées à La Réunion et aux

Seychelles suggérées par les phylogénies réalisées dans ces travaux sont donc à interpréter avec précaution.

De cet effort d'échantillonnage, mais d'un point de vue plus local cette fois-ci, dépend aussi la compréhension des patterns épidémiologiques observés lors d'une épidémie. Par exemple et de façon flagrante, seuls 2 échantillons de DENV-2 ont été séquencés sur plus de 25 000 cas confirmés depuis le début de l'épidémie de dengue en 2017 à La Réunion, dont un seul l'a été entièrement. Quant au DENV-1, 9 cas ont été séquencés représentant seulement 0,019% des plus de 46 500 cas biologiquement confirmés pour ce sérotype depuis son apparition sur l'île à la fin de l'année 2019. Bien que les échantillons de DENV-1 séquencés aient été prélevés à différents temps de l'épidémie, face à cette très faible proportion de cas séquencés il est difficile d'affirmer avec certitude qu'ils sont bien représentatifs de la majorité. S'il était plus aisé d'acquérir des échantillons tout au long de l'épidémie et d'avoir accès aux informations relatives à la localité des cas, cela permettrait de repérer et d'analyser les chaînes de transmission de chaque génotype, voire même de chaque cluster au sein des génotypes, de comprendre en quelle proportion et de quelle façon chacun se transmet. Par exemple, grâce à un nombre plus important d'échantillons séquencés de 1994 à 2010 (640 séquences au total), une équipe de recherche a pu montrer qu'à Bangkok, en Thaïlande, la transmission du DENV assurée par le moustique *Ae. aegypti*, se produit essentiellement dans un périmètre rapproché (Salje et al., 2017). En effet, 60% des cas séparés par moins de 200 mètres appartiennent à la même chaîne de transmission, et la distance évolutive entre deux cas est intimement liée à la distance géographique les séparant réellement (Salje et al., 2017). Ils ont estimé à 160 le nombre moyen de chaînes de transmission du DENV pouvant être identifiées lors d'une saison épidémique de la dengue à Bangkok (Salje et al., 2017). En revanche, à taille de population égale entre une province de Thaïlande et un quartier de Bangkok, ce dernier, plus densément peuplé, présente 5,6 fois plus de chaînes de transmission que la province, faisant de la densité de population une variable importante (Salje et al., 2017). Les patterns épidémiologiques de Bangkok et des provinces étant différents, leur prise en charge par les autorités sanitaires, par exemple dans les choix stratégiques concernant la lutte anti-vectorielle (LAV), devrait également être différente. De telles études scientifiques sont nécessaires afin d'aider à la prise de décisions sanitaires concernant la dengue dans le SOOI.

Avoir accès presque en temps réel aux caractéristiques épidémiologiques inhérentes à chaque génotype grâce à un meilleur effort d'échantillonnage, incluant les caractéristiques telles que leur transmissibilité ou encore leur dangerosité, donneraient également des indications importantes pour les agences de santé publique. Cela permettrait notamment de s'assurer que certaines mutations n'induisent pas une baisse de la détection du DENV, comme cela a déjà été montré avec des mutations non-synonymes dans la protéine NS1 (Ghosh et al. 2022), biaisant ainsi les actions des agences de santé et de LAV face à une partie de l'épidémie et certains foyers de transmission, respectivement. Cela permettrait aussi de comprendre s'il existe un lien entre diversité génétique virale et modification des patterns épidémiologiques avec, par exemple, l'apparition lors d'une épidémie de

symptômes particuliers dont la gravité ou la spécificité peuvent inquiéter. Différents exemples de modifications de patterns épidémiologiques (i.e. modification de l'incidence ou de la sévérité) associés aux remplacements de génotypes/clades viraux ou à l'apparition de mutations ont déjà été référencés dans des zones endémiques (Armstrong and Rico-Hesse 2003; Bennett et al. 2003; Bennett et al. 2006; Kanakarathne et al. 2009; Lee et al. 2010; OhAinle et al. 2011). Par exemple, il a été démontré que deux mutations situées dans le premier domaine transmembranaire de la protéine NS4A réduisent son oligomérisation et sa stabilité (Lee et al. 2015). Cette protéine participant à la formation du complexe de réplication virale, ces mutations induisent également une atténuation de la réplication du DENV (Lee et al. 2015). Un autre exemple est la mutation T164S de la protéine NS1 présente dans une souche épidémique de DENV-2 en 1997 à Cuba qui a été rétrospectivement tenue pour responsable de la forte augmentation de la sévérité observée au cours de cette épidémie (Rodriguez-Roche et al. 2005; Rodriguez-Roche et al. 2011; Chan et al. 2019). En effet, cette mutation peut entraîner des formes sévères représentant ainsi une donnée importante pour les décisions de politiques sanitaires puisqu'en cas de (ré)émergence à un endroit, les efforts de LAV pourraient être priorités vers cette localité. A La Réunion, des cas ophtalmiques graves ont commencé à apparaître en 2020 et tous sont liés au sérotype 1. Il serait donc intéressant de vérifier si un génotype spécifique ou si des mutations particulières sont à mettre en cause dans la survenue de ces cas, en plus d'études sur les données démographiques (âges, sexes, localité), médicales (traitements, antécédents médicaux, comorbidités), et socioprofessionnelles. De plus, 15 mutations non-synonymes ont été retrouvées dans toutes les souches de DENV-1 séquencées. Comme expliqué dans l'article (Hafsia et al. 2023), certaines de ces mutations présentent un intérêt tout particulier car situées dans des protéines, telles que les protéines NS1 et NS5, ayant déjà montré pouvoir modifier les caractéristiques infectieuses des souches de la dengue suite à des mutations ou avoir un rôle dans la sévérité associée au virus (Rodriguez-Roche et al. 2011; Puerta-Guardo et al. 2016; Bhatt et al. 2021; Cheng et al. 2022). Une prochaine étape de recherche pourrait donc être de vérifier si une ou plusieurs de ces mutations ont un impact sur la transmissibilité par le vecteur, et expliquerait en partie pourquoi cette souche de DENV-1 a créé une épidémie de dengue sans précédent à La Réunion. Pour cela, la méthodologie employée serait de réaliser des études comparatives *in cellulo* puis *in insecta* des caractéristiques infectieuses de souches possédant une base génétique commune, de préférence celle d'une souche ayant précédemment circulé à La Réunion sans créer d'épidémie majeure, à laquelle serait ajoutée une des mutations d'intérêt retrouvées dans les souches épidémiques actuelles.

Par ailleurs, l'étude des populations virales minoritaires de DENV au sein d'un hôte, aussi appelées quasi-espèces (Eigen 1971; Eigen and Schuster 1978; Domingo et al. 2021), pourrait s'avérer nécessaire. D'une part, cela améliorerait la compréhension de l'émergence et de la propagation de nouveaux variants de DENV potentiellement plus dangereux (de la Torre and Holland 1990; Luring and Andino 2010). D'autre part, étudier la fitness, l'adaptabilité, et la sévérité du DENV en fonction de l'ensemble de la population virale au sein d'un hôte, au lieu de les lier uniquement à la séquence consensus de cette population,

permettrait d'avoir un regard plus critique et une meilleure appréciation des différences phénotypiques (transmissibilité, sévérité) observées entre hôtes (de la Torre and Holland 1990). En effet, dans certains cas, l'adaptabilité et la fitness observées pour une souche de DENV ne semblent pas pouvoir s'expliquer uniquement par la présence de certaines mutations au sein de la séquence consensus, et l'hypothèse de mutations dans les séquences minoritaires pouvant y contribuer est avancée (Coffey et al. 2008). De façon intéressante, l'étude de Rodriguez-Roche et collaborateurs a notamment montré que la diversité des populations virales minoritaires avait augmenté chez les patients, de façon concomitante à la sévérité et à la durée de l'épidémie de DENV-3 qui eut lieu à Cuba entre 2001 à 2002 (Rodriguez-Roche et al. 2016). Lors de cette épidémie, les cas d'infection secondaire présentaient une diversité importante de population virale minoritaire avec des mutations dans les gènes codant pour les protéines non-structurales et structurales, dont certaines non-synonymes, tandis que les infections primaires n'avaient presque que des mutations synonymes dans les séquences des gènes des protéines non-structurales au sein d'une population virale minoritaire à la diversité plus restreinte (Rodriguez-Roche et al. 2016). Le parallèle est fait entre cette augmentation de la diversité des populations virales minoritaires et l'augmentation de la sévérité au cours de l'épidémie sans pour autant établir un réel lien de causalité entre les deux. Plus récemment, l'étude de Cheng et coll., a elle aussi montré un nombre plus important de quasi-espèces dans les cas de DENV-2 fatals comparés aux cas plus modérés lors d'une épidémie de dengue à Taïwan en 2015 (Cheng et al. 2022). Ces auteurs ont également montré que des quasi-espèces de ces cas fatals possédant certaines mutations dans la protéine NS5, bien que synonymes, présentaient de meilleures capacités de réplication et de résistance à la température que l'espèce majoritaire (Cheng et al. 2022). Cette voie de recherche novatrice est à retenir pour de potentielles futures études concernant l'augmentation de la sévérité constatée à La Réunion lors de l'épidémie débutée fin 2017.

Une autre perspective de recherche intéressante, surtout s'il s'avère que la dengue devient endémique à La Réunion, serait de déterminer l'efficacité et la durée de la protection immunitaire croisée suite à une primo-infection avec un sérotype du DENV vis-à-vis des autres sérotypes, et l'implication de l'historique infectieux des patients dans la sévérité de leur maladie dans le cas d'infections secondaires par le DENV. Cela nous permettrait de mieux comprendre les patterns épidémiologiques observés à La Réunion, ainsi que d'améliorer notre compréhension des facteurs de risque favorisant l'apparition de cas de dengue sévère. Dans leur étude, OhAinle et al., ont par exemple montré que la sévérité des cas de DENV-2 observée lors d'une épidémie à Managua (capitale du Nicaragua) dépendait de l'historique infectieux des patients, avec un clade de DENV-2 plus sujet à induire des cas sévères chez des patients ayant déjà été infecté par le DENV-1, et un autre clade de DENV-2 induisant des cas sévères chez des patients ayant déjà été infecté par le DENV-3 (OhAinle et al. 2011). Par ailleurs, bien qu'une primo-infection par un sérotype est censée procurer une protection immunitaire à long terme contre les souches de même sérotype (Sabin 1952; Halstead 1974), certaines études énoncent plus de réserves quant à cette conclusion (Katzelnick et al. 2015; Forshey et al. 2016; Waggoner et al. 2016). De ce fait, des études

impliquant un suivi dans le temps de patients et de leur historique d'infection par le DENV permettraient également d'étudier l'efficacité de l'immunité vis-à-vis d'autres souches de DENV du même sérotype que celui de la primo-infection.

Pour en revenir à l'étude de l'ouverture du filtre de compatibilité entre *Aedes albopictus* réunionnais et DENV local, ce premier axe de recherche de la thèse a permis de sélectionner les souches virales de l'étude. En effet, parmi les échantillons de DENV-1 et DENV-2 séquencés, ceux présentant une quantité suffisante d'ARN ont été isolés sur cellules Véro (cellules rénales de singe vert très permissive aux virus). Des productions virales ont été effectuées à partir de ces isollements et les titres viraux ont été testés par PFU (plaque-forming unit, traduit en français par unité formant une plage de lyse). Cela a permis de récupérer des souches de dengue circulant depuis 2017 à La Réunion afin de réaliser des infections expérimentales *in insecta* au plus proche des conditions naturelles de l'actuelle épidémie sur l'île. Les souches produites et utilisées sont : la souche DENV-1 RUN après trois passages de production sur cellules Véro (P3) (souche nommée PR1583 dans la publication Hafsia et al. 2023), et la souche DENV-2_JUL P6. En raison d'un titre viral assez faible de DENV-2_JUL, et de son comportement plutôt inédit lors des infections sur cellules C6/36 de moustiques, avec des effets cytopathiques importants, une autre souche de DENV-2 est commandée chez EVAg et utilisée pour certaines infections: DENV-2_EVAg. Cette souche, qui ne présente pas d'effet cytopathique important sur les cellules de moustiques, provient d'un cas autochtone réunionnais infecté à la même période que le patient duquel a été extrait DENV-2_JUL, soit en mars 2018. La souche DENV-2_EVAg est acquise auprès du fournisseur à son cinquième passage sur cellule de moustique, et une production sur Véro est réalisée au laboratoire, amenant à utiliser cette souche pour les expérimentations à son sixième passage: DENV-2_EVAg P6. Pour information, lorsque les séquences génomiques de ces deux souches de DENV-2 réunionnaises ont été comparées à l'aide du logiciel Seaview4 (10724 bp pour JUL, et 10518 bp pour EVAg, 10499 pour la séquence consensus après alignement), elles ont montré 99,81% d'identité en nucléotides, avec 20 mutations les faisant différer. Par ailleurs, un gap d'une cinquantaine de nucléotides est observé au milieu de la séquence de DENV-2 EVAg. Lorsque ce sont les séquences protéiques qui sont ensuite alignées (3506 acides aminés pour la séquence protéique), seules six mutations se révèlent être non-synonymes, ce qui fait une identité de 99,83% en acides aminés entre les deux souches de DENV-2. L'importance que peuvent avoir les mutations silencieuses sur la fitness et la virulence des virus ne doit cependant pas être négligée (Zhou et al. 2013; Zhou et al. 2016; Cheng et al. 2022; Shen et al. 2022). Après avoir sélectionné à l'aide de BLAST® la séquence protéique de DENV-2 annotée la plus semblable à celles utilisées dans cette thèse (GenBank : QCZ24974), et après les avoir alignées dans SEAVIEW4, il a été possible de déterminer dans quelles protéines se trouvent les mutations. Trois sont situées dans la séquence protéique de la capsid, une dans la NS4A, une dans la NS4B, et une autre dans la partie C-term de la NS5 (Tableau 2). Le gap en nucléotides observé précédemment se trouve au sein de la NS3, à la fin de sa séquence, dans une région annotée domaine DEAD des Flavivirus, correspondant au domaine d'une hélicase (da Fonseca et al. 2017; InterPro). Au vu du rôle de ces protéines non-structurales (Tableau 2), des mutations s'y trouvant pourraient impacter la réplication du

DENV. De ce fait, utiliser ces deux souches de DENV-2 réunionnaises lors d'infections expérimentales *in insecta* pourra permettre d'observer si ces différences génétiques induisent des différences dans le succès d'infection, de dissémination, et de transmission du DENV au sein des vecteurs moustiques. Cela pourrait également permettre de vérifier si les effets cytopathiques du DENV-2 JUL, observés *in cellulo*, se répercutent sur la longévité des vecteurs lors d'expérimentations *in insecta*, et si cette différence provient de la mutation sur la protéine NS5, protéine pour laquelle certaines mutations ont déjà montré pouvoir affecter la virulence du DENV (Cheng et al. 2022).

Mutation	Protéine	Fonction	Nature aa
G15E	Capside	empaquetage de l'ARN viral	différente
R17K	Capside	empaquetage de l'ARN viral	même
T94K	Capside	empaquetage de l'ARN viral	différente
N217S	NS4A	complexe de réplication	même
F2387L	NS4B	complexe de réplication	même
N3467S	NS5	ARN polymérase virale ARN-dépendante	même

Tableau 2 : Mutations non-synonymes entre les souches réunionnaises de DENV-2 EVAg et DENV-2 JUL. Les mutations sont présentées sous la forme lettre-nombre-lettre qui représentent respectivement l'acide aminé retrouvé dans DENV-2 EVAg, la position de la mutation dans la séquence protéique consensus, l'acide aminé retrouvé dans DENV-2 JUL. Avec G = glycine, E = glutamate, R = arginine, K = lysine, T = thréonine, N = asparagine, S = sérine, F = phénylalanine, et L = leucine. Les protéines au sein desquelles les mutations sont situées sont indiquées ainsi que leur fonction principale. Pour finir, la colonne Nature aa indique si la nature de la chaîne latérale des deux acides aminés (retrouvés dans EVAg ou dans JUL) est la même ou si elle diffère. Ces chaînes latérales peuvent être acides (en rouge dans la colonne Mutation), basiques (en violet), polaires non chargées (en vert), apolaires (en brun), ou elles peuvent aussi représenter des cas particuliers en dehors de ces classes (en noir).

Grâce à l'obtention et la production de ces souches de DENV réunionnaises épidémiques, l'étude expérimentale de l'ouverture du filtre de compatibilité entre moustiques réunionnais et DENV qui va maintenant être présentée dans la prochaine partie du mémoire expérimental, peut être un juste reflet de la réalité de terrain.

2. Compétence vectorielle des populations réunionnaises

2.1. Introduction

Étudier l'ouverture du filtre de compatibilité entre le DENV et son vecteur à La Réunion nécessite d'appréhender la compétence vectorielle des populations réunionnaises d'*Ae. albopictus* quant à la transmission de souches virales locales de dengue. Or, dans la synthèse bibliographique, le potentiel interférant de *Wolbachia* sur la compétence vectorielle des moustiques vis-à-vis du DENV a été mis en lumière en conditions expérimentales, et notamment chez les *Ae. albopictus* de La Réunion naturellement infectés par les *Wolbachia* *wAlbA* et *wAlbB* (Mousson et al. 2012). Il est à noter que cette étude ainsi que les autres études réalisées auparavant sur la compétence vectorielle des moustiques tigres réunionnais quant à la transmission de la dengue (Paupy et al. 2001; Vazeille et al. 2010; Mousson et al. 2012) n'utilisaient pas à la fois souches de DENV locales et moustiques locaux de génération précoce, pouvant altérer les résultats obtenus. A La Réunion, améliorer la compréhension de l'ouverture du filtre de rencontre entre DENV et *Ae. albopictus* passait donc par l'étude de l'interaction tripartite entre le DENV local épidémique, les moustiques tigres réunionnais, et leurs *Wolbachia* et ce, dans des conditions expérimentales se rapprochant le plus possible des conditions de terrain.

Les souches de DENV locales sélectionnées pour l'étude ayant été obtenues et décrites dans la première partie du mémoire expérimental, est ensuite venu le choix des populations de vecteurs à utiliser. Pour cela, nous nous sommes référés au pattern épidémiologique de la dengue observé à La Réunion lors de l'épidémie qui n'a cessé depuis 2017. En effet, depuis le début de cette épidémie, le Sud et l'Ouest de l'île ont généralement été les zones avec les plus fortes incidences de dengue tandis que le nombre de cas est un peu moins élevé dans le Nord et reste faible dans l'Est et le Centre de La Réunion (Hafsia et al. 2022). Outre les facteurs décryptés dans la revue pouvant expliquer ces variations entre localités, notamment les différences de température entre ces zones, il paraissait intéressant de s'attarder également sur le rôle de la compétence vectorielle des moustiques sur cette différence. L'hypothèse derrière cette interrogation étant que les moustiques des localités à faible incidence du DENV présentaient une compétence vectorielle moindre par rapport à celle des moustiques des lieux de forte incidence, et ce en lien avec une densité en *Wolbachia* différente comme vu par ailleurs (Wei et al. 2021). Pour vérifier si l'ouverture du filtre de compatibilité était bien hétérogène au travers l'île, les populations réunionnaises d'*Ae. albopictus* sélectionnées doivent être prélevées dans différentes localités de l'île, leurs compétences vectorielles comparées et mises en lien avec leurs densités en *Wolbachia*.

Afin de rester au plus proche de la réalité de terrain, nous avons décidé d'utiliser des populations de moustiques directement originaire du terrain, c'est-à-dire de génération 0 (F0). Effectivement, l'élevage en laboratoire sur plusieurs générations peut avoir des effets sur les populations de moustiques, notamment sur leurs diversités génétique ou microbiologique, et cela peut se répercuter sur les résultats des tests de compétence vectorielle. Nous avons ainsi réfléchi à plusieurs alternatives permettant de travailler sur ces populations de terrain. La première contrainte fut qu'il n'était pas possible d'échantillonner

des moustiques adultes. En effet, à La Réunion, et qui plus est en période épidémique, échantillonner des moustiques adultes signifie prendre le risque de récupérer des moustiques déjà porteurs du DENV. Bien que la transmission verticale du DENV chez les moustiques tigres varie fortement d'une étude à l'autre et d'un pays à l'autre (Grunnill and Boots 2016; Ferreira-de-Lima and Lima-Camara 2018), elle reste relativement faible. Ainsi, prélever des juvéniles (œufs, larves et nymphes) restait la meilleure stratégie à adopter pour s'affranchir de ce risque. Différentes options ont été envisagées mais une seule alliait à la fois un effectif de moustiques suffisant et une représentativité des lieux de forte et faible incidence de dengue observés à La Réunion. L'alternative qui a ainsi été retenue se base sur la résistance à la dessiccation des œufs d'*Ae. albopictus* avec une altération modérée du taux d'éclosion et de survie des larves, au moins lors des premiers mois de dessèchement (Juliano et al. 2002; et observations non publiées réalisées à l'insectarium). Cette caractéristique permet de prélever les œufs à partir du terrain dans divers lieux (à haute ou faible incidence de dengue, milieu plus ou moins urbanisé) et au cours de plusieurs sessions à l'aide de pièges pondoirs dont les papiers de ponte sont relevés tous les cinq jours, et ce pendant deux mois. L'éclosion des œufs et l'élevage des larves sont ensuite synchronisés au laboratoire afin d'utiliser la génération F0 pour les infections expérimentales en ayant un nombre conséquent et suffisant de femelles âgées de 7 à 10 jours à tester.

2.2. Campagnes de terrain et élevage

Une fois les méthodologies de collecte et d'expérimentation définies, la prospection de sites d'échantillonnage productifs a été initiée, et les premiers pots de ponte ont été déposés en février 2020 dans douze localités différentes aux patterns épidémiologiques variés. Celles-ci se répartissent au sein de six communes que sont Trois Bassin, Saint Louis, Saint Paul, Bras Panon, Le Tampon, et Sainte Clotilde. Plusieurs sorties sur le terrain pour récupérer et renouveler les papiers de pontes ont été nécessaires afin d'obtenir un nombre suffisant d'œufs. La campagne de terrain s'est étendue alors sur plusieurs mois. Après cinq sessions sur le terrain et un total de 350 papiers de ponte récupérés, le confinement lié à la pandémie du COVID-19 nous contraint à arrêter nos campagnes de terrain mi-mars 2020. Pour des raisons de sécurité les laboratoires sont alors presque entièrement fermés et la priorité est logiquement donnée à l'aide que le laboratoire peut fournir dans cette situation pandémique sans précédent via le séquençage des cas de COVID-19 détectés à La Réunion (voir en Annexe 2. Publication 7 : "Genomic insights into early SARS-CoV-2 strains isolated in Reunion Island." Wilkinson et al., 2021).

Lorsque le travail a pu reprendre en fonctionnement normal, les laboratoires et insectarium ont été relancés. Cependant, les œufs conservés à sec n'ont pas éclos suffisamment lors de leur mise en eau à cause d'une trop longue période de dessiccation. Il n'était pas possible de travailler sur les F0, et, pour ne pas perdre tout le travail de terrain effectué, la décision a été prise d'amplifier les six populations sur une ou deux générations (F1 et F2), les localités appartenant aux mêmes communes ayant été rassemblées en une seule et même population. Pour trois de ces populations, à savoir Ligne Paradis, Saint Paul et

Saint Louis, le nombre d'individus femelles après une génération d'amplification est conséquent et permet de réaliser le test de compétence vectorielle sur les femelles F1 âgées de 7 à 10 jours. En revanche pour les trois autres populations que sont Bras Panon, Sainte Clotilde, et Trois Bassins, les F1 ne présentent pas un nombre de femelles suffisant pour réaliser les infections expérimentales. Il a fallu attendre l'amplification en F2 pour obtenir un nombre suffisant de femelles âgées de 7 à 10 jours pour l'expérimentation.

Le caractère chronophage de la méthodologie de collecte choisie et l'incertitude sur l'évolution à court terme de la situation sanitaire du fait de la pandémie de COVID-19 font que les campagnes de terrain n'ont pas pu être réitérées. Pour obtenir les populations de F0, il a été décidé de se focaliser sur les cimetières dans des zones de plus ou moins forte incidence de dengue, et de prélever les larves et nymphes avec leur eau de gîte. Les cimetières ont alors été privilégiés du fait des densités importantes de population de moustiques qui y sont observées (gîtes larvaires et adultes) et de leur accessibilité, malgré un risque de s'éloigner des quartiers de fortes incidences de la dengue. Les stades aquatiques sont ainsi collectés dans les gîtes larvaires des cimetières de Sainte Marie, Saint André, Saint Gilles les Hauts, et Saint Philippe d'avril à mai 2021. Les larves et nymphes collectées pour chaque localité sont ensuite placées en conditions contrôlées au sein de l'insectarium, et y sont élevées dans de l'eau prélevée sur le terrain jusqu'à émergence en adulte. Puis, les infections expérimentales sont réalisées sur les femelles F0 de 7 à 10 jours pour chacune de ces populations. Les densités en *Wolbachia* sont mesurées chez les populations F0 afin de mettre en relation cette densité et la compétence vectorielle observée. Les méthodes et résultats sont détaillés dans l'article présenté ci-dessous.

2.3. Publication 4: “Vector competence of *Aedes albopictus* field populations from Reunion Island exposed to local epidemic dengue viruses”

~ PDF de la version de l'article accepté dans PLOS ONE ~

Vector competence of *Aedes albopictus* field populations from Reunion Island exposed to local epidemic dengue viruses

Sarah Hafsia¹, Tatiana Barbar¹, Haoues Alout², Fiona Baudino¹, Cyrille Lebon¹, Yann Gomard^{1, #a}, David A Wilkinson^{1, #b}, Toscane Fourié¹, Patrick Mavingui^{1*} and Célestine Atyame^{1*}

¹ Université de La Réunion, UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical), CNRS 9192, INSERM 1187, IRD 249, La Réunion, France

² Unité Mixte de Recherche Animal Santé Territoires Risques Écosystèmes, F-34398, CIRAD/INRAE/Université de Montpellier, Université de Montpellier, Montpellier, France.

^{#a} Current address: Université de La Réunion, UMR PVBMT (Unité Mixte de Recherche Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical), F-97410 Saint-Pierre, La Réunion, France

^{#b} Current address: Unité Mixte de Recherche Animal Santé Territoires Risques Écosystèmes, CIRAD/INRAE/Université de Montpellier, Plateforme Technologique CYROI, La Réunion, France

* Corresponding authors:

E-mail : celestine.atyame-nten@univ-reunion.fr (CA), patrick.mavingui@univ-reunion.fr (PM)

Short title: Dengue epidemics sustained by *Aedes albopictus* in Reunion Island.

Abstract

Dengue virus (DENV) is the most prevalent mosquito-borne *Flavivirus* that affects humans worldwide. *Aedes albopictus*, which is naturally infected with the bacteria *Wolbachia*, is considered to be a secondary vector of DENV. However, it was responsible for a recent DENV outbreak of unprecedented magnitude in Reunion Island, a French island in the South West Indian Ocean. Moreover, the distribution of the cases during this epidemic showed a spatially heterogeneous pattern across the island, leading to questions about the differential vector competence of mosquito populations from different geographic areas. The aim of this study was to gain a better understanding of the vector competence of the *Ae. albopictus* populations from Reunion Island for local DENV epidemic strains, while considering their infection by *Wolbachia*. Experimental infections were conducted using ten populations of *Ae. albopictus* sampled across Reunion Island and exposed to three DENV strains: one strain of DENV serotype 1 (DENV-1) and two strains of DENV serotype 2 (DENV-2). We analyzed three vector competence parameters including infection rate, dissemination efficiency and transmission efficiency, at different days post-exposition (dpe). We also assessed whether there was a correlation between the density of *Wolbachia* and viral load/vector competence parameters. Our results show that the *Ae. albopictus* populations tested were not able to transmit the two DENV-2 strains, while transmission efficiencies up to 40.79% were observed for the DENV-1 strain, probably due to difference in viral titres. Statistical analyses showed that the parameters mosquito population, generation, dpe and area of sampling significantly affect the transmission efficiencies of DENV-1. Although the density of *Wolbachia* varied according to mosquito population, no significant correlation was found between *Wolbachia* density and either viral load or vector competence parameters for DENV-1. Our results highlight the importance of using natural mosquito populations for a better understanding of transmission patterns of dengue.

Keywords: dengue virus, *Aedes albopictus*, vector competence, Reunion Island, epidemiological patterns.

Introduction

Dengue is the most widespread mosquito-borne disease affecting humans, with half of the global population located in 128 tropical and subtropical countries, at risk of infection [1,2]. Most of the 96 million symptomatic cases per year are dengue fevers, which are characterized by a panel of mild symptoms [3]. However, some cases demonstrate much more severe syndromes called severe dengue (which can include severe plasma leakage, severe hemorrhagic syndrome, with or without shock, and various organ dysfunctions). Severe dengue is responsible for 20,000 deaths each year [4,5]. The etiological agent of the disease, the dengue virus (DENV), is a positive single-stranded linear RNA genome (11 kilobases), belonging to the genus *Flavivirus* (*Flaviviridae* family). Four different DENV serotypes exist, each of which is divided into several genotypes based on molecular analyses [6–8]. Long term serotype-specific immunity follows a DENV infection and lasts for several decades [9], whereas secondary infection with a heterologous serotype can lead to severe disease manifestations through the antibody-dependent enhancement effect [10,11]. The DENV is transmitted to humans through the bite of infected female mosquitoes, mostly of the *Aedes* genus. Globally, the mosquito species *Aedes aegypti* is considered as the primary DENV vector, with *Aedes albopictus* recognized as a secondary vector [5,12–14]. However, outbreaks of dengue involving *Ae. albopictus* have been reported in some countries, such as in Japan (in 1942 and in 2014) [15,16], Hawaii (in 2001) [17], Madagascar (in 2006) [18], Gabon (in 2007) [19], China (in 2004 and 2010) [20,21] and more recently in Reunion Island (in 2017) [22].

Reunion Island is an overseas French department located in South-Western Indian Ocean (SWIO), about 700 km east of Madagascar. Several dengue outbreaks have been documented on the island, with the first officially recorded one dating back to 1977 [23]. Subsequently, low-intensity outbreaks have been reported for several years, with less than 230 cases per year and no death related to dengue. However, Reunion Island has faced unprecedented epidemiological patterns from 2017 to 2021. During this period, 71,636 confirmed cases, 542 severe forms and 78 deaths were reported [22]. All four DENV serotypes have been detected in Reunion Island since 1977: the three serotypes DENV-1, DENV-2 and DENV-3 in autochthonous cases, and all four serotypes in imported cases [22]. A strong seasonal pattern in dengue incidence has been reported on the island, with peaks occurring between March and June (i.e., during the hot and rainy season) [22]. Besides this seasonality, the geographic distribution of dengue cases is often heterogeneous across the island, with the western and the southern parts being the most affected compared to the northern, eastern and central parts [22]. Although factors related to human populations (demography, geographic mobility, immunity) and DENV genetics may explain the transmission pattern of DENV in Reunion Island, the role of mosquito populations should also be taken into account [22].

Among the 12 species of mosquitoes encountered in Reunion Island, both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* are present [24–26]. However, *Ae. albopictus* is the most abundant mosquito species and is commonly found throughout the island, even at altitudes exceeding 1,000 m [24,27]. This species was identified as the main vector responsible for a significant Chikungunya outbreak on Reunion Island in 2005–2006 [28], and it is also a major vector involved in dengue epidemics on the island [23,29–31]. The role of *Ae. albopictus* in the transmission of DENV in Reunion Island is supported by its large distribution across the island and the occurrence of peaks of DENV

transmission that coincide with periods of high population densities of this vector [32,33]. DENV-1 was detected in pooled samples of *Ae. albopictus* collected in Reunion Island during the 2004 epidemic [30]. Other studies have shown that *Ae. albopictus* from Reunion Island are capable of being infected with both DENV-1 [34] and DENV-2 [35,36]. However, these data do not provide a clear picture of the vector competence variability (the ability of a vector to be infected and to transmit a pathogen) among *Ae. albopictus* populations from Reunion Island and their potential role in the geographical contrasts of dengue cases.

The aim of this study was to examine vector competence of natural populations of *Ae. albopictus* from Reunion Island, collected in areas of high and low DENV transmission. A laboratory line of *Ae. aegypti* from Reunion Island was used as a control. Experimental infections were performed using local epidemic DENV-1 and DENV-2 strains. Since no geographic structure of the genetic diversity of *Ae. albopictus* populations has been observed in Reunion Island [37,38], we also assessed the influence of the density of endosymbiotic bacteria *Wolbachia* on vector competence phenotypes. *Aedes albopictus* is naturally infected with two *Wolbachia* strains, namely wAlbA and wAlbB [39], which can interfere with the replication and transmission of DENV [35,40,41]. The results of this investigation may help to better understand the role of *Ae. albopictus* populations in the epidemiological patterns of dengue in Reunion Island.

Materials and Methods

Mosquitoes

Aedes albopictus specimens were collected as eggs, larvae and pupae in 10 localities across Reunion Island in 2020 and 2021: Sainte-Marie (F0_SM), Saint-André (F0_SA), Saint-Gilles les Hauts (F0_SG), Saint-Philippe (F0_SPh), Saint-Paul (F1_SPa), Saint-Louis (F1_SL), Ligne Paradis (F1_LP), Sainte-Clotilde (F2_SC), Bras-Panon (F2_BP) and Trois Bassins (F2_TB) (Fig 1 and Table 1). Field samples (F₀ generation) were reared in the laboratory under standard conditions [26 ± 1°C, 80% relative humidity (RH), 12 h light/12 h dark photoperiod]. Larvae were fed with yeast tablets, and adults were provided with 10% sucrose solution. Samples collected as eggs were amplified for one generation (F₁) or two generations (F₂) before vector competence experiments. To achieve this, adult females were artificially fed with bovine blood using the Hemotek feeding system (Hemotek Limited, Great Harwood, UK) covered by pig intestine. Experimental infections were conducted using four *Ae. albopictus* populations of F₀ generation (F0_SM, F0_SA, F0_SG and F0_SPh), three populations of F₁ generation (F1_SPa, F1_SL and F1_LP), and three populations of F₂ generation (F2_SC, F2_BP and F2_TB) (Table 1). A laboratory colony of *Ae. aegypti* (F₃₁ and F₃₇ generations), established from mosquitoes collected in the Trois Bassins locality in 2014 (F31_Aeg and F37_Aeg), was also used (Fig 1 and Table 1).

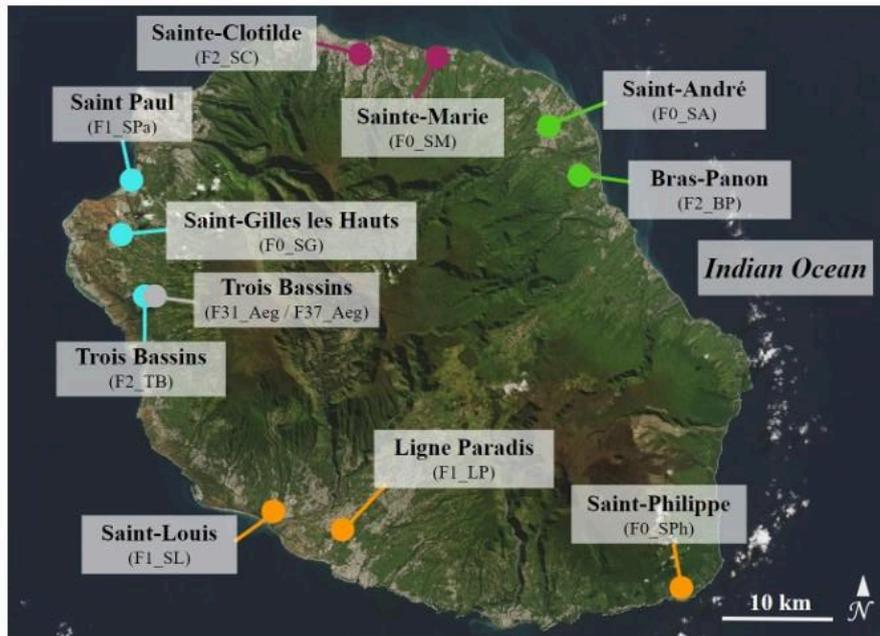


Fig 1. Map of sampling sites of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Reunion Island. For *Ae. albopictus*, the sampling sites are colored according to geographic regions: orange, South; blue, West; purple, North; and green, East. The unique *Ae. aegypti* population is colored in gray. Population codes and the generation (i.e. F₀, F₁, F₂, F₃₁, or F₃₇ generation) at which mosquitoes were used for the vector competence experiments are given in brackets. The satellite image was extracted from the NASA Earth Observatory public domain image database [42].

Table 1. General information about mosquito populations and DENV strains used in this study. For each population and condition, the number of samples examined after DENV exposure are indicated. dpe = days post-exposition.

Mosquitoes					DENV strain	Number of samples examined		
Species	Sampling site (population code)	Geographic area	Generation	Date of collection		14 dpe	21 dpe	28 dpe
<i>Aedes albopictus</i>	Sainte-Marie (F ₀ _SM)	North	F ₀	April 2021	DENV-1	32	48	48
				May 2021	DENV-2_EVAg	48	48	48
	Sainte-Clotilde (F ₂ _SC)	North	F ₂	February to March 2020	DENV-1	24	24	26
					DENV-1	32	38	0
	Saint-Gilles les Hauts (F ₀ _SG)	West	F ₀	April 2021	DENV-1	32	48	48
					DENV-2_EVAg	0	0	5
	Saint-Paul (F ₁ _SPa)	West	F ₁	February to March 2020	DENV-2_JUL	17	0	0
	Trois Bassins (F ₂ _TB)	West	F ₂	February to March 2020	DENV-1	48	48	76
	Saint-Philippe (F ₀ _SPh)	South	F ₀	April 2021	DENV-1	32	48	48
					DENV-2_EVAg	0	0	16
	Saint-Louis (F ₁ _SL)	South	F ₁	February to March 2020	DENV-2_JUL	22	0	0
Ligne Paradis (F ₁ _LP)	South	F ₁	February to March 2020	DENV-2_JUL	17	0	0	
Saint-André (F ₀ _SA)	East	F ₀	April 2021	DENV-1	32	48	32	
				DENV-2_EVAg	48	48	48	
Bras-Panon (F ₂ _BP)	East	F ₂	February to March 2020	DENV-1	48	48	70	
<i>Aedes aegypti</i>	Trois Bassins (F ₃₁ _Aeg or F ₃₇ _Aeg)	Laboratory colony	F ₃₁	2014	DENV-2_EVAg	35	0	0
			F ₃₇		DENV-2_JUL	32	0	0
			DENV-1		32	48	30	

Viral strains

Three clinical DENV strains isolated from autochthonous human cases from Reunion Island were used: one DENV-1 strain of genotype 1, (GenBank accession number: ON631277), and two DENV-2 strains of the same lineage inside the cosmopolitan genotype, DENV-2_JUL (GenBank accession number: MN272404) and DENV-2_EVAg (EVAg reference: UVE/DENV-2/2018/RE/47099). The DENV-1 strain was isolated on Vero E6 cells (ATCC, ref. CRL-1586) from a serum sampled in 2019 [43]. The DENV-2_JUL was isolated on Vero E6 cells from a blood sample collected from a patient in 2018 [44]. The DENV-2_EVAg was purchased as lyophilizate from the European Virus Archive goes global (EVAg) at passage 4. This latest DENV strain was isolated from a traveler returning from Reunion Island to mainland France in 2018. Before viral production, the lyophilized DENV-2_EVAg was resuspended into 200 µl distilled water. Viral stocks of the three DENV strains used in experimental infections were amplified on Vero E6 cells at a MOI of 0.1 in an Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 2 mmol/l L-glutamine, 1 mmol/l sodium pyruvate, 10 U/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin and 0.5 µg/ml of fungizone (PAN Biotech, Aidenbach, Germany). Vero cells were maintained at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere. For all virus stocks, supernatants were harvested three to five days post-infection after the onset of cytopathic effects and then frozen at -80°C until use.

Experimental infections

Seven to fifteen-day-old female mosquitoes were isolated in small cages (16×16×16 cm) and starved for 24 to 30 hours. After this starvation period, they were allowed to feed for 45 minutes on infectious blood meals consisting of 1 ml of washed rabbit erythrocytes, 1 ml of DENV suspension and 5 mM (21 µl) of adenosine triphosphate used as a phagostimulant. The infectious blood meal was delivered to mosquitoes using the Hemotek feeding system (Hemotek Limited, Great Harwood, UK) covered with pig intestine. Because we were unable to increase the titres of viral stocks of the two DENV-2 strains for experimental infections, infectious blood meals were performed with the maximum possible virus titre which differed between DENV strains with 7×10^6 PFU/ml, 6.8×10^4 PFU/ml and 3.2×10^5 PFU/ml for DENV-1, DENV-2_JUL and DENV-2_EVAg, respectively. Then, mosquitoes were cold-anesthetized, and engorged females were transferred into a climatic chamber (26±1°C, 80% of RH and with a photoperiod of 12 h light/12 h dark) where they were maintained with a 10% sucrose solution for a maximum of 28 days. Seven *Ae. albopictus* populations were infected with DENV-1 (FO_SM, FO_SG, FO_SPh, FO_SA, F2_SC, F2_BP, F2_TB), three populations were infected with DENV-2_JUL (F1_SPa, F1_SL, F1_LP), and four populations with DENV-2_EVAg (FO_SM, FO_SG, FO_SPh, FO_SA) (Table 1). The *Ae. aegypti* colony (F₃₁ and F₃₇ generations) was infected with the three DENV strains (Table 1). Mosquito populations infected with a specific DENV strain were selected based on the availability of the both mosquito populations and the viral strains in the laboratory.

Vector competence analysis

At 14, 21, and 28 days post-exposure (dpe) to infectious blood meals, legs and wings of mosquitoes (N= 5 to 76, Table 1) were removed before salivation [45]. Saliva from individual mosquitoes was collected for 30 min by inserting the proboscis into a pipette tip containing 5 µl of

FBS. Afterwards, the solution contained in the tip was transferred to 45 μ l of complete MEM medium (i.e. MEM supplemented with l-glutamine, sodium pyruvate, penicillin, streptomycin and fungizone as described above). Then the head and the body (thorax and abdomen) were separated and ground in 200 μ l of complete MEM medium supplemented with 2% FBS. After a centrifugation at 10,000 \times g for 5 minutes to pellet tissue debris, 150 μ l of the supernatant of each sample was stored at -80°C until detection and titration of DENV. For bodies, pellets were stored in -80°C for the measurement of *Wolbachia* density (see below). The detection of DENV in bodies, heads and saliva was performed by plaque forming unit (PFU) assays on Vero cells. For bodies and heads, 48-well culture plates were seeded with 5×10^4 Vero E6 cells per well. For saliva, 12-well plates were seeded with 3×10^5 Vero E6 cells per well. The following day, cells were incubated for 2 hours (37°C, 5% CO₂) with 100 μ l of ten-fold dilutions of body or head homogenates, or with 250 μ l of ten-fold dilutions of the solution containing saliva. All dilutions were performed with complete MEM medium supplemented with 2% FBS. Then, 200 μ l (for bodies and heads) or 1 ml (for saliva) of MEM medium supplemented with 5% of FBS and 0.8% of carboxymethylcellulose sodium salt (CMC; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) were added to each well. After 5 days of incubation (37°C, 5% CO₂), supernatants were removed, cells were washed twice with PBS, fixed with 3.7% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich), and stained with 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich) dissolved in ethanol 20% (S1 Fig). Vector competence of each population was evaluated based on three parameters: the infection rate (IR), the dissemination efficiency (DE), and the transmission efficiency (TE). IR, DE and TE correspond respectively to the proportion of infected bodies, head and saliva among the total number of mosquitoes tested. For each DENV strain, the number of mosquitoes analyzed per population and the selected dpe depended on the total number of females having taken an infectious blood meal.

Viral RNA extraction and amplification

Viral loads in the bodies of infected F₀ *Ae. albopictus* mosquitoes (N=43) previously exposed to DENV-1 and collected at 21 and 28 dpe were quantified using the reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR). These samples are sub-samples of those tested for vector competence (infection rates). RNA from mosquito bodies was individually extracted using the QIAcube HT robotic workstation and the associated Cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit (QIAGEN) following manufacturer's recommendations with slight modifications. Extracted RNA was eluted in 100 μ l of AVE buffer (QIAGEN). The RT-qPCR was then performed using the QIAGEN OneStep RT-PCR Kit according to the manufacturer's recommendations. For this, a mixed solution was prepared with RNA template (5 μ l), a TaqMan probe (FAM-ACACCTCAAGCTAA-TAMRA), and primers (Forward 5'-GAACATGGRACAAYTGCAACYAT-3'; Reverse 5'-CCGTAGTCDGTGCTGCTATTTC-3') specific for the DENV-1 viral envelope gene. The thermocycler program consisted of a reverse transcription step of 45 min at 45°C, denaturation for 5 min at 95°C followed by 40 cycles of amplification (72°C for 5 s and 56°C for 60 s). The number of viral RNA copies was estimated against a standard curve following the methodology published by the HAS (Haute Autorité de Santé, France). Briefly, plasmids containing targeted DENV-1 were synthesized by GeneCust (France) and used as the standard curve at concentrations of 10¹ to 10⁸ RNA copies per μ l.

***Wolbachia* density**

Wolbachia were quantified in bodies of F_0 *Ae. albopictus* mosquitoes (N=75) previously exposed to DENV-1 and collected at 21 and 28 dpe. DNA was extracted from individual body carcasses, previously stored in -80°C from samples used to test vector competence (infection rates), using the QIAcube HT robotic workstation and the associated Cador Pathogen 96 QIAcube HT Kit (QIAGEN) following the manufacturer's recommendations with slight modifications. Afterwards, DNA was eluted in 100 μl of AVE buffer (QIAGEN) and stored at -20°C until molecular investigations. Real-time quantitative PCRs were performed with the CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) to estimate the number of *Wolbachia* genome copies in each sample. Two PCRs that specifically amplified the *Wolbachia* surface protein gene *wsp* for the strains *wAlbA* and *wAlbB* were performed using newly designed primers for *wAlbA* (*wspA*: *wspA_F* 5'-TAACAGCAATTCAGGACTAG-3' and *wspA_R* 5'-CTGTTTTGATTATTATAGCGG-3') and *wAlbB* (*wspB*: *wspB_F* 5'-GTGGCAGTATTTTCAGGATTG-3' and *wspB_R* 5'-CTGCACTAGCTTCTGAAGG-3') that amplify 140 bp and a 130 bp fragments, respectively. *Wolbachia* genomes were quantified relative to mosquito genomes. To this end, a fragment of the *Ae. albopictus* 40S ribosomal protein S7 (RSP7) gene of 140 bp was amplified with designed primers (*RSP7_F* 5'-ATCGAGTTC AACAGCAAGAA-3' and *RSP7_R* 5'-CGACGTGCTTGCCGGAGAAC-3'). About 5 ng of genomic DNA was mixed with 10 μl of QuantiNova Probe RT-PCR master mix (QIAGEN), 1 μl (10 μM) of each primer and 3.6 μl of RNase-free water. PCRs were run with activation for 2 mins at 95°C followed by 45 cycles (95°C for 5s and 60°C for 5s). Each DNA template was analyzed in triplicate for *wspA*, *wspB* and RSP7. A standard curve was generated for each qPCR run to standardize the signals with the RSP7 reference. The relative mean genome number of *wAlbA* and *wAlbB* strains was obtained per RSP7 copy number.

Statistical analysis

Vector competence for DENV

A first analysis was performed on all data using the proportion test to compare IR, DE and TE parameters between mosquito populations for each dpe and each DENV strain separately. A Bonferroni correction was applied for multiple comparisons [46]. A second analysis was performed to study the effects of four explanatory parameters on the vector competence of *Ae. albopictus* populations to DENV-1 using generalized linear models (GLM) with a binomial error structure (or quasi-binomial in case of over-dispersed data). The explanatory parameters tested were all categorical: '*population*' (seven modalities: F_0 _SM, F_0 _SA, F_0 _SG, F_0 _SPh, F_2 _SC, F_2 _BP and F_2 _TB), '*generation*' (two modalities: F_0 and F_2), '*dpe*' the day post-exposure (three modalities: 14 dpe, 21 dpe, and 28 dpe), and '*area*' (four modalities: North, East, South and West). The GLM analyses were made independently for each of the three vector competence parameters (i.e. IR, DE, and TE) used as binary response variables (DENV infected and non-infected). As each population had only one generation, the effect of the two parameters '*population*' (of F_0 or F_2 generation) and '*generation*' were analyzed independently to avoid any confounding effect. Therefore, three distinct models were used: GLM1 with the following maximal model on F_0 generation only "*population * dpe*", GLM2 with on F_2 generation only "*population * dpe*", and GLM3 on all populations with "*(generation + dpe + area)^2*". Selection of the minimal model was assessed using the likelihood ratio test (LRT), and the significance of the selected parameters

addressed by Anova from the *car* R package [47]. Based on the minimal model selected, the *emmeans* R package [48] was used to assess the statistical difference between the modalities.

Wolbachia density

We first compared *Wolbachia* density (*wAlbA*, *wAlbB*, or *wAlbTot*) according to dpe for each population using the Mann_Whitney test for unpaired samples and no significant difference was noted between 21 and 28 dpe either for *wAlbA*, *wAlbB*, or *wAlbTot* (Mann_Whitney tests; all *p*-values > 0.0789). Therefore, subsequent analyses were carried out by combining samples from both dpe (N=75, 41 samples from 21 dpe and 34 samples from 28 dpe). The Mann_Whitney test was also used to compare the densities of the two *Wolbachia* strains for each mosquito population. The effect of population on *Wolbachia* density (*wAlbA*, *wAlbB*, or *wAlbTot*) was explored using the non-parametric Kruskal-Wallis analysis followed by pairwise post-hoc comparisons of medians with a Dunn's test. To assess the influence of *Wolbachia* on vector competence parameters, mosquitoes were first classified according to four IDT (Infection, Dissemination, Transmission) scores (0, 1, 2 or 3). These IDT scores were defined as follows: the IDT score 0 for mosquitoes with no infectious DENV-1 particles either in the body, head or saliva; the IDT score 1 for samples with only infected bodies; the IDT score 2 for mosquitoes with infectious particles in the bodies and the heads; and the IDT score 3 for mosquitoes with infectious DENV-1 particles in the bodies, heads and saliva (S1 Table). Then *Wolbachia* density medians were compared between different combinations of these IDT scores using Mann_Whitney tests for unpaired samples. The correlation between *Wolbachia* densities and DENV-1 viral load in the bodies of infected mosquitoes was examined using a Pearson correlation coefficient test in a sub-sample of DENV-1 infected *Ae. albopictus* (N=43). The effect of mosquito population on DENV-1 viral load was also explored using the non-parametric Kruskal-Wallis analysis followed by pairwise post-hoc comparisons of medians with a Dunn's test.

All the statistical analyses were performed in R software (v.3.6.2) (R Core Team 2019) with also the following packages: PropCIs [49], stats (R Core Team 2019), ggplot2 [50], rstatix [51], ggbreak [52], and glm2 [53].

Results

Aedes albopictus populations of three generations (F_0 , F_1 and F_2) collected in different geographic areas (North, East, South and West) in Reunion Island, and a laboratory colony of *Ae. aegypti* (F_{31} and F_{37} generations) used as control, were exposed to three DENV strains: one DENV-1 and two DENV-2 that have circulated on the island between 2018-2020 (Table 1).

No transmission of DENV-2 strains by *Aedes albopictus* populations

Three *Ae. albopictus* populations of F_1 generation ($F1_SPa$, $F1_SL$ and $F1_LP$) were exposed to the DENV-2_JUL strain and vector competence parameters were examined at 14 dpe. Low IR were observed with values ranging between 5.88% (95% Confidence Interval = 1.05 - 26.98%) and 11.76% (3.29 - 34.34%) (S2 Table) but no significant differences between populations were observed in pairwise comparisons (all *p*-values > 0.99). No dissemination or transmission of

DENV-2_JUL was observed for the three *Ae. albopictus* populations (S2 Table). In comparison, a laboratory colony of *Ae. aegypti* exposed to DENV-2_JUL was examined at 14 and 21 dpe. Similar to *Ae. albopictus*, low IRs were observed: 9.38% (3.24 - 24.22%) and 8.82% (3.05 - 22.96%) at 14 and 21 dpe, respectively, and no dissemination or transmission of the DENV-2_JUL strain at either dpe (S2 Table).

Four *Ae. albopictus* populations of F₀ generation (F0_SM, F0_SA, F0_SG, and F0_SPh) were exposed to the DENV-2_EVAg strain and vector competence parameters were examined at 14, 21, and 28 dpe for F0_SM and F0_SA, and only at 28 dpe for F0_SG and F0_SPh. The *Ae. albopictus* populations also showed very low vector competence to DENV-2_EVAg. In F0_SM and F0_SA populations, only one infected body was observed at 14 dpe (IR=2.08%; 0.37 - 10.90%; for both populations), and no infection was observed later at 21 or 28 dpe (S3 Table). At 28 dpe, no infected body was observed in the F0_SG population (S3 Table), while IR in the F0_SPh population was estimated at 25% (10.18 - 49.50%), and was significantly higher than in F0_SM and F0_SA population (IR=0.00%; 0.00 - 7.41% for both populations; and *p-values* = 0.009 for both comparisons). No dissemination or transmission was observed for the different populations and dpe considered (S3 Table). For *Ae. aegypti*, IR was 8.57% (2.96 - 22.38%) at 14 dpe, and, unlike *Ae. albopictus* populations, virus dissemination was observed (DE=2.86%; 0.51 - 14.53%) for the DENV-2_EVAg strain. However, as with the *Ae. albopictus* populations, no transmission was observed at 14 dpe for *Ae. aegypti* (S3 Table).

Transmission of the DENV-1 strain by *Aedes albopictus* populations

We examined the vector competence of four *Ae. albopictus* populations of F₀ generation (F0_SM, F0_SA, F0_SG and F0_SPh) and three populations of F₂ generation (F2_SC, F2_BP and F2_TB), as well as a laboratory colony of *Ae. aegypti*, at 14, 21, and 28 dpe after exposure to the DENV-1 strain (Fig 2 and Table 2).

Table 2. Vector competence parameters of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* populations exposed to the DENV-1 strain. Infection rates (IR), dissemination efficiencies (DE), and transmission efficiencies (TE) were examined at 14, 21, and 28 days post-exposure (dpe) to an infectious blood meal. IR = number of infected bodies among the mosquitoes tested (%); DE = number of infected heads among the mosquitoes tested (%); TE = number of infected saliva among the mosquitoes tested (%). The numbers in brackets correspond to the 95% confidence interval, while the numbers in parentheses represent the count of positive samples out of the total samples tested. ND = not done. F0_SM, F0_SA, F0_SG, F0_SPh, F2_SC, F2_BP and F2_TB correspond to *Ae. albopictus* populations and F37_Aeg is the *Ae. aegypti* population.

Population	14 dpe			21 dpe			28 dpe		
	IR	DE	TE	IR	DE	TE	IR	DE	TE
F0_SM	28.13% [15.56 - 45.37%] (9/32)	3.13% [0.55 - 15.74%] (1/32)	3.13% [0.55 - 15.74%] (1/32)	27.08% [16.57 - 41.00%] (13/48)	25.00% [14.92 - 38.78%] (12/48)	14.58% [7.25 - 27.17%] (7/48)	20.83% [11.73 - 34.26%] (10/48)	20.83% [11.73 - 34.26%] (10/48)	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)
F0_SA	31.25% [17.95 - 48.57%] (10/32)	15.63% [6.86 - 31.75%] (5/32)	9.38% [3.24 - 24.22%] (3/32)	18.75% [10.19 - 31.94%] (9/48)	16.67% [8.70 - 29.58%] (8/48)	10.42% [4.53 - 22.17%] (5/48)	9.38% [3.24 - 24.22%] (3/32)	6.25% [1.73 - 20.15%] (2/32)	3.13% [0.55 - 15.74%] (1/32)
F0_SG	9.38% [3.24 - 24.22%] (3/32)	0.00% [0.00 - 10.72%] (0/32)	0.00% [0.00 - 10.72%] (0/32)	37.50% [25.22 - 51.64%] (18/48)	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	4.17% [1.15 - 13.98%] (2/48)	31.25% [19.95 - 45.33%] (15/48)	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	6.25% [2.15 - 16.84%] (3/48)
F0_SPh	15.63% [6.86 - 31.75%] (5/32)	6.25% [1.73 - 20.15%] (2/32)	0.00% [0.00 - 10.72%] (0/32)	37.50% [25.22 - 51.64%] (18/48)	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	2.08% [0.37 - 10.90%] (1/48)	14.58% [7.25 - 27.17%] (7/48)	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	8.33% [3.29 - 19.55%] (4/48)

F2_SC	40.63% [25.52 - 57.74%] (13/32)	12.50% [4.97 - 28.07%] (4/32)	0.00% [0.00 - 10.72%] (0/32)	52.63% [37.26 - 67.52%] (20/38)	42.11% [27.85 - 57.81%] (16/38)	21.05% [11.07 - 36.35%] (8/38)	ND	ND	ND
F2_BP	64.58% [50.44 - 76.57%] (31/48)	25.00% [14.92 - 38.78%] (12/48)	2.08% [0.37 - 10.90%] (1/48)	68.75% [54.67 - 80.05%] (33/48)	64.58% [50.44 - 76.57%] (31/48)	35.42% [23.43 - 49.56%] (17/48)	57.14% [45.48 - 68.06%] (40/70)	55.71% [44.08 - 66.75%] (39/70)	32.86% [23.00 - 44.50%] (23/70)
F2_TB	54.17% [40.29 - 67.42%] (26/48)	14.58% [7.25 - 27.17%] (7/48)	0.00% [0.00 - 7.41%] (0/48)	45.83% [32.58 - 59.71%] (22/48)	45.83% [32.58 - 59.71%] (22/48)	20.83% [11.73 - 34.26%] (10/48)	68.42% [57.30 - 77.77%] (52/76)	67.11% [55.94 - 76.62%] (51/76)	40.79% [30.44 - 52.02%] (31/76)
F37_Aeg	62.50% [45.25 - 77.07%] (20/32)	6.25% [1.73 - 20.15%] (2/32)	0.00% [0.00 - 10.72%] (0/32)	52.08% [38.33 - 65.53%] (25/48)	41.67% [28.85 - 55.72%] (20/48)	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	66.67% [48.78 - 80.77%] (20/30)	53.33% [36.14 - 69.77%] (16/30)	16.67% [7.34 - 33.56%] (5/30)

All populations were susceptible to DENV-1 infection (Fig 2A and Table 2): IRs values ranged from 9.38% (3.24 - 24.22%) to 64.58% (50.44 - 76.57%) at 14 dpe, from 18.75% (10.19 - 31.94%) to 68.75% (54.67 - 80.05%) at 21 dpe, and from 9.38% (3.24 - 24.22%) to 68.42% (57.30 - 77.77%) at 28 dpe (Fig 2A and Table 2). Statistical analysis of IR showed that the explanatory parameters "dpe", and "area" were not retained in the minimal models of the three GLMs, and therefore had no effect on the IR values (Table 3). Only the "generation" parameter showed a significant influence on IR (GLM3, $X^2 = 51.024$, $df = 1$, $p\text{-value} < 0.0001$), with a higher IR for populations of F₂ generation (IR=58.09%; 53.25 - 62.78%) than for populations of F₀ generation (IR=24.19%; 20.63 - 28.15%; $p\text{-value} < 0.0001$, S4 Table) but no significant difference was noted between populations of the same generation (all $p\text{-values} > 0.05$).

All *Ae. albopictus* populations, as well as the *Ae. aegypti* colony, were able to disseminate DENV-1 (Fig 2B and Table 2). Similar to IR, pairwise comparisons revealed significantly higher DE for populations of F₂ generation compared to those of F₀ generation, but only at 21 and 28 dpe (S4 Table), and no significant difference was noted between populations of the same generation (all $p\text{-values} P > 0.05$). Analyzing both generations separately, DE were not different between populations ("population" parameters not retained in the GLM1 and GLM2 minimal models; Table 3), whereas the "generation" parameter showed a significant influence (GLM3, $X^2 = 61.320$, $df = 1$, $p\text{-value} < 0.0001$) with higher mean DE for populations of F₂ generation (DE=44.61%; 39.86 - 49.46%) than for populations of F₀ generation (DE=12.90%; 10.24 - 16.14%; $p\text{-value} < 0.0001$). In contrast to IR, statistical analyses showed a significant effect of dpe, with DE increasing over time for populations of F₂ generation (GLM2, $X^2 = 30.485$, $df = 2$, $p\text{-value} < 0.0001$) from 17.97% (12.28 - 25.52%) at 14 dpe to 51.49% (43.11 - 59.79%) at 21 dpe or to 61.64% (53.55 - 69.14%) at 28 dpe (pairwise comparison, $p\text{-value} = 0.0003$ and $p\text{-value} < 0.0001$, respectively). For populations of F₀ generation, no effect of "dpe" was observed (GLM1, Table 3), with mean DEs ranging from 3.13% (0.55 - 15.74%) to 15.63% (6.86 - 31.75%) at 14 dpe, from 12.50% (5.86 - 24.70%) to 25.00% (14.92 - 38.78%) at 21 dpe, and from 6.25% (1.73 - 20.15%) to 20.83% (11.73 - 34.26%) at 28 dpe (Table 2). When both generations are analyzed together, "dpe" significantly influenced DE (GLM3, $X^2 = 29.334$, $df = 2$, $p\text{-value} < 0.0001$) with DE significantly increasing between 14 dpe (DE=12.11%; 8.66 - 16.68%) and 21 dpe (DE=30.98%; 26.21 - 36.20%) or 28 dpe (DE=35.40%; 30.38 - 40.77%) (pairwise comparison, $p\text{-value} = 0.0001$ and $p\text{-value} < 0.0001$, respectively). Finally, and as for the IR, the "area" parameter was not retained in the GLM3 minimal model, demonstrating no influence on the DE values (Table 3).

The *Ae. albopictus* populations and the *Ae. aegypti* colony tested were all able to transmit the DENV-1 strain tested at 21 dpe, with F0_SM, F0_SA and F2_BP populations containing infectious virus particles in the saliva as soon as 14 dpe (Fig 2C and Table 2). As with the DE, significantly higher TE was found for populations of F₂ generation compared to populations of F₀ generation at both 21 and 28 dpe (S4 Table), but no significant difference was noted between populations of the same generation (all *p-values* > 0.05). Only the “dpe” parameter was retained in the GLM2 minimal model (GLM2, $X^2 = 60.324$, $df = 2$, *p-value* < 0.0001), with a significantly lower TE for the populations of F₂ generation at 14 dpe (TE=0.78%; 0.14 - 4.29%) than at 21 dpe (26.12%; 19.42 - 34.15%, *p-value* = 0.002) or than at 28 dpe (36.99%; 29.58 - 45.06%, *p-value* = 0.0003). TE were not significantly different between the populations of F₀ generation (GLM1) and ranged from 3.13% (0.55 - 15.74%) to 9.38% (3.24 - 24.22%) at 14 dpe, from 2.08% (0.37 - 10.90%) to 14.58% (7.25 - 27.17%) at 21 dpe, and from 3.13% (0.55 - 15.74%) to 12.50% (5.86 - 24.70%) at 28 dpe (Fig 2C and Table 2). For the GLM3, all the explanatory parameters and their two-by-two interactions were retained in the minimal model (Table 3). Post-hoc analyses showed differences in TE between generations within certain areas. In the West, the population of F₂ generation had a significantly higher TE (TE=23.84%; 18.09 - 30.73%) than that of F₀ generation (TE=3.91%; 1.68 - 8.82%; *p-value* < 0.0001). In the East, the population of F₂ generation had a significantly higher TE (TE=25.90%; 19.84 - 33.06%) than that of F₀ generation (TE=8.04%; 4.29 - 14.57%; *p-value* < 0.0001). Moreover, TE increased over time according to the area with, for example, a mean TE for the northern populations increasing significantly between 14 dpe (TE=1.56%; 0.28 - 8.33%) and 21 dpe (TE=17.44%; 10.86 - 26.80%; *p-value* < 0.0001) and between 14 and 28 dpe (TE=12.50%; 5.86 - 24.70%; *p-value* < 0.0001). The *Ae. aegypti* colony presented similar TEs to *Ae. albopictus* with 12.50% (5.86 - 24.70%) and 16.67% (7.34 - 33.56%) at 21 and 28 dpe, respectively (Fig 2C and Table 2).

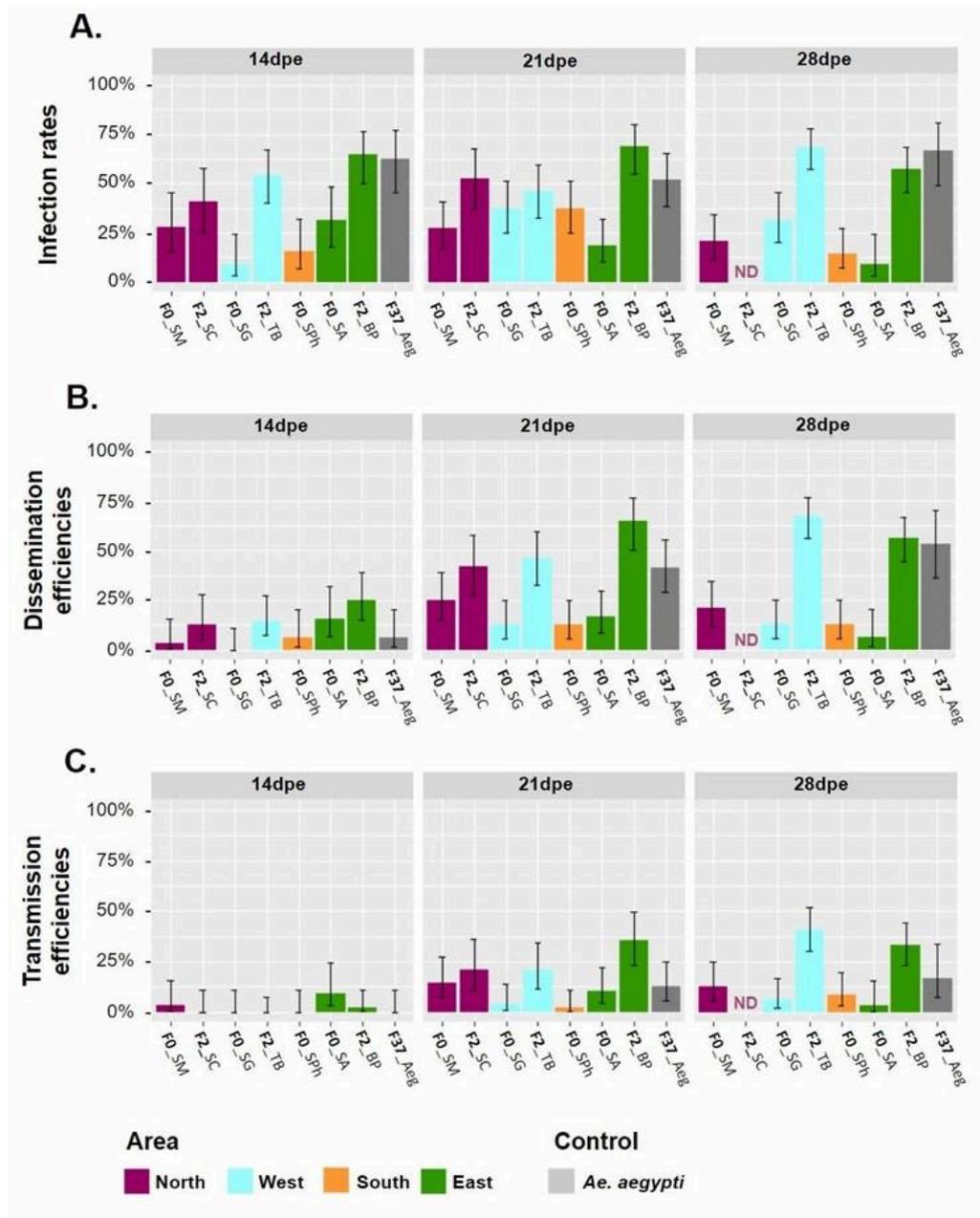


Fig 2. Vector competence parameters of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* populations from Reunion Island exposed to the DENV-1 strain. (A.) Infection rates (IR), (B.) dissemination efficiencies (DE), and (C.) transmission efficiencies (TE) of mosquito populations according to geographic areas (orange: South; blue: West; purple: North; and green: East). Data obtained with *Ae. aegypti* are shown in gray. Vector competence parameters were examined at 14, 21, and 28 days post-exposure (dpe) to the DENV-1 strain via an infectious blood meal. Error bars correspond to the 95% confidence intervals. ND= not determined.

Table 3. Statistical analyses of vector competence parameters of *Ae. albopictus* populations infected with the DENV-1 strain. Mosquitoes were examined at 14, 21 and 28 days post-exposure (dpe). In these analyses, the influence of mosquito population, dpe, generation and area were tested. d.f. is the degree of freedom and χ^2 is the Chi-square value.

	Maximal model	Parameters retained in the minimal model	Generation	IR			DE			TE		
				χ^2	d.f.	p-value	χ^2	d.f.	p-value	χ^2	d.f.	p-value
GLM1	population of F_0 generation + dpe	population	F_0	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		dpe		-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLM2	population of F_2 generation + dpe	population	F_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		dpe		-	-	-	30.485	2	<0.0001	60.324	2	0.0001
GLM3	(generation + dpe + area) ²	generation x dpe	All	-	-	-	-	-	-	154.34	2	<0.0001
		generation x area		-	-	-	-	-	-	38.09	2	<0.0001
		dpe x area		-	-	-	-	-	-	185.61	6	<0.0001
		generation		51.024	1	<0.0001	61.320	1	<0.0001	461.31	1	<0.0001
		dpe		-	-	-	29.334	2	<0.0001	811.59	2	<0.0001
		area		-	-	-	-	-	-	47.41	3	<0.0001

We also tested the influence of the sampling period on vector competence to the DENV-1 strain by comparing IRs, DEs and TEs at 14, 21 and 28 dpe between two populations collected in the same location (F_0_SM) a month apart. No significant difference was observed between the two populations for either IRs (p -values > 0.760, for all the dpe tested), DEs (p -values > 0.356), or TEs (p -values > 0.425) (see S5 Table for all proportion data).

No effect of *Wolbachia* on the replication of DENV-1 in *Aedes albopictus*

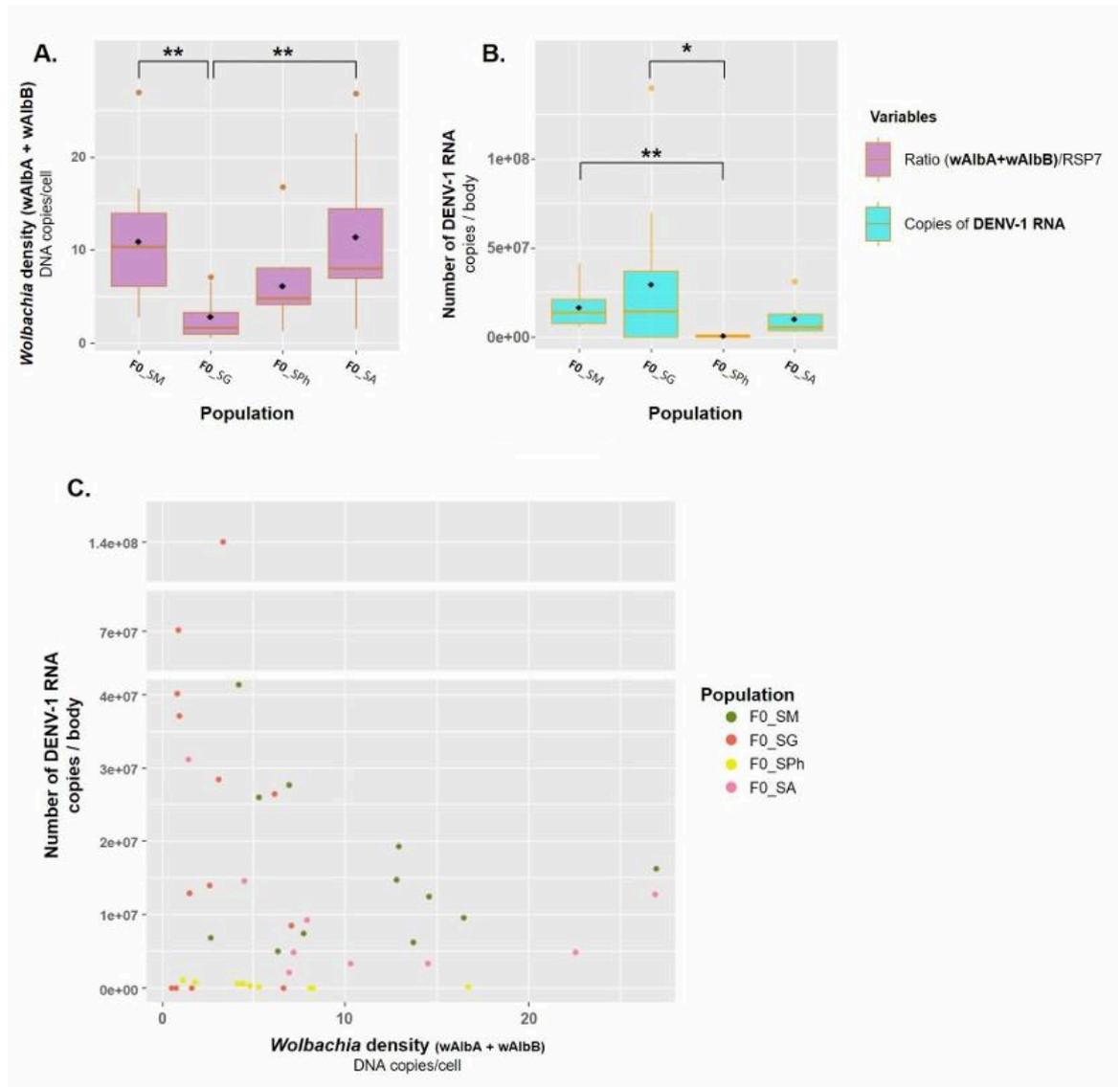
We measured the density of *Wolbachia* strains *wAlbA*, *wAlbB* and of both strains (*wAlbTot*, i.e. *wAlbA* + *wAlbB*) in individual *Ae. albopictus* mosquitoes (N=75) from the four populations of F_0 generation (F_0_SM , F_0_SG , F_0_SPH , F_0_SA) previously exposed to DENV-1 infectious blood meals and collected at 21 and 28 dpe. These two dpe were selected because they showed higher values of vector competence parameters in particular DE and TE (see Fig 2), thus allowing testing the correlation between *Wolbachia* densities and vector competence referred as IDT scores (S1 Table). The *wAlbA* strain presented a significantly higher density than the *wAlbB* strain in the four populations (Mann_Whitney tests; p -value = 0.002 for F_0_SM and for F_0_SA ; p -value < 0.001 for F_0_SG and for F_0_SPH), with median densities per population ranging from 2.20 (0.70 - 2.20) to 9.00 (3.90 - 24.80) bacteria/cell for *wAlbA* and from 0.40 (0.23 - 0.60) to 1.95 (1.40 - 2.30) bacteria/cell for *wAlbB* (S6 Table). The density of both *Wolbachia* strains varied according to mosquito populations (S6 Table), with the lowest densities observed in the F_0_SG population, followed by the F_0_SPH population and higher densities in the F_0_SM and F_0_SA populations (S2 Fig and S6 Table).

To examine the influence of *Wolbachia* density on *Ae. albopictus* vector competence, the samples from the four populations and from both 21 and 28 dpe were gathered (since no significant difference was found between dpe and between populations for F_0 generation, i.e. GLM1, see Table 3). They were then classified according to their IDT score (N = 12 to 19 mosquitoes per IDT

score, S7 Table). No significant difference in *Wolbachia* density was observed between the IDT score 0 (i.e. no infection) and all three other IDT groups (1, 2 and 3) gathered (i.e. with at least one infected tissue) either for wAlbA (Mann_Whitney test, p -value = 0.609), wAlbB (p -value = 0.613), or wAlbTot (p -value = 0.696), suggesting that *Wolbachia* density did not affect the ability of mosquitoes to become infected after exposure to DENV-1 (S3 Fig, S7 Table). Similarly, no significant difference was found by comparing the *Wolbachia* density between the score IDT 1 on one hand, and the scores 2 and 3 gathered on the other hand (S7 Table) (Mann_Whitney tests; p -value = 0.434 for wAlbA; p -value = 0.066 for wAlbB; p -value = 0.494 for wAlbTot), suggesting that *Wolbachia* density did not affect the ability of mosquitoes to disseminate the DENV-1 after being infected (S3 Fig). *Wolbachia* density had also no impact on the ability of mosquitoes to transmit DENV-1 after dissemination in the heads, a result highlighted by the absence of any significant difference between the *Wolbachia* density of IDT scores 2 and 3 (S7 Table) (Mann_Whitney tests; p -value = 0.151 for wAlbA; p -value = 0.238 for wAlbB; p -value = 0.113 for wAlbTot) (S3 Fig).

Finally, we examined the correlation between *Wolbachia* density (wAlbTot i.e. wAlbA+wAlbB) and the number of DENV-1 RNA copies in the bodies of the infected mosquitoes (N = 43 positive samples for DENV-1). The median DENV-1 RNA copies per body in the examined populations ranged from 2.72×10^5 (5.05×10^4 - 7.71×10^5) to 1.40×10^7 (3.41×10^1 - 4.01×10^7) (S8 Table). Firstly, we compared the *Wolbachia* density (Fig 3A) or the DENV-1 viral load (Fig 3B) between the four populations. The mosquito population showed a significant effect on the median *Wolbachia* density (Kruskal-Wallis test, $X^2 = 16.86$, d.f. = 3, p -value < 0.001) and on the median number of DENV-1 RNA copies (Kruskal-Wallis test, $X^2 = 13.48$, d.f. = 3, p -value = 0.004). Although both *Wolbachia* density and DENV-1 viral load vary significantly according to mosquito populations (Fig 3A and Fig 3B), no significant correlation between the two parameters was noted (Pearson correlation coefficient test, $cor = -0.190$, 95% CI = [-0.464;0.117], $t = -1.236$, d.f. = 41, p -value = 0.224) (Fig 3C), suggesting a lack of association between *Wolbachia* density and DENV-1 viral load.

Fig 3. Correlation between *Wolbachia* density and viral load of the DENV-1 strain in *Aedes albopictus* mosquitoes from Reunion Island. The mosquitoes tested belong to the populations of F₀ generation from Sainte-Marie (FO_SM), Saint-Gilles les Hauts (FO_SG), Saint-Philippe (FO_SPh), or Saint-André (FO_SA), and were collected 21 or 28 days post-exposure (dpe) to the DENV-1 local strain. **(A.)** The total *Wolbachia* density (wAlbTot i.e. wAlbA + wAlbB) is given based on the ratio between the *Wolbachia* genomes (wAlbA and wAlbB) and *Ae. albopictus* genomes (RSP7 concentrations) in the bodies of mosquitoes according to their population of origin. **(B.)** Number of DENV-1 RNA copies in the body of the mosquitoes according to their population of origin. In graphs A and B, the line inside each boxplot represents the median and the diamond corresponds to the mean of each population. **(C.)** Number of DENV-1 RNA copies according to the total *Wolbachia* density in the body of each mosquito tested (N=43). * p < 0.05, ** p < 0.01, Dunn's tests.



Discussion

In this study, we examined the vector competence of *Ae. albopictus* populations from Reunion Island exposed to local epidemic DENV-1 and DENV-2 strains that had been previously isolated and genetically characterized [43,44]. The mosquito populations used for experimental infections were collected in different geographic areas across Reunion Island and were of F₀, F₁ and F₂ generations. The use of F₀ populations allowed experimental conditions to be as close as possible to those of natural mosquito populations. We also assessed the vector competence of a laboratory colony of *Ae. aegypti* as control because this species is considered as the primary DENV vector [5,7,54–58]. In general, no significant difference between vector competence of *Ae. albopictus* populations and

the *Ae. aegypti* colony was observed, in agreement with the results of Florida mosquito populations exposed to a DENV-1 strain [59], or of China vector populations exposed with DENV-2 strains [60].

Contrasting results were observed when *Ae. albopictus* populations were exposed to DENV-1 and DENV-2 strains. None of the tested populations was able to transmit the DENV-2 strains, while the DENV-1 strain was transmitted by all populations with TEs reaching 40.8% (in the F2_TB population at 28 dpe). Our results are different from those observed with *Ae. albopictus* populations from other geographic regions which generally show higher levels of transmission with DENV-2 strains compared to DENV-1 strains [61]. For instance, higher viral loads were described in saliva of an *Ae. albopictus* population from Vietnam exposed to DENV-2 compared to specimens infected with DENV-1 [58]. The results observed in *Ae. aegypti* are quite similar to those described in *Ae. albopictus* with no transmission of DENV-2 strains, while TEs of 12.5% and 16.7% were observed with DENV-1 at 21 and 28 dpe, respectively (the means TEs for *Ae. albopictus* being 15.5% and 17.3% at 21 and 28 dpe, respectively). The observed difference in the transmission of the two DENV serotypes by *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes could be explained by two non-exclusive hypotheses. Firstly, the viral titres in infectious blood meals were higher for the DENV-1 strain (7×10^6 PFU/ml) than for the DENV-2 strains (between 6.8×10^4 PFU/ml and 3.2×10^5 PFU/ml), and viral titres in blood meals are known as a factor affecting the vector competence of mosquitoes [58,62–64]. Secondly, the difference in vector competence between DENV-1 and DENV-2 strains could be linked to a greater replicative fitness or affinity of the DENV-1 local strain with the *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* from Reunion Island compared to the two DENV-2 strains. It is recognized that vector competence for a given virus is the result of interactions between a viral strain, a mosquito population and a given environment [41,56,60,63,65–67]. For example, the substitution of E1-226A by E1-226V in the E1 structural protein of the Chikungunya virus has been associated with increased virus replication and transmission in *Ae. albopictus*, contributing to the unprecedented Chikungunya epidemic in Reunion island and other islands in South-Western Indian Ocean in 2005-2006 [68,69]. The hypothesis of a better replicative fitness is reinforced by a previous investigation with Colombian DENV strains showing a greater replicative fitness of DENV-1 compared to DENV-2 in the human hepatocyte cell line (Huh-7) [70]. It would be interesting in future investigations to compare replicative fitness of DENV-1 and DENV-2 strains from Reunion Island in human cell lines, *Ae. albopictus* cell lines as well as in *Ae. albopictus* populations using identical viral titres for both DENV serotypes.

Among the four explanatory parameters including “population”, “dpe”, “generation”, and “area” that can affect the three vector competence parameters (IR, DE, and TE), three parameters (“dpe”, “generation”, and “area”) showed a significant effect. Concerning the “dpe”, a global increase of IRs, DEs and TEs occurred over time, higher values being observed in older mosquitoes in particular at 28 dpe compared to 21 and 14 dpe. This result reflects the kinetics of replication of arboviruses inside mosquitoes, from the initial midgut infection to the release of infectious viral particles in saliva following a dissemination phase in all the tissues [71]. The other significant parameter was the “generation”, with higher vector competence parameters observed in mosquito populations of F₂ generation than that of F₀ generation. The effect of generation on vector

competence could be explained by a reduced genetic diversity in mosquitoes reared in the laboratory due to a founder effect. The rearing of mosquitoes in the laboratory for two generations could alter the mosquito genetic diversity as well as their microbiota [63,72–75]. Indeed, mosquito microbiota, in particular midgut bacteria, have been shown to modulate vector competence in several mosquito species [57,63,76–81] including *Ae. albopictus* [82]. This result shows the importance of working with mosquito populations of F₀ generation to better understand the transmission patterns of arboviruses in the field. It will be interesting in future studies to examine the evolution of vector competence, genetic diversity and microbiota in mosquitoes from the same populations across several generations. Finally, as the geographic distribution of dengue cases is often heterogeneous across the island, with the western and the southern parts being the most affected compared to the northern, eastern and central parts [22], mosquito populations used in this study were collected in areas of high (West and South) and low (North and East) DENV transmission. Our data indicated a significant influence of the area of collection on TEs alone, but also in interaction either with the “dpe” parameter or with the “generation” parameter. However, the number of mosquito populations from each area was too low (between one and three populations) to conclude whether the geographic origin of mosquitoes affects the vector competence.

We examined whether the density of the *Wolbachia* strains wAlbA and wAlbB, naturally occurring in the *Ae. albopictus* from Reunion Island, affect vector competence and DENV-1 replication inside the mosquitoes, since *Wolbachia* have been shown to affect the replication and transmission of pathogens such as DENV, Chikungunya virus, or Zika virus in mosquito vectors [83–89]. For all examined populations, the density of the strain wAlbA was higher than that of the strain wAlbB in accordance with results described in populations from Thailand [90] and Madagascar [91]. However, other studies have reported a higher density of wAlbB strain than wAlbA in *Ae. albopictus* populations from China [41,92], Taiwan [40], Greece and Corsica [93], and Thailand [90]. We observed variations in *Wolbachia* density between populations, the FO_SG population (from the West) exhibited the lowest *Wolbachia* density, followed by the FO_SPh population (from the South), the FO_SM population (from the North), and the FO_SA population (from the East) with the highest *Wolbachia* density. We also described a variation in the quantity of DENV-1 viral RNA copies in the bodies of infected mosquitoes according to their population of origin. However, no significant correlation was observed between *Wolbachia* density and DENV-1 viral load, and no difference in *Wolbachia* density was found between IDT scores, suggesting that *Wolbachia* did not influence vector competence parameters (i.e. infection, dissemination or transmission) of *Ae. albopictus* populations exposed to DENV-1. Although it has been previously shown that the *Wolbachia* strains infecting *Ae. albopictus* can affect the vector competence towards DENV [35,40,41], this interference could depend on the mosquito populations and DENV strains.

Conclusion

Our study demonstrates that *Ae. albopictus* populations from Reunion Island are experimentally competent for transmitting the local DENV-1 epidemic strain, but not the DENV-2 strains. However, the low viral titres of DENV-2 used in the experiments suggest that these results should be interpreted with caution. We observed a significant effect of generation on vector competence

parameters, with F_0 generation exhibiting significantly lower infection rates, dissemination efficiencies and transmission efficiencies compared to F_2 generation mosquitoes. No significant correlation was found between *Wolbachia* density and either vector competence parameters or viral loads of DENV-1 in infected *Ae. albopictus* mosquitoes. Taken together, our findings highlight the importance of using natural mosquito populations and considering various parameters for enhance the understanding of DENV transmission by mosquito vectors in the field.

Acknowledgements

We thank Clément De-Graaf for his help for mosquitoes' sampling in the field. We are grateful to Alicia Lecuyer and Céline Toty for their help for mosquitoes' collections in the field and rearing in the lab.

References

1. Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, et al. Refining the global spatial limits of Dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(8):e1760.
2. Messina JP, Brady OJ, Golding N, Kraemer MUG, Wint GRW, Ray SE, et al. The current and future global distribution and population at risk of Dengue. *Nat Microbiol*. 2019;4(9):1508–15.
3. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of Dengue. *Nature*. 2013; 496(7446):504–7.
4. Centers for Disease Control and Prevention. About Dengue [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 2]. Available from: <https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html>
5. World Health Organization. Dengue and severe dengue [Internet]. 2023 [cited 2023 Oct 2]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
6. Chen R, Vasilakis N. Dengue — Quo tu et quo vadis? *Viruses*. 2011; 3(9):1562–608.
7. Vasilakis N, Weaver SC. The history and evolution of human Dengue emergence. *Adv Virus Res*. 2008; 72:1–76.
8. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of Dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 2009; 9(4):523–40.
9. Sabin AB. Research on Dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg*. 1952; 1(1):30–50.
10. Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. Secondary infection as a risk factor for Dengue hemorrhagic fever/Dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol*. 2013; 158(7):1445–59.
11. Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, et al. Antibody-dependent enhancement of severe Dengue disease in humans. *Science*. 2017; 358(6365):929–32.
12. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ. Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for Dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(5):e646.
13. Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect*. 2009; 11(14–15):1177–85.
14. Rezza G. *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. *BMC Public Health*. 2012; 12(1):72.
15. Hotta S. Dengue vector mosquitoes in Japan: the role of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in the 1942–1944 Dengue epidemics of Japanese main islands. *Med Entomol Zool*. 1999; 49(4):267–74.
16. Kobayashi D, Murota K, Fujita R, Itokawa K, Kotaki A, Moi ML, et al. Dengue virus infection in *Aedes albopictus* during the 2014 autochthonous dengue outbreak in Tokyo Metropolis, Japan. *Am J Trop Med Hyg*. 2018; 98(5):1460–8.
17. Effler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, Ayers T, et al. Dengue fever, Hawaii, 2001–2002. *Emerg Infect Dis*. 2005; 11(5):742–9.
18. Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes JM, Zeller H, et al. Outbreak of Dengue and Chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis*. 2008; 14(7):1135–7.
19. Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkoghe C, Becquart P, Grard G, et al. Concurrent Chikungunya and Dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15(4):591–3.
20. Peng HJ, Lai HB, Zhang QL, Xu BY, Zhang H, Liu WH, et al. A local outbreak of Dengue caused by an imported case in Dongguan China. *BMC Public Health*. 2012; 12(1):83.
21. Xu G, Dong H, Shi N, Liu S, Zhou A, Cheng Z, et al. An outbreak of Dengue virus serotype 1 infection in Cixi, Ningbo, People's Republic of China, 2004, associated with a traveler from Thailand and high density of *Aedes albopictus*. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 76(6):1182–8.

22. Hafsia S, Haramboure M, Wilkinson DA, Baldet T, Yemadje-Menudier L, Vincent M, et al. Overview of Dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: a systematic review. *PLoS Negl Trop Dis*. 2022; 16(7):e0010547.
23. Coulanges P, Clerc Y, Jousset FX, Rodhain F, Hannoun C. Dengue on Réunion. Isolation of a strain at the Pasteur Institute of Madagascar. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*. 1979; 72(3):205–9.
24. Boussès P, Dehecq JS, Brengues C, Fontenille D. Inventaire actualisé des moustiques (Diptera : Culicidae) de l'île de La Réunion, Océan Indien. *Bull Société Pathol Exot*. 2013; 106(2):113–25.
25. Boussès P, Le Goff G, Robert V. Inventaire des moustiques (Diptera : Culicidae) des îles du sud-ouest de l'océan Indien, Madagascar excepté — Une revue critique. *Ann Société Entomol Fr NS*. 2018; 54(2):89–110.
26. Salvan M, Mouchet J. *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* à l'île de La Réunion. *Ann Soc Belg Med Trop*. 1994; 74:323–6.
27. Delatte H, Toty C, Boyer S, Bouetard A, Bastien F, Fontenille D. Evidence of habitat structuring *Aedes albopictus* populations in Réunion Island. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(3):e2111.
28. Renault P, Balleydier E, Solet JL, Illef D, Rachou E, Larriou S, et al. A major epidemic of Chikungunya virus infection on Réunion Island, France, 2005–2006. *Am J Trop Med Hyg*. 2007; 77(4):727–31.
29. D'Ortenzio E, Balleydier E, Bavielle M, Filleul L, Renault P. Dengue à La Réunion et dans les îles du sud-ouest de l'océan Indien. *Médecine Mal Infect*. 2011; 41(9):475–9.
30. Pierre V, Thiria J, Rachou E, Sissoko D, Lassale C, Renault P. Epidémie de Dengue 1 à La Réunion en 2004 [Internet]. Poster presented at: Journées de veille sanitaire; 2005 15. Available from: https://web.archive.org/web/20180514020730id_/http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2005/jvs_2005/poster_13.pdf
31. Santé Publique France. Points Epidémiologiques - Dengue - Océan Indien [Internet]. 2021 [cited 2021 Sep 8]. Available from: <https://www.santepubliquefrance.fr/recherche/#search=dengue&themes=dengue®ions=Oc%C3%A9an%20indien>
32. Benkimoun S, Atyame C, Haramboure M, Degenne P, Thébaud H, Dehecq JS, et al. Dynamic mapping of Dengue basic reproduction number. *Results Phys*. 2021; 29:104687.
33. Tran A, Mangeas M, Demarchi M, Roux E, Degenne P, Haramboure M, et al. Complementarity of empirical and process-based approaches to modelling mosquito population dynamics with *Aedes albopictus* as an example—Application to the development of an operational mapping tool of vector populations. *PLOS ONE*. 2020; 15(1):e0227407.
34. Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux AB. Orally co-infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both Dengue and Chikungunya infectious viral particles in their saliva. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(6):e706.
35. Mousson L, Zouache K, Arias-Goeta C, Raquin V, Mavingui P, Failloux AB. The native *Wolbachia* symbionts limit transmission of Dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012; 6(12):e1989.
36. Paupy C, Girod R, Salvan M, Rodhain F, Failloux AB. Population structure of *Aedes albopictus* from La Reunion Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to a Dengue virus. *Heredity*. 2001; 87:273–83.
37. Latreille AC, Milesi P, Magalon H, Mavingui P, Atyame C. High genetic diversity but no geographical structure of *Aedes albopictus* populations in Réunion Island. *Parasit Vectors*. 2019; 12(1):597.
38. Sherpa S, Rioux D, Pougnet-Lagarde C, Desprès L. Genetic diversity and distribution differ between long-established and recently introduced populations in the invasive mosquito *Aedes albopictus*. *Infect Genet Evol*. 2018; 58:145–56.
39. Werren JH, Zhang W, Rong Guo L. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci*. 1995; 261(1360):55–63.
40. Tsai CH, Chen TH, Lin C, Shu PY, Su CL, Teng HJ. The impact of temperature and *Wolbachia* infection on vector competence of potential Dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the transmission of Dengue virus serotype 1 in southern Taiwan. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):551.
41. Wei Y, Wang J, Wei YH, Song Z, Hu K, Chen Y, et al. Vector competence for DENV-2 among *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations in China. *Front Cell Infect Microbiol*. 2021; 11:649975.
42. NASA. Snow Peak, Réunion Island; 2023 [cited 2024 Jun 2]. Database: NASA's Earth Observatory [Internet]. Available from: <https://earthobservatory.nasa.gov/images/152265/snow-peak-reunion-island>
43. Hafsia S, Barbar T, Wilkinson DA, Atyame C, Biscornet L, Bibi J, et al. Genetic characterization of Dengue virus serotype 1 circulating in Reunion Island, 2019–2021, and the Seychelles, 2015–2016. *BMC Infect Dis*. 2023; 23(1):294.
44. Pascalis H, Biscornet L, Toty C, Hafsia S, Roche M, Desprès P, et al. Complete genome sequences of Dengue virus type 2 epidemic strains from Reunion Island and the Seychelles. *Microbiol Resour Announc*. 2020; 9(4):e01443-19.
45. Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, Failloux AB. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is

- infectious as soon as two days after oral infection. PLOS ONE. 2009; 4(6):e5895.
46. Holm S. A simple sequentially rejective multiple test procedure. Scand J Stat. 1979;6(2):65–70.
 47. Fox J, Weisberg S. An R Companion to Applied Regression [Internet]. Third Edition. Sage Publications; 2019 [cited 2023 Oct 12]. Available from: <https://www.john-fox.ca/Companion/index.html>
 48. Russell V. Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.5.5.1 [Internet]. 2021. Available from: <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
 49. Scherer R. PropCIs: Various Confidence Interval Methods for Proportions [Internet]. 2013. Available from: <http://CRAN.R-project.org/package=PropCIs>
 50. Wickham H, Chang W, Henry L, Lin Pedersen T, Takahashi K, Wilke C, et al. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis [Internet]. Springer-Verlag New York. 2016. Available from: <https://ggplot2.tidyverse.org>
 51. Kassambara A. rstatix: Pipe-Friendly Framework for Basic Statistical Tests [Internet]. 2023. Available from: <https://rpkgs.datanovia.com/rstatix/>
 52. Xu S, Chen M, Feng T, Zhan L, Zhou L, Yu G. Use ggbreak to effectively utilize plotting space to deal with large datasets and outliers. Front Genet. 2021; 12:774846.
 53. Marschner I. glm2: Fitting generalized linear models with convergence problems. R J. 2011; 3/2:12–5.
 54. Chen WJ, Wei HL, Hsu EL, Chen ER. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to Dengue 1 virus on Taiwan: development of the virus in orally and parenterally infected mosquitoes. J Med Entomol. 1993; 30(3):524–30.
 55. Gratz NG. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med Vet Entomol. 2004; 18(3):215–27.
 56. Kamgang B, Vazeille M, Tedjou AN, Wilson-Bahun TA, Yougang AP, Mousson L, et al. Risk of Dengue in Central Africa: vector competence studies with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations and Dengue 2 virus. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(12):e0007985.
 57. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. Infect Genet Evol. 2019; 67:191–209.
 58. Whitehorn J, Kien DTH, Nguyen NM, Nguyen HL, Kyrylos PP, Carrington LB, et al. Comparative susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to Dengue virus infection after feeding on blood of viremic humans: implications for public health. J Infect Dis. 2015; 212(8):1182–90.
 59. Richards SL, Anderson SL, Alto BW. Vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for Dengue virus in the Florida Keys. J Med Entomol. 2012; 49(4):942–6.
 60. Guo XX, Li CX, Zhang YM, Xing D, Dong YD, Zhang HD, et al. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for the DEN2-FJ10 and DEN2-FJ11 strains of the Dengue 2 virus in Fujian, China. Acta Trop. 2016; 161:86–90.
 61. Pereira-dos-Santos T, Roiz D, Lourenço-de-Oliveira R, Paupy C. A systematic review: is *Aedes albopictus* an efficient bridge vector for zoonotic arboviruses? Pathogens. 2020; 9(4):266.
 62. Tuanudom R, Yurayart N, Tiawsirisup S. Effects of Chikungunya virus titers in blood meals on virus infection, dissemination, and transmission in Asian tiger mosquito: *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). Thai J Vet Med. 2017; 47(2):233–40.
 63. Azar SR, Weaver SC. Vector competence: what Has Zika virus taught us? Viruses. 2019; 11(9):867.
 64. Long KC, Sulca J, Bazan I, Astete H, Jaba HL, Siles C, et al. Feasibility of feeding *Aedes aegypti* mosquitoes on Dengue virus-infected human volunteers for vector competence studies in Iquitos, Peru. PLoS Negl Trop Dis. 2019; 13(2):e0007116.
 65. Guo XX, Zhu XJ, Li CX, Dong YD, Zhang YM, Xing D, et al. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for DEN2-43 and New Guinea C virus strains of Dengue 2 virus. Acta Trop. 2013; 128(3):566–70.
 66. Joanne S, Vythilingam I, Teoh BT, Leong CS, Tan KK, Wong ML, et al. Vector competence of Malaysian *Aedes albopictus* with and without *Wolbachia* to four Dengue virus serotypes. Trop Med Int Health. 2017; 22(9):1154–65.
 67. Sasaki T, Moi ML, Saito K, Isawa H, Takasaki T, Sawabe K. *Aedes albopictus* strain and Dengue virus serotype in the Dengue fever outbreaks in Japan: implications of *Wolbachia* Infection. Jpn J Infect Dis. 2022; 75(2):140–3.
 68. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, et al. Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. PLOS ONE. 2007; 2(11):e1168.
 69. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. PLOS Pathog. 2007; 3(12):e201.
 70. Gutiérrez-Barbosa H, Castañeda NY, Castellanos JE. Differential replicative fitness of the four Dengue virus serotypes circulating in Colombia in human liver Huh7 cells. Braz J Infect Dis. 2020; 24:13–24.
 71. Kramer LD, Ciota AT. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. Curr Opin Virol. 2015; 15:112–8.
 72. Tuanudom R, Yurayart N, Rodkhum C, Tiawsirisup S. Diversity of midgut microbiota in laboratory-colonized and field-collected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): a preliminary study. Heliyon. 2021; 7(10):e08259.

73. Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.* 2009; 9(1):96.
74. Hegde S, Khanipov K, Albayrak L, Golovko G, Pimenova M, Saldaña MA, et al. Microbiome interaction networks and community structure from laboratory-reared and field-collected *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* mosquito vectors. *Front Microbiol.* 2018; 10:9:2160.
75. Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni M. *Aedes spp.* and their microbiota: a review. *Front Microbiol.* 2019; 10:2036.
76. Mourya DT, Gokhale MD, Pidiyar V, Barde PV, Patole M, Mishra AC, et al. Study of the effect of the midgut bacterial flora of *Culex quinquefasciatus* on the susceptibility of mosquitoes to Japanese encephalitis virus. *Acta Virol.* 2002; 46(4):257–60.
77. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLOS Pathog.* 2009; 5(5):e1000423.
78. Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, et al. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and Dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl Trop Dis.* 2012; 6(3):e1561.
79. Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G. The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses.* 2014; 6(11):4294–313.
80. Guégan M, Zouache K, Démichel C, Minard G, Tran Van V, Potier P, et al. The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome.* 2018; 6(1):49.
81. Gao H, Cui C, Wang L, Jacobs-Lorena M, Wang S. Mosquito microbiota and implications for disease control. *Trends Parasitol.* 2020; 36(2):98–111.
82. Joyce JD, Nogueira JR, Bales AA, Pittman KE, Anderson JR. Interactions between La Crosse virus and bacteria isolated from the digestive tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2011; 48(2):389–94.
83. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell.* 2009; 139(7):1268–78.
84. Boehm EC, Jaeger AS, Ries HJ, Castañeda D, Weiler AM, Valencia CC, et al. *Wolbachia*-mediated resistance to Zika virus infection in *Aedes aegypti* is dominated by diverse transcriptional regulation and weak evolutionary pressures. *PLoS Negl Trop Dis.* 2023; 17(10):e0011674.
85. Johnson K. The impact of *Wolbachia* on virus infection in mosquitoes. *Viruses.* 2015; 7(11):5705–17.
86. Caragata EP, Dutra HLC, Moreira LA. Exploiting intimate relationships: controlling mosquito-transmitted disease with *Wolbachia*. *Trends Parasitol.* 2016; 32(3):207–18.
87. Ogunlade ST, Meehan MT, Adekunle AI, Rojas DP, Adegboye OA, McBryde ES. A review: *Aedes*-borne arboviral infections, controls and *Wolbachia*-based strategies. *Vaccines.* 2021; 9(1):32.
88. Pimentel AC, Cesar CS, Martins M, Cogni R. The antiviral effects of the symbiont bacteria *Wolbachia* in insects. *Front Immunol.* 2021; 11:626329.
89. Reyes JIL, Suzuki Y, Carvajal T, Muñoz MNM, Watanabe K. Intracellular interactions between arboviruses and *Wolbachia* in *Aedes aegypti*. *Front Cell Infect Microbiol.* 2021; 11:690087.
90. Ahantariq A, Trinachartvanit W, Kittayapong P. Relative *Wolbachia* density of field-collected *Aedes albopictus* mosquitoes in Thailand. *J Vector Ecol.* 2008; 33(1):173–7.
91. Zouache K, Raharimalala FN, Raquin V, Tran-Van V, Raveloson LHR, Ravelonandro P, et al. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol.* 2011; 75(3):377–89.
92. Hu Y, Xi Z, Liu X, Wang J, Guo Y, Ren D, et al. Identification and molecular characterization of *Wolbachia* strains in natural populations of *Aedes albopictus* in China. *Parasit Vectors.* 2020; 13(1):28.
93. Tortosa P, Charlat S, Labbé P, Dehecq JS, Barré H, Weill M. *Wolbachia* age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: a host evolutionary response to cytoplasmic incompatibility? *PLOS ONE.* 2010; 5(3):e9700.

Supporting information

S1 Table. Number of mosquitoes tested in each vector competence parameter to examine IDT scores. The IDT (Infection, Dissemination, Transmission) score (0, 1, 2 or 3) was defined as follows: the IDT score 0 for mosquitoes with no infectious DENV-1 particles either in the body, head or saliva; the IDT score 1 for samples with only infected bodies; the IDT score 2 for mosquitoes with infectious particles in the bodies and the heads; and the IDT score 3 for mosquitoes with infectious DENV-1 particles in the bodies, heads and saliva. These categories were defined using mosquitoes exposed to DENV-1 and collected 21 and 28 dpe.

Mosquitoes were from four populations: F0_SM (Sainte-Marie), F0_SG (Saint-Gilles les Hauts), F0_SP (Saint-Philippe) and F0_SA (Saint-André).

IDT score	21 dpe				28 dpe				Total
	F0_SM	F0_SG	F0_SPh	F0_SA	F0_SM	F0_SG	F0_SPh	F0_SA	
0	3	3	3	3	2	3	3	3	23
1	1	2	3	1	0	3	1	1	12
2	3	4	3	3	3	3	2	0	21
3	3	2	1	3	3	3	3	1	19
Total	10	11	10	10	8	12	9	5	75

S2 Table. Vector competence parameters of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* populations exposed to the DENV-2_JUL strain. Infection rates (IR), dissemination efficiencies (DE), and transmission efficiencies (TE) were examined at 14 and 21 days post-exposure (dpe) to an infectious blood meal. IR = number of infected bodies among the mosquitoes tested (%); DE = number of infected heads among the mosquitoes tested (%); TE = number of infected saliva among the mosquitoes tested (%). The numbers in brackets correspond to the 95% confidence interval, and the numbers in parentheses represent the number of positive samples out of the total number of samples tested. ND = not done. F1_SPa, F1_SL and F1_LP correspond to *Ae. albopictus* populations and F31_Aeg is the *Ae. aegypti* population.

Population	14 dpe			21 dpe		
	IR	DE	TE	IR	DE	TE
F1_SPa	11.76% [3.29 - 34.34%] (2/17)	0.00% [0.00 - 18.43%] (0/17)	0.00% [0.00 - 18.43%] (0/17)	ND	ND	ND
F1_SL	9.09% [2.53 - 27.81%] (2/22)	0.00% [0.00 - 14.87%] (0/22)	0.00% [0.00 - 14.87%] (0/22)	ND	ND	ND
F1_LP	5.88% [1.05 - 26.98%] (1/17)	0.00% [0.00 - 18.43%] (0/17)	0.00% [0.00 - 18.43%] (0/17)	ND	ND	ND
F31_Aeg	9.38% [3.24 - 24.22%] (3/32)	0.00% [0.00 - 10.72%] (0/32)	0.00% [0.00 - 10.72%] (0/32)	8.82% [3.05 - 22.96%] (3/34)	0.00% [0.00 - 10.15%] (0/34)	0.00% [0.00 - 10.15%] (0/34)

S3 Table. Vector competence parameters of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* populations exposed to the DENV-2_EVAg strain. Infection rates (IR), dissemination efficiencies (DE), and transmission efficiencies (TE) were examined at 14, 21, and 28 days post-exposure (dpe) to an infectious blood meal. IR = number of infected bodies among the mosquitoes tested (%); DE = number of infected heads among the mosquitoes tested (%); TE = number of infected saliva among the mosquitoes tested (%). The numbers in brackets correspond to the 95% confidence interval, and the numbers in parentheses represent the number of positive samples out of the total number of samples tested. ND = not done. F0_SM, F0_SA, F0_SG and F0_SPh correspond to *Ae. albopictus* populations and F31_Aeg is the *Ae. aegypti* population.

Population	14 dpe			21 dpe			28 dpe		
	IR	DE	TE	IR	DE	TE	IR	DE	TE
F0_SM	2.08% [0.37 - 10.90%] (1/48)	0.00% [0.00 - 7.41%] (0/48)							
F0_SA	2.08% [0.37 - 10.90%] (1/48)	0.00% [0.00 - 7.41%] (0/48)							

F0_SG	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0.00 % [0.00 - 43.45%] (0/5)	0.00 % [0.00 - 43.45%] (0/5)	0.00 % [0.00 - 43.45%] (0/5)
F0_SPh	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25.00% [10.18 - 49.50%] (4/16)	0.00 % [0.00 - 19.36%] (0/16)	0.00 % [0.00 - 19.36%] (0/16)
F31_Aeg	8.57% [2.96 - 22.38%] (3/35)	2.86% [0.51 - 14.53%] (1/35)	0.00% [0.00 - 9.89%] (0/35)	ND	ND	ND	ND	ND	ND

S4 Table. Pairwise proportion tests between the vector competence parameters of *Aedes albopictus* populations after exposure to the DENV-1 strain. All dpe were tested independently. The comparison of the vector competence parameters (IR, DE, or TE) were performed with pairwise proportion comparison tests for each parameter and each dpe independently. The numbers in brackets correspond to the 95% confidence interval, and the numbers in parentheses represent the number of positive samples out of the total number of samples tested. Only comparisons with a significant difference ($P < 0.05$) are presented in the table.

Variable	Day post-exposure	Population 1		Population 2		p-value<0.05 pairwise proportion test
		Population code	Variable value	Population code	Variable value	
IR	14 dpe	F2_BP	64.58% [50.44 - 76.57%] (31/48)	F0_SG	9.38% [3.24 - 24.22%] (3/32)	6.55E-05
				F0_SPh	15.63% [6.86 - 31.75%] (5/32)	9.35E-04
		F2_TB	54.17% [40.29 - 67.42%] (26/48)	F0_SG	9.38% [3.24 - 24.22%] (3/32)	2.53E-03
				F0_SPh	15.63% [6.86 - 31.75%] (5/32)	2.58E-02
	21 dpe	F2_BP	68.75% [54.67 - 80.05%] (33/48)	F0_SA	18.75% [10.19 - 31.94%] (9/48)	4.67E-05
				F0_SM	27.08% [16.57 - 41.00%] (13/48)	2.18E-03
	F2_SC	52.63% [37.26 - 67.52%] (20/38)	F0_SA	18.75% [10.19 - 31.94%] (9/48)	4.48E-02	
			28 dpe	F2_BP	57.14% [45.48 - 68.06%] (40/70)	F0_SA
	F0_SM	20.83% [11.73 - 34.26%] (10/48)				2.86E-03
	F0_SPh	14.58% [7.25 - 27.17%] (7/48)				1.30E-04
	F0_SA	9.38% [3.24 - 24.22%] (3/32)				1.03E-06
	F0_SM	20.83% [11.73 - 34.26%] (10/48)				9.64E-06
F0_SPh	14.58% [7.25 - 27.17%] (7/48)	2.24E-07				
DE	21 dpe	F2_BP	64.58% [50.44 - 76.57%] (31/48)	F0_SA	16.67% [8.70 - 29.58%] (8/48)	1.01E-04
				F0_SM	25.00% [14.92 - 38.78%] (12/48)	4.63E-03
				F0_SPh	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	1.01E-05
				F0_SG	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	1.01E-05
	F2_TB	45.83% [32.58 - 59.71%] (22/48)	F0_SPh	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	1.59E-02	
			F0_SG	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	1.59E-02	
	28 dpe	F2_BP	55.71% [44.08 - 66.75%] (39/70)	F0_SA	6.25% [1.73 - 20.15%] (2/32)	9.72E-05
				F0_SM	20.83% [11.73 - 34.26%] (10/48)	5.02E-03
				F0_SPh	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	7.87E-05
				F0_SG	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)	7.87E-05
F2_TB	67.11% [55.94 - 76.62%] (51/76)	F0_SA	6.25% [1.73 - 20.15%] (2/32)	3.91E-07		
		F0_SM	20.83% [11.73 - 34.26%] (10/48)	1.99E-05		

				F0_SPh	12.50%	[5.86 - 24.70%]	(6/48)	1.28E-07
				F0_SG	12.50%	[5.86 - 24.70%]	(6/48)	1.28E-07
TE	21 dpe	F2_BP	35.42% [23.43 - 49.56%] (17/48)	F0_SPh	2.08%	[0.37 - 10.90%]	(1/48)	1.84E-03
				F0_SG	4.17%	[1.15 - 13.98%]	(2/48)	7.04E-03
	28 dpe	F2_BP	32.86% [23.00 - 44.50%] (23/70)	F0_SA	3.13%	[0.55 - 15.74%]	(1/32)	3.63E-02
				F0_SG	6.25%	[2.15 - 16.84%]	(3/48)	2.06E-02
		F2_TB	40.79% [30.44 - 52.02%] (31/76)	F0_SA	3.13%	[0.55 - 15.74%]	(1/32)	3.45E-03
				F0_SM	12.50%	[5.86 - 24.70%]	(6/48)	2.43E-02
				F0_SPh	8.33%	[3.29 - 19.55%]	(4/48)	3.15E-03
				F0_SG	6.25%	[2.15 - 16.84%]	(3/48)	9.79E-04

S5 Table. Vector competence parameters of two *Aedes albopictus* populations collected in the same locality (Sainte-Marie) at two different times of the year and exposed to the DENV-1 strain. Infection rates (IR), dissemination efficiencies (DE), and transmission efficiencies (TE) were examined at 14, 21, and 28 days post-exposure (dpe) to an infectious blood meal. IR = number of infected bodies among the mosquitoes tested (%); DE = number of infected heads among the mosquitoes tested (%); TE = number of infected saliva among the mosquitoes tested (%). The numbers in brackets correspond to the 95% confidence interval, and the numbers in parentheses represent the number of positive samples out of the total number of samples tested. ND = not done. F0_SM and F0_SM-bis correspond to *Ae. albopictus* populations of Sainte-Marie collected on the field in April and May 2021, respectively.

Population	14 dpe			21 dpe			28 dpe		
	IR	DE	TE	IR	DE	TE	IR	DE	TE
F0_SM	28.13% [15.56 - 45.37%] (9/32)	3.13% [0.55 - 15.74%] (1/32)	3.13% [0.55 - 15.74%] (1/32)	27.08% [16.57 - 41.00%] (13/48)	25.00% [14.92 - 38.78%] (12/48)	14.58% [7.25 - 27.17%] (7/48)	20.83% [11.73 - 34.26%] (10/48)	20.83% [11.73 - 34.26%] (10/48)	12.50% [5.86 - 24.70%] (6/48)
F0_SM-bis	25.00% [12.00 - 44.90%] (6/24)	0.00% [0.00 - 13.80%] (0/24)	0.00% [0.00 - 13.80%] (0/24)	25.00% [12.00 - 44.90%] (6/24)	12.50% [4.34 - 31.00%] (3/24)	8.33% [2.32 - 25.85%] (2/24)	26.92% [13.70 - 46.08%] (7/26)	15.38% [6.15 - 33.53%] (4/26)	3.85% [0.68 - 18.89%] (1/26)

S6 Table. Densities of *Wolbachia* wAlbA and wAlbB strains in the bodies of *Aedes albopictus* mosquitoes from different populations after exposure to DENV-1 strain. The mosquitoes of F₀ generation, belonging to the populations of Sainte-Marie (F0_SM), Saint-Gilles les Hauts (F0_SG), Saint-Philippe (F0_SPh) and Saint-André (F0_SA), were examined at 21 and 28 days after being exposed to infectious blood meals containing the DENV-1 strain. In this table N = number of mosquitoes tested; 95% CI, 95% confidence interval. wAlbTot = wAlbA + wAlbB.

Population	wAlbA		wAlbB		wAlbTot	
	median	95% CI median	median	95% CI median	median	95% CI median
F0_SM (N=18)	4.75	2.20 - 11.22	1.95	1.40 - 2.30	6.60	4.20 - 12.94
F0_SG (N=23)	2.20	0.70 - 2.70	0.45	0.27 - 0.80	2.60	1.22 - 3.30
F0_SPh (N=19)	4.00	2.50 - 7.79	0.40	0.23 - 0.60	4.81	2.80 - 8.11
F0_SA (N=15)	9.00	3.90 - 24.80	1.80	1.00 - 4.70	12.80	6.91 - 26.90

S7 Table. Densities of *Wolbachia* wAlbA and wAlbB strains in the bodies of *Aedes albopictus* mosquitoes according

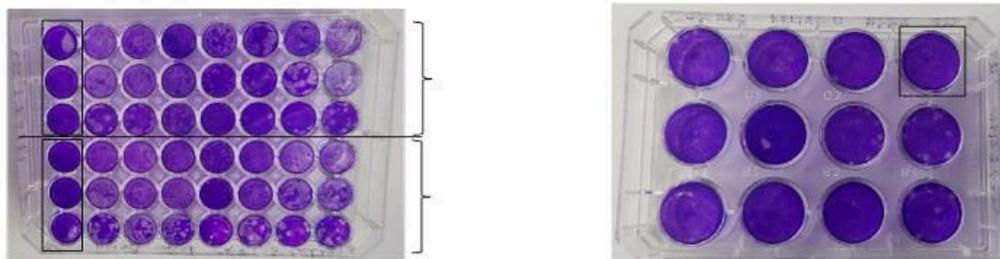
to IDT scores. The mosquitoes of F_0 generation, belonging to the populations of Sainte-Marie (FO_SM), Saint-Gilles les Hauts (FO_SG), Saint-Philippe (FO_SPh) and Saint-André (FO_SA) and examined at 21 and 28 days after being exposed to infectious blood meals containing the DENV-1 strain, were pooled according to their IDT scores (0, 1, 2 or 3). IDT scores are defined as follows: IDT score 0 for mosquitoes with no infectious DENV-1 particles either in the body, head or saliva; the IDT score 1 for samples with only infected bodies; the IDT score 2 for mosquitoes with infectious particles in the bodies and the heads; and the IDT score 3 for mosquitoes with infectious DENV-1 particles in the bodies, heads and saliva. In this table: N, number of mosquitoes tested; 95% CI, 95% confidence interval.

Score IDT	wAlbA		wAlbB		wAlbTot	
	median	95% CI median	median	95% CI median	median	95% CI median
IDT 0 (N=23)	3.70	2.30 - 10.04	1.00	0.48 - 1.75	4.18	2.80 - 11.88
IDT 1 (N=12)	3.95	0.60 - 7.79	0.31	0.20 - 0.97	5.61	0.74 - 9.90
IDT 2 (N=21)	5.48	2.60 - 11.22	1.72	0.50 - 2.10	6.90	4.81 - 12.94
IDT 3 (N=19)	2.95	2.07 - 6.26	0.80	0.40 - 1.54	4.40	2.60 - 7.20
IDT 1+2+3 (N=52)	4.20	2.60 - 6.11	0.80	0.50 - 1.40	5.72	4.20 - 7.50
IDT 2+3 (N=40)	4.41	2.60 - 6.20	0.86	0.60 - 1.80	5.72	4.20 - 7.70

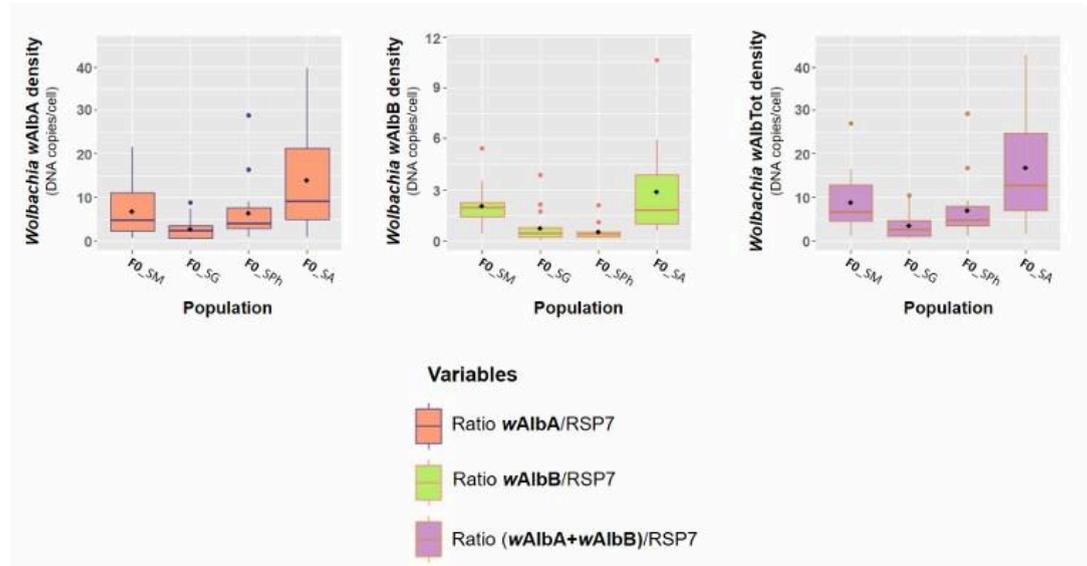
S8 Table. The number of DENV-1 RNA copies in the bodies of mosquitoes from Reunion Island previously exposed to a DENV-1 local strain. The mosquitoes of F_0 generation, belonging to the populations of Sainte-Marie (FO_SM), Saint-Gilles les Hauts (FO_SG), Saint-Philippe (FO_SPh), or Saint-André (FO_SA) and examined at 21 and 28 days post-exposure (dpe) to infectious blood meals containing the DENV-1 local strain. In this table: N, number of mosquitoes tested; sd, standard deviation; 95% CI, 95% confidence interval; med = median.

Population	number of DENV-1 RNA copies				
	mean	sd	95% CI mean	med	95% CI med
FO_SM (N=12)	1.60×10^7	1.09×10^7	$9.09 \times 10^6 - 2.30 \times 10^7$	1.36×10^7	$6.78 \times 10^6 - 2.60 \times 10^7$
FO_SG (N=13)	2.90×10^7	3.92×10^7	$5.32 \times 10^6 - 5.28 \times 10^7$	1.40×10^7	$3.41 \times 10^6 - 4.01 \times 10^7$
FO_SPh (N=9)	3.95×10^5	3.69×10^5	$1.11 \times 10^5 - 6.78 \times 10^5$	2.72×10^5	$5.05 \times 10^4 - 7.71 \times 10^5$
FO_SA (N=9)	9.58×10^6	9.20×10^6	$2.51 \times 10^6 - 1.66 \times 10^7$	4.89×10^6	$3.28 \times 10^6 - 1.46 \times 10^7$

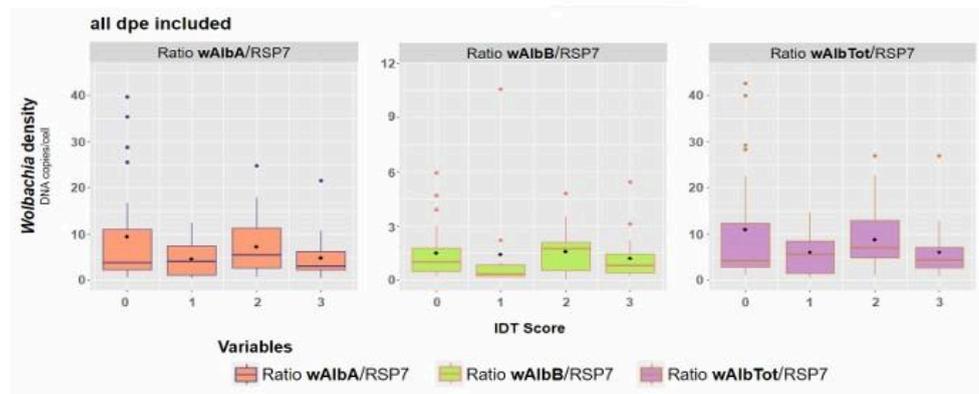
S1 Fig. Examples of Plaque-Forming Units (PFU) assays of mosquito samples (A, bodies and heads; B, saliva) from the FO_SM population infected with the DENV-1 strain. For bodies and heads, tenfold serial dilutions (-1 to -3) from each specimen were performed. Monolayers of Vero cells in 48 -well plates (for bodies and heads) or 12_well plates (for saliva) were infected, incubated for 2 h at 37°C with 5% CO₂ incubator. After 5 days of incubation, plates were fixed and stained with crystal violet. Number 1, 2, 5, 9, 24, 35 and 37 correspond to samples. Numbers corresponding to positive saliva (5, 9 and 24) are in yellow.



S2 Fig. Densities of *Wolbachia* wAlbA and wAlbB strains in the bodies in *Aedes albopictus* mosquitoes from Reunion Island. The mosquitoes of F₀ generation from four populations (N=75) namely Sainte-Marie (FO_SM), Saint-Gilles les Hauts (FO_SG), Saint-Philippe (FO_SPh) and Saint-André (FO_SA) were tested for their *Wolbachia* densities after being exposed to infectious blood meals containing the DENV-1 strain. For each sample, the value provided corresponds to the mean of a triplicate measure. The densities of *Wolbachia* wAlbA (orange), or wAlbB (green), or wAlbTot (wAlbA + wAlbB) (violet), are given based on the ratio between the *Wolbachia* and RSP7 concentrations which provided the number of *Wolbachia* genomes relative to the *Ae. albopictus* genomes. dpe = days post-exposure.



S3 Fig. Densities of *Wolbachia* wAlbA and wAlbB strains in the bodies of *Aedes albopictus* mosquitoes according to vector competence parameters represented by IDT scores. These analyses were performed using individual mosquito of F₀ generation, belonging to the populations of Sainte-Marie (FO_SM), Saint-Gilles les Hauts (FO_SG), Saint-Philippe (FO_SPh), or Saint-André (FO_SA) and examined at 21 and 28 days after being exposed to infectious blood meals containing the DENV-1 strain. The densities of *Wolbachia* wAlbA (orange), or wAlbB (green), or wAlbTot (wAlbA + wAlbB) (violet) are given based on the ratio between the *Wolbachia* and RSP7 concentrations which provided the number of *Wolbachia* genomes relative to the *Ae. albopictus* genomes. We measured the density of *Wolbachia* in individuals (N=75) classified according to their IDT scores (0, 1, 2 or 3) defined as follows: the IDT score 0 for mosquitoes with no infectious DENV-1 particles either in the body, head or saliva; the IDT score 1 for samples with only infected bodies; the IDT score 2 for mosquitoes with infectious particles in the bodies and the heads; and the IDT score 3 for mosquitoes with infectious DENV-1 particles in the bodies, heads and saliva. dpe = days post-exposure.



2.4. Discussion et perspectives

Ce travail a permis de mettre expérimentalement en évidence l'ouverture du filtre de compatibilité entre les *Ae. albopictus* de La Réunion et le DENV-1 et ce, malgré la bi-infection naturelle des vecteurs par *Wolbachia*. Cependant, il est à noter que l'ouverture de ce filtre est loin d'être totale avec des taux d'efficacité de la transmission du DENV-1 s'étendant de 0,00 à 9.38% 14 jours post-exposition (jpe), de 2,08 à 14,58% à 21 jpe et de 3,13 à 12,50% à 28 jpe pour les populations de terrain de génération F0 (seules ces populations ont été testées pour la densité en *Wolbachia*). Ces résultats sont en accord avec l'efficacité de la transmission vis-à-vis du DENV-1 de 8% à 14 jpe des *Ae. albopictus* en Floride (Richards et al. 2012), et même de 6.25% entre 7 et 10 jpe pour les *Ae. albopictus* de façon globale (Pereira-dos-Santos et al. 2020). De plus, aucune différence statistiquement significative de compétence vectorielle entre populations qui aurait pu expliquer l'hétérogénéité spatiale de l'incidence de la dengue observée à La Réunion n'a été révélée lors de cette étude. *Wolbachia* n'a pas montré d'influence significative sur les paramètres de compétence vectorielle des *Ae. albopictus* vis-à-vis du DENV-1, comme observé par ailleurs (Joanne et al. 2017). Ceci ne signifie pour autant que *Wolbachia* n'a aucune influence, mais plutôt si elle existe, cette influence est la même pour toutes les populations. L'hétérogénéité de la densité en *Wolbachia* observée entre les populations vectrices de génération F0, bien que significativement différente, ne paraît donc pas suffisante pour avoir différents effets sur la compétence vectorielle des *Ae. albopictus* réunionnais vis-à-vis du DENV-1, contrairement à ce qui a été observé en Chine avec le DENV-2 (Wei et al. 2021). En revanche, il est fort probable que la bi-infection par *Wolbachia* en elle-même ait un effet sur la compétence vectorielle, comme cela a été montré par les différences de compétence vectorielle observées entre populations vectrices d'*Ae. albopictus* naturellement infectées ou curées de leur *Wolbachia* à La Réunion (Mousson et al. 2012), ou encore à Taïwan (Tsai et al. 2017). Par ailleurs, il serait intéressant de vérifier s'il existe un seuil de densité en *Wolbachia* à partir duquel un effet sur la compétence vectorielle est observé, les individus/populations étant en dessous de ce seuil pouvant alors masquer l'effet de *Wolbachia* de ceux au dessus du seuil si l'échantillonnage est insuffisant. A l'inverse, les populations de génération F0 ont présenté des densités en *Wolbachia* significativement différentes entre elles, avec la plus forte densité à l'Est, suivie par celle du Nord, puis par celles du Sud et de l'Ouest. De façon très intéressante, cette hétérogénéité spatiale est l'exact opposé de celle observée pour l'incidence de la dengue à La Réunion, les plus fortes incidences ayant été enregistrées à l'Ouest et au Sud, et les plus faibles à l'Est. Il serait intéressant de reprendre ces expérimentations concernant l'interaction entre *Wolbachia* et DENV au sein des *Ae. albopictus* de La Réunion en augmentant le nombre de populations sélectionnées par zone géographique de l'île (quartiers à forte ou faible circulation de la dengue, De Santis et al. 2023) et le nombre d'échantillons testés pour chaque population. Cela permettrait de vérifier si la concordance observée entre densité en *Wolbachia* et incidence de la dengue est uniquement due au hasard, tout en réduisant l'importante variabilité inter-individuelle en densité de *Wolbachia* observée au sein de chacune des populations. En effet, même si aucun lien n'a été montré dans notre étude entre densité de *Wolbachia* et compétence vectorielle des *Ae. albopictus* quant à la transmission du DENV à La Réunion, il n'en reste pas moins que

les deux microorganismes sont en étroite association au sein de ces vecteurs (Mousson et al. 2012). La bactérie endosymbiotique *Wolbachia* pourrait donc avoir d'autres influences sur le pathosystème vectoriel que la modification de la compétence vectorielle (i.e. modifications d'autres paramètres de la capacité vectorielle), ou encore modifier la compétence vectorielle mais de la même façon pour toutes les populations de La Réunion comme suggéré ci-dessus. Afin de vérifier cela, la première étape serait de comprendre le rôle des modulations immunitaires et métaboliques médiées par les deux micro-organismes au sein des *Ae. albopictus* de La Réunion sur les interactions tripartites s'y déroulant. Dans un premier temps, il s'agirait d'étudier les interactions entre *Wolbachia*, DENV et vecteur à l'aide d'études de dual-transcriptomiques à haut débit au sein des différentes populations de terrain d'*Ae. albopictus* de génération FO possédant des densités en *Wolbachia* différentes. Et, afin d'observer l'interaction bipartite DENV x vecteur, des lignées de laboratoire d'*Ae. albopictus* pourraient être ajoutées comme contrôle, une possédant la bi-infection naturelle par *Wolbachia* et son dérivé asymptotique. Cette étape permettrait de comprendre par quel moyen et dans quelle mesure les trois acteurs interagissent entre eux, et quel est l'effet de la différence de densité en *Wolbachia* observée entre les populations vectrices de l'île sur ces interactions. La seconde partie serait ensuite d'observer l'effet de ces interactions, et donc l'effet de la bi-infection naturelle par *Wolbachia*, sur l'évolution des populations virales de DENV et les conséquences sur la transmission de la dengue. Le but de cette partie serait de déterminer le rôle potentiel de *Wolbachia* en tant que pression de sélection s'exerçant sur le DENV au sein du vecteur *Ae. albopictus* en observant l'évolution du génome viral en fonction de la présence ou non de la bactérie. Pour ce faire, une étude *in vivo* pourrait être réalisée en s'appuyant sur les insectarium et animalerie de biosécurité de niveau 3 du PLATeau d'INfectiologie de l'Océan Indien. Cette étude consisterait en des cycles parasitaires successifs alternant entre modèles murins et vecteurs *Ae. albopictus* infectés ou non par *Wolbachia* en choisissant des lignées de laboratoire limitant ainsi les variations génétiques ou microbiologiques inter-individuelles retrouvées chez les moustiques de terrain (Minard et al. 2018; Latreille et al. 2019). A chaque changement d'hôte (moustique ou murin), les populations virales présentes dans l'hôte précédent seraient caractérisées moléculairement et comparées entre modalités (i.e. moustiques infectés ou non par *Wolbachia*) afin d'observer si la présence de *Wolbachia* influence l'évolution des populations virales. De plus, ces échantillons pourraient être utilisés pour réaliser des études comparatives de dynamique d'infection *in cellulo* permettant ainsi de lier évolution des populations virales et phénotypes viraux.

Un autre résultat important de notre étude est la différence de compétence vectorielle des populations d'*Ae. albopictus* face au DENV-1 en fonction du nombre de générations passées en élevage au laboratoire. Comme expliqué dans la synthèse bibliographique, les interactions entre le génotype du moustique et celui de la souche virale sont d'une grande importance dans la détermination des résultats de la compétence vectorielle (Lambrechts et al. 2009; Fansiri et al. 2013; Guo et al. 2013; Kramer and Ciota 2015; Quintero-Gil et al. 2018; Wei et al. 2021). Or, l'élevage en laboratoire sur plusieurs générations modifie la diversité génétique et phénotypique des populations naturelles de diptères (Briscoe et al. 1992; Lainhart et al. 2015; Ross et al. 2019), induisant potentiellement

des biais dans les résultats de compétence vectorielle. Ces modifications peuvent apparaître très rapidement, puisque comme nous l'avons montré dans notre étude, deux générations d'élevage au laboratoire ont suffi à avoir un effet significatif sur les résultats de compétence vectorielle des moustiques. De la même façon, Armstrong et Rico-Hesse avaient précédemment montré qu'une population d'*Ae. aegypti* de génération F4 avait une susceptibilité plus importante face à différentes souches de DENV qu'une population de génération F2 provenant de la même localité (Armstrong and Rico-Hesse 2001; Armstrong and Rico-Hesse 2003). Cependant, ces deux populations (F2 et F4) ont été collectées à deux ans d'intervalle, laissant le doute sur la possibilité d'un background génétique différent (Armstrong and Rico-Hesse 2003). Pour nos travaux, les populations de générations différentes n'ont pas été collectées dans les mêmes localités. De ce fait, pour valider l'effet des générations décrites par les deux études, il faudrait collecter une population à un endroit donné et à un temps donné, puis décliner les expérimentations de compétence vectorielle sur les différentes générations issues de cette unique population élevée en insectarium.

Comme discuté dans l'article, l'élevage en laboratoire sur plusieurs générations peut aussi avoir un impact sur le microbiote du vecteur, notamment en réduisant sa diversité ou en modifiant sa composition (Rani et al. 2009; Hegde et al. 2018; Tuanudom et al. 2021), modifiant ainsi les variations naturelles entre les populations d'une espèce et même entre les individus d'une population (Osei-Poku et al. 2012; Minard et al. 2015; Minard et al. 2017; Seabourn et al. 2020). Ce microbiote pouvant influencer les résultats de compétence vectorielle (Mourya et al. 2002; Dong et al. 2009; Joyce et al. 2011; Cirimotich, Dong, et al. 2011; Cirimotich, Ramirez, et al. 2011; Ramirez et al. 2012; Bolling et al. 2012; Charan et al. 2013; Tchioffo et al. 2013; Dennison et al. 2014; Jupatanakul et al. 2014; Kramer and Ciota 2015; Linenberg et al. 2016; Dickson et al. 2017; Guégan et al. 2018; Scolari et al. 2019; Souza-Neto et al. 2019; Azar and Weaver 2019; Gao et al. 2020; Ferreira et al. 2023). Une perte de la variabilité du microbiote entre populations vectrices peut se traduire par une perte de la variabilité de compétence vectorielle entre ces populations. En effet, *Wolbachia* n'est pas la seule bactérie d'intérêt chez les moustiques vecteurs du genre *Aedes spp.* (Scolari et al. 2019), et donc n'est pas la seule qui devrait être prise en considération dans les expériences de compétence vectorielle. Par exemple, certaines bactéries du microbiote des *Ae. aegypti* ont montré intervenir dans leur interaction avec le DENV-2, notamment la bactérie *Serratia odorifera* qui augmente la susceptibilité des vecteurs face à l'infection virale (Apte-Deshpande et al. 2012). A l'inverse, les bactéries *Proteus sp.* et *Paenibacillus sp.* réduisent cette susceptibilité (Ramirez et al. 2012). La bactérie *Chromobacterium sp.*, quant à elle, induit une inhibition de la réplication du virus chez ces mêmes vecteurs (Saraiva et al. 2018). D'autres bactéries, comme *Pseudomonas rhodesiae* ou *Enterobacter ludwigii*, ont montré une capacité inhibitrice du virus de La Crosse lors de tests de co-infections *in vitro* (i.e. par une de ces bactéries et le virus) sur cellules Véro (Joyce et al. 2011), nécessitant des études complémentaires *in insecta* pour connaître leurs effets sur ce virus et d'autres arbovirus d'intérêt au sein des vecteurs.

De plus, les virus spécifiques des moustiques participent eux aussi à l'holobionte vecteur, et devraient de ce fait ne pas être négligés dans les études de compétence vectorielle vis-à-vis des arbovirus (Agboli et al. 2019). Parmi eux peuvent être cités le

Nhumirim virus qui inhibe la réplication virale du DENV-2 et du ZIKV dans des cellules d'*Ae. albopictus* (Romo et al. 2018), le virus de l'agent de fusion cellulaire et le virus de type Phasi charoen dont la co-infection des cellules d'*Ae. albopictus* induit une inhibition de la réplication virale du DENV-2 (Schultz et al. 2018), du ZIKV et du virus de La Crosse, ou encore les densovirus spécifiques des *Ae. albopictus* qui induisent une diminution de la sévérité du DENV-2 au sein des lignées cellulaires infectées de façon permanente par ces densovirus (Burivong et al. 2004).

Préserver la structuration de l'holobionte des moustiques vecteurs en réduisant le nombre de générations d'élevage en insectarium est donc une façon de rester au plus proche de la réalité de terrain. Le nombre de génération passée au laboratoire n'est pas l'unique paramètre des protocoles expérimentaux pouvant influencer les résultats de compétence vectorielle. La composition, la quantité, et la fréquence des ressources alimentaires disponibles ou fournies aux larves et aux adultes peuvent également avoir un effet sur la compétence vectorielle des moustiques adultes. Les caractéristiques biotiques et abiotiques des gîtes larvaires ainsi que les ressources alimentaires qui y sont disponibles pour les larves peuvent notamment impacter le microbiote et les traits d'histoire de vie des adultes, se répercutant parfois sur leur compétence vectorielle (Vantaux et al. 2016; Dickson et al. 2017; Moltini-Conclois et al. 2018). Une amélioration potentielle des protocoles expérimentaux pourrait donc être d'élever les larves en insectarium en conservant l'eau du gîte à partir duquel elles ont été collectées, avant d'utiliser les adultes de la F0 pour les études de compétence vectorielle. Il a aussi été montré que la succession des repas de sang (infectieux puis non infectieux) augmentait la compétence vectorielle des moustiques au sein de certains pathosystèmes vectoriels (Armstrong et al. 2020; Brackney et al. 2021; Veronesi et al. 2023), comme celle des moustiques *Ae. aegypti* vis-à-vis du DENV par exemple en induisant une dégradation temporaire de la paroi intestinale permettant au DENV de franchir cette première barrière plus facilement (Johnson et al. 2023). Il serait donc intéressant de réaliser des enquêtes entomologiques permettant de déterminer les comportements des femelles *Ae. albopictus* de La Réunion quant aux repas sanguins, comme suggéré par ailleurs (Talyuli et al. 2021), et d'essayer de retranscrire cela au mieux lors des expérimentations de compétence vectorielle en ajustant les caractéristiques des repas sanguins (nombre, infectieux ou non, complets ou non). L'effet de la température sur les traits d'histoire de vie des *Ae. albopictus* et sur leurs paramètres de compétence vectorielle à transmettre le DENV, est également à prendre en considération. Ces effets ont d'ailleurs été décrits de façon extensive dans la littérature (Delatte et al. 2009; Richards et al. 2012; Xiao et al. 2014; Mordecai et al. 2017; Tsai et al. 2017; Liu et al. 2017; Mercier et al. 2022; Delrieu et al. 2023). Un exemple intéressant est l'augmentation des paramètres de compétence vectorielle des *Ae. albopictus* vis-à-vis du DENV en parallèle de l'augmentation de la température, paramètres qui atteignent un optimum à 31°C avant de diminuer de nouveau (Xiao et al. 2014). Un autre exemple est l'augmentation de neuf jours de la durée de la période d'incubation extrinsèque (PIE) du DENV chez ses espèces vectrices lorsque la température passe de 30 à 25°C (Chan and Johansson 2012). Pour ces effets multiples sur le pathosystème vectoriel, la température peut être un facteur prédictif de risque d'émergence épidémique du DENV, comme cela a d'ailleurs été montré à La Réunion (DiSera et al. 2020; Hafsia et al.

2022). De ce fait, si l'objectif de l'expérimentation est de questionner la compétence vectorielle des populations de moustiques de terrain à transmettre le DENV, la température devrait être choisie en fonction des moyennes annuelles observées sur le terrain en saison épidémique. Pour notre part, la température choisie pour l'étude était de 27°C, ce qui correspond globalement aux températures des saisons épidémiques de la dengue à La Réunion (DiSera et al. 2020). Nous pouvons donc supposer que cela représente plutôt bien la réalité de terrain. Notre étude n'a pas été conceptualisée pour déterminer la PIE. Cependant, voir que les *Ae. albopictus* de génération F0 pouvaient transmettre le DENV-1 à 14 ou 21 jpe, dépendamment des populations, semble indiquer des PIE contrastées et dont certaines pourraient être relativement longues, tout en restant cohérent avec des études précédentes (Gloria-Soria et al. 2020; Mercier et al. 2022). Les expérimentations de compétence vectorielle peuvent aider à alerter les autorités sanitaires des risques d'émergence épidémique et, à mieux comprendre les patterns de transmission des pathogènes permettant ainsi une lutte plus efficace après la mise en place de chaînes de transmission. Le choix des paramètres expérimentaux va donc être primordial afin que les résultats représentent de façon fiable la réalité de terrain, et puissent être d'une aide concrète.

En ce qui concerne le DENV-2, ce travail n'a pas permis de rendre compte de l'ouverture du filtre de compatibilité entre les *Ae. albopictus* de La Réunion et les deux souches de DENV-2 locales utilisées, aucune population vectrice testée n'étant compétente quant à leur transmission. Il est important de noter que cette absence de résultat n'est pas nécessairement le reflet d'une absence d'ouverture du filtre de compatibilité sur le terrain. En effet, puisque cela ne correspond pas au pattern épidémiologique du DENV-2 réellement observé sur à La Réunion, il est possible que le protocole expérimental utilisé ait pu biaiser les résultats, la raison invoquée dans l'article étant la différence de titre viral utilisé entre DENV-1 et DENV-2. Il est vrai que le DENV-2 a déjà montré par ailleurs nécessité un titre viral plus important que DENV-1 pour avoir des résultats non nuls lors de tests de compétence vectorielle (Whitehorn et al. 2015), ce qui semble aller dans le sens de nos résultats. Des tests comparant la compétence vectorielle de populations réunionnaises d'*Ae. albopictus* de génération F0 à transmettre les souches de DENV-1 et DENV-2 épidémiques locales pourraient être entrepris avec des repas infectieux contenant l'une ou l'autre des souches aux mêmes titres viraux. Ces titres viraux devraient rester dans une gamme permettant à la fois une bonne infection expérimentale des moustiques avec les deux sérotypes (Whitehorn et al. 2015) et une représentation assez fiable des titres viraux retrouvés dans le sang des personnes infectées (Duong et al. 2015). Outre l'efficacité de la transmission via la salive, trois autres paramètres pourraient être étudiés lors de ces expérimentations, i.e. la période d'incubation extrinsèque (PIE), l'effet sur la survie des vecteurs, et la transmission verticale du DENV. La PIE fait partie de l'équation de la capacité vectorielle détaillée dans la synthèse bibliographique (Kramer and Ciota 2015). Si elle diffère entre DENV-1 et DENV-2, la PIE peut donc contribuer à la différence de pattern épidémiologique observée entre ces deux sérotypes à La Réunion. Pour comparer les PIE de ces souches virales réunionnaises, nous pourrions utiliser un protocole ne nécessitant pas de sacrifier les femelles moustiques pour récupérer leur salive, à l'inverse de celui que nous utilisons actuellement, mais au contraire un protocole permettant de récupérer les salives des femelles moustiques à plusieurs

reprises au cours de leur vie (Ye et al. 2015). En plus d'avoir accès à la PIE de façon bien plus fiable (Ye et al. 2016), cette méthode permet également d'augmenter drastiquement le nombre d'échantillons de moustiques disponibles à chaque jour post-exposition collecté, une réelle aubaine au vue de la complexité d'obtenir des populations de génération F0 au nombre d'individus suffisant pour les expérimentations. Les femelles sécrétant de la salive lors de la prise de repas, cette méthode s'appuie sur la récupération des solutions nutritives sucrées mises à leur disposition tout au long de l'expérimentation après qu'elles aient été exposées au virus (Ye et al. 2015). Cette technique nécessite d'isoler les femelles individuellement après leur exposition au virus, et de récupérer et remplacer les solutions de sucre régulièrement tout au long de la vie des moustiques (Ye et al. 2015). La survie des moustiques fait également partie de l'équation de la capacité vectorielle à transmettre un pathogène donné (Kramer and Ciota 2015, elle peut donc influencer les patterns épidémiologiques de ces pathogènes. Et, puisqu'il a déjà été montré qu'une PIE courte était génétiquement liée à une survie diminuée chez des *Ae. aegypti* infectés par le DENV (Ye et al. 2016), il paraît intéressant de profiter de telles expérimentations de compétence vectorielle permettant de préserver les individus jusqu'à leur mort afin de tester l'influence des deux sérotypes sur la survie des *Ae. albopictus* de La Réunion. Pour sa part, bien que la transmission verticale ne soit pas dans l'équation consensuelle de la capacité vectorielle, elle est connue pour pouvoir influencer les patterns épidémiologiques de la dengue (Ferreira-de-Lima and Lima-Camara 2018). Et, puisqu'il a déjà été montré par ailleurs que l'efficacité de la transmission verticale était globalement plus importante pour le DENV-1 que pour le DENV-2 (Lequime et al. 2016), il serait intéressant de récolter les œufs des femelles moustiques infectées lors de ces expérimentations, d'y rechercher la présence du DENV, puis de comparer l'efficacité de la transmission verticale entre les souches virales des deux sérotypes testés. Pour finir, l'historique d'infection par la dengue de la population réunionnaise n'est pas à négliger dans l'explication de l'hétérogénéité des patterns épidémiologiques observés entre le DENV-2 et le DENV-1. Par exemple, l'immunité à long terme, conférée par le DENV-2 en 1977-1978 à la très jeune population réunionnaise (54.1% de la population en dessous de 20 ans en 1974; Sandron 2007) lors de la dernière épidémie de grande ampleur (Kles et al. 1994), a pu jouer un rôle sur le fait que le DENV-2 ait été moins incident que le DENV-1 lors de la présente épidémie. Par ailleurs, le DENV-1 aurait pu émerger dans les zones ayant été moins touchées par le DENV-2, mais au contraire il a émergé à l'Ouest et au Sud, puis s'est ensuite répandu dans toute l'île une fois devenu majoritaire puis exclusif. Ceci peut-être en partie expliqué par le fait qu'il existe, à La Réunion, des quartiers à fort risque de circulation de dengue mis en lumière par l'étude DEMARE, quartiers qui possèdent les plus fortes incidences de cas de dengue actifs en même temps que les plus importantes prévalences en IgG anti-dengue (i.e. infections passées) (De Santis et al. 2023). Or, l'immunité croisée entre sérotypes hétérologues dure en moyenne de 1 à 3 ans (Reich et al. 2013). Il est donc probable que l'épidémie ayant débuté avec le DENV-2 se soit d'abord concentrée dans ces zones et que, deux ans après, l'immunité croisée dans ces quartiers ait suffisamment diminué pour laisser place au DENV-1. Ce dernier aurait ainsi, lui aussi, pu émergé préférentiellement dans ces quartiers à haut facteur de risque de circulation avant de s'étendre à l'ensemble de l'île. Cette hypothèse est partiellement étayée

par le fait que de nombreux cas d'infection secondaire ont été enregistrés dans les premiers temps de l'émergence du DENV-1 (Hafsia et al. 2022).

Le pattern épidémiologique particulier du DENV-3 observé à La Réunion soulève, lui aussi, des questions. En effet, d'autres endroits à travers le monde présentant une co-circulation des différents sérotypes ont déjà montré que le DENV-3 pouvait devenir majoritaire sur les autres sérotypes et créer des épidémies d'aussi grande ampleur qu'eux (Zhang et al. 2005; Adams et al. 2006; Duong et al. 2013; Teixeira et al. 2013; Guo et al. 2017; Garcia--Van Smévoorde et al. 2023). Alors, pourquoi cela n'a-t-il pas été le cas à La Réunion? Pourquoi le DENV-3 est resté cantonné presque uniquement à l'Est de l'île? Pourquoi ne s'est-il pas intensifié à un moment ou l'autre de l'épidémie? Voici l'histoire hypothétique, dressée à partir des données disponibles, qui pourrait expliquer ce pattern épidémiologique particulier observé pour le DENV-3 à La Réunion. Au début de l'épidémie et jusqu'à fin 2019, le DENV-2 était l'unique sérotype à circuler à La Réunion, majoritairement à l'Ouest puis au Sud de l'île. Mais, en 2019, le DENV-1 puis le DENV-3 ont tous deux émergé au Sud (première chaîne de transmission à Petite Île) et à l'Est de l'île (premiers cas à Saint André), respectivement (Santé Publique France 2024). En 2020, Le DENV-1 a ensuite pris le dessus sur le DENV-2 et s'est propagé plus rapidement et intensément, les raisons de ces différences entre DENV-1 et DENV-2 ayant déjà fait l'objet d'hypothèses dans le paragraphe précédent. Pendant ce temps, cantonné à la partie Est de l'île, le DENV-3 circulait avec une faible intensité. Cette côte étant la moins connectée au reste de l'île (Hafsia et al. 2022), et l'aire géographique de transmission de la dengue paraissant très limitée (moins de 200 mètres de rayon) (De Santis et al. 2023), cela peut en partie expliquer le fait que le DENV-3 n'ait pas pu se répandre au reste de l'île. En effet, bien qu'il y ait de nombreux déplacements quotidiens des personnes depuis l'Est vers le Nord, ces déplacements ne se prolongent pas vers l'Ouest et le Sud, zones les plus à risque de mise en place de chaîne de transmission au vu des patterns épidémiologiques observés ces 50 dernières années à La Réunion (Hafsia et al. 2022). Et, même si le DENV-3 est parvenu à sortir de l'Est à un moment donné, il est très probable qu'il ait été confronté à l'immunité croisée avec les deux autres sérotypes aux incidences bien plus importantes et déjà en place dans les quartiers à plus fort risque de circulation, ce qui a aussi pu empêcher l'apparition de chaînes de transmission du DENV-3 en dehors de l'Est. Cependant, au vu des récents résultats montrant qu'un titre d'anticorps neutralisant élevé suite à l'infection par un sérotype du DENV était associé à une protection contre une infection symptomatique ultérieure par le DENV-1 ou le DENV-2, mais pas par le DENV-3, quel que soit l'historique d'infection du patient +, le rôle de l'immunité croisée dans le pattern épidémiologique particulier du DENV à La Réunion peut être questionné. De ce fait, d'autres facteurs entomologiques, environnementaux, et anthropiques (densité des vecteurs, facteurs de risque biotiques et abiotiques...) permettant d'expliquer cette hétérogénéité spatiale du DENV-3, ne doivent pas non plus être écartés. Par exemple, il est possible que les populations d'*Ae. albopictus* de l'île n'aient pas la même compétence vectorielle quant à la transmission du DENV-3, avec celles de l'Est ayant une meilleure efficacité de transmission que les autres zones de l'île, ou encore que les *Ae. albopictus* de La Réunion aient globalement une meilleure compétence vectorielle vis-à-vis du DENV-1 que vis-à-vis du DENV-3, comme observé par ailleurs chez *Ae. aegypti* (Chaves et al. 2022; Sasaki

et al. 2022). Afin d'étayer cette histoire hypothétique, des réponses doivent être apportées sur l'existence : d'une différence de phénotype d'infection et de réplication entre ces trois sérotypes de DENV, d'une différence de compétence vectorielle des *Ae. albopictus* vis-à-vis de ces trois sérotypes, ou encore d'une protection via l'immunité croisée entre sérotypes hétérologue différentes chez les cas secondaires selon leur historique d'infection. Chacune de ces questions nécessite d'être investiguée par des expérimentations qui vont maintenant être décrites succinctement. Dans un premier temps, il s'agirait d'étudier les différences de phénotypes viraux entre les sérotypes circulant à La Réunion d'un point de vue cellulaire en réalisant des infections expérimentales sur des lignées cellulaires de moustiques et humaines permettant de comparer leurs paramètres d'infection (adhérence et entrée dans les cellules), de production virale (quantité/qualité produite et sécrétée), et de sévérité. Dans un second temps, il faudrait tester les interactions génotype x génotype entre souches virales et populations vectrices des différentes zones géographiques de l'île. Pour ce faire, il faudrait comparer expérimentalement les compétences vectorielles entre sérotypes d'une part (comme proposé en perspectives dans le paragraphe ci-dessus pour DENV-1 et DENV-2) et entre populations vectrices d'autre part (comme réalisé dans notre étude pour le DENV-1). Cela permettrait notamment de savoir si le DENV-3 est mieux transmis par les populations de l'Est que par les autres populations vectrices, ou encore si le DENV-1 est de façon générale mieux transmis par les *Ae. albopictus* de La Réunion que les deux autres sérotypes. Ces différences pourraient par exemple être liées à l'apparition d'adaptations locales du DENV-3 pour les populations de l'Est, comme cela a déjà été suggéré par certains résultats chez les *Ae. aegypti* au Mexique vis-à-vis de certaines souches de DENV-2 (Armstrong and Rico-Hesse 2003), ou des adaptations du DENV-1 à tous les *Ae. albopictus* de La Réunion comme cela a été montré expérimentalement après plusieurs passages du DENV-1 chez les *Ae. albopictus* (Bellone et al. 2020). Comme suggéré pour le DENV-2 dans le paragraphe précédent, l'étude comparative de l'efficacité de la transmission verticale des trois différents sérotypes de DENV circulant à La Réunion et de leur effet sur la survie des moustiques pourraient également apporter des éléments d'information quant à l'hétérogénéité des patterns épidémiologiques qu'ils présentent (Lequime et al. 2016; Ye et al. 2016; Ferreira-de-Lima and Lima-Camara 2018). En complément de ces tests de compétence vectorielle, une actualisation de la densité des populations vectrices et des facteurs de risque d'émergence de la dengue dans l'Est de l'île, pourraient peut-être aussi permettre d'expliquer la faible intensité de l'épidémie que ce sérotipe a généré. Pour finir, afin d'étudier les paramètres de l'immunité croisée entre les différents sérotypes de DENV, il faudrait analyser les historiques d'infections des patients infectés à plusieurs reprises par le DENV à La Réunion et, mesure l'activité protectrice des anticorps neutralisant produits suite à l'infection par un sérotipe contre les sérotypes hétérologues, comme décrit par ailleurs (Bos et al. 2024).

En résumé, pour le territoire réunionnais, les résultats montrent que le filtre de compatibilité est bel et bien ouvert entre les moustiques *Ae. albopictus* et le DENV-1. Or, comme vu dans la première partie de ce mémoire expérimental, la transmission régionale peut avoir son importance dans la survenue d'épidémies, avec la possibilité de circulation régionale d'un même sérotipe via l'importation (et/ou exportation) de cas de dengue entre

les îles de la zone du SOOI. Cette souche de DENV-1 ayant créée une épidémie sans précédent à La Réunion en termes de durée, de nombre de cas, et de gravité, notamment avec les symptômes oculaires, il est important de s'intéresser à la possibilité de sa circulation régionale. Pour avoir une meilleure compréhension de la situation épidémiologique actuelle et future de la dengue dans la zone du SOOI, ainsi que des risques sanitaires associés, le cas local de La Réunion est donc à replacer dans un contexte plus large, le contexte régional du SOOI. Par ailleurs, la dengue n'est pas la seule arbovirose d'importance médicale dont la menace plane sur les îles du SOOI du fait de la présence des *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Le CHIKV et le ZIKV sont notamment tous deux transmis par ces vecteurs à travers la ceinture tropicale et subtropicale (Lo Presti et al. 2014; Obadia et al. 2022). La prochaine partie décrit ainsi l'étude de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. albopictus* et/ou d'*Ae. aegypti* quant à la transmission de ces arboviroses de préoccupations majeures, dans le contexte plus global que sont les îles du SOOI.

3. Compétence vectorielle des populations du Sud Ouest de l’Océan Indien

3.1. Introduction

Dans la région du SOOI, la dengue est connue depuis au minimum 1943, date de sa première description aux Comores (McCarthy and Brent 1943). Depuis lors, des épidémies de dengue survenues dans toutes les îles habitées du SOOI ont été référencées dans la littérature scientifique, et les espèces vectrices incriminées sont toujours *Ae. aegypti* et/ou *Ae. albopictus* (Hafsia et al. 2022). L’ouverture du filtre de rencontre entre moustiques vecteurs anthropophiles, humains, et DENV dans les îles du SOOI ne fait pas de doute du fait de l’occurrence d’épidémies sur toutes les îles ainsi que du fait de la présence du virus dans des échantillons de sang humain d’une part, et dans des pools d’*Ae. albopictus* d’autre part (Metselaar et al. 1980; Pierre et al. 2005). Cependant, l’ouverture du filtre de rencontre n’est pas suffisante pour établir qu’une espèce est vectrice d’un parasite. Il est également nécessaire d’étudier l’ouverture du filtre de compatibilité entre les moustiques et le DENV, comme ce que nous avons fait dans la partie précédente du mémoire expérimental pour La Réunion. Par ailleurs, bien qu’il s’agisse à chaque fois des *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, les deux espèces vectrices majoritaires de la dengue à l’échelle du globe, il se peut que des populations différentes d’une même espèce ne possèdent pas la même compétence à transmettre le DENV (Lambrechts et al. 2009; Fansiri et al. 2013; Guo et al. 2013; Kramer and Ciota 2015; Quintero-Gil et al. 2018; Wei et al. 2021). Certaines îles seraient ainsi potentiellement plus propices à des introductions et des épidémies de dengue, si les vecteurs qui y sont présents sont plus compétents vis-à-vis du DENV que ceux des autres îles. La Réunion est par exemple l’île pour laquelle le plus d’épidémies ont été rapportées, suivie par Mayotte (Hafsia et al. 2022). La première explication possible à cela serait un système de veille sanitaire et de santé plus efficace, ainsi qu’une recherche plus active dans ces îles françaises. Il peut cependant y avoir plus d’une explication, et explorer la compétence vectorielle des moustiques des différentes îles du SOOI vis-à-vis de la transmission de la dengue permettrait peut-être d’en donner une autre. Par ailleurs, cela permettrait de connaître les risques d’introduction et de dissémination du DENV-1 réunionnais entre les îles du SOOI, souche ayant causé une épidémie aux patterns épidémiologiques inquiétants (incidence, cas sévères et formes ophtalmiques graves) (Hafsia et al. 2022). Cependant, la dengue n’est pas la seule maladie à transmission vectorielle qui a menacé ou qui risque de menacer la santé publique de la région du SOOI.

Le virus du chikungunya (CHIKV), est lui aussi transmis majoritairement par les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, et les symptômes principaux chez l’Homme ressemblent à ceux de la dengue, avec en plus une forme d’arthralgie sévère qui peut durer des années après la fin de l’infection par le CHIKV (WHO 2020b). Décrit dans la région depuis 1979 aux Seychelles (Calisher et al. 1981), il n’avait cependant jamais causé d’épidémie de grande ampleur. Mais, les Comores connurent une épidémie de chikungunya sans précédent en 2005 avec 63% de la population de l’île Grande Comore ayant été atteintes par la maladie selon les estimations réalisées à partir de sérologies (Sergon et al. 2007). Puis s’en sont suivies des épidémies entre 2005 et 2006 à La Réunion, Mayotte, Madagascar, Maurice, et

aux Seychelles (Delatte, Dehecq, et al. 2008). A La Réunion et à Mayotte, 38% et 26% de la population totale a été respectivement infectée par le CHIKV lors de ces épidémies (Sissoko et al. 2007; Gérardin et al. 2008). En plus des 205 décès à La Réunion, fait inhabituel pour ce virus, il y a eu de nombreuses formes graves et rares dont certains symptômes ont été associés pour la première fois à une infection par le CHIKV (Pialoux et al. 2006). Depuis la fin de cette période épidémique généralisée dans la zone du SOOI, il y a presque 20 ans de cela, aucune flambée épidémique de CHIKV n'a été décrite. La population naïve a déjà pu se reconstituer en partie, la menace d'un retour du CHIKV est donc de plus en plus pesante sur la région.

Une autre menace d'arbovirose plane sur la région du SOOI, celle du virus tropical ZIKA (ZIKV). En effet, aucune flambée épidémique n'a été décrite jusqu'à présent dans la région, la population est donc naïve face à cette maladie dont les moustiques vecteurs majoritaires sont toujours les *Ae. aegypti* (WHO 2018a). L'espèce *Ae. albopictus*, très représentée dans la région du SOOI, peut cependant aussi transmettre le ZIKV (McKenzie et al. 2019). Bien que la majorité des infections par ZIKV soit asymptomatique ou de type dengue-like, les épidémies sont prises très au sérieux puisqu'elles s'accompagnent d'effets tératogènes chez les nouveau-nés de mères infectées et de syndromes neurologiques chez l'adulte (WHO 2018a). Depuis 2018, l'OMS a en effet inclus le ZIKV dans la liste très restreinte des maladies prioritaires pour la recherche et développement au niveau mondial, liste qui comprend aujourd'hui neuf maladies différentes dont le COVID-19, la fièvre hémorragique de Crimée-Congo, et la fièvre Ebola par exemple (WHO 2018c). Ces maladies sont considérées comme prioritaires du fait de la menace actuelle ou future qu'elles représentent pour la santé publique globale.

Il paraît donc pertinent de tester la compétence vectorielle des populations *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* des îles du SOOI quant à la transmission du CHIKV et du ZIKV, en plus du DENV. C'est dans ce contexte que s'ancre l'axe trois du projet FEDER INTERREG VECTOBIOIRES, dont dépend cette thèse. Pour rappel, cet axe vise à évaluer la compétence vectorielle des principales espèces de moustiques vectrices d'arbovirus à l'Homme dans les îles du SOOI vis-à-vis des arbovirus épidémiques (DENV et CHIKV) et de ceux à potentiel émergent (ZIKV) dans la région. Tout d'abord, voici une présentation succincte des virus sélectionnés pour l'étude.

3.2. Présentation des souches virales

3.2.1. Quelques généralités sur les virus du Chikungunya et du Zika

Le CHIKV est un *Alphavirus*, de la famille des *Togaviridae*, comme d'autres maladies à transmission vectorielle d'importance médicale ou vétérinaire tel que le virus du Ross River, ou encore les virus de l'encéphalite équine de l'Est et de l'encéphalite équine vénézuélienne (Chen et al. 2018). Le CHIKV est un virus enveloppé (60-70nm) à ARN linéaire simple brin positif. Son génome d'environ 12 kb possède une coiffe en 5' et une queue poly-A en 3'. Il code pour deux polyprotéines qui, clivées par des protéases virales et cellulaires, aboutissent respectivement à la formation de quatre protéines non-structurales (NS1 à NS4) et à cinq

protéines structurales (C, E3, E2, 6K, E1). Les études phylogénétiques ont permis de classer les souches virales du CHIKV en trois clades, l'Est/Centre/Sud Africain (ECSA), l'Ouest Africain, et l'Asiatique (Powers et al. 2000; Volk et al. 2010; Duong et al. 2012). Le CHIKV est transmis, dans son cycle urbain, essentiellement par les moustiques *Ae. aegypti*, mais aussi par les *Ae. albopictus*, et en moindre mesure par certains moustiques du genre *Culex* (Lo Presti et al. 2014). Certaines descriptions de symptômes éprouvés lors d'épidémies ayant eu lieu il y a plusieurs siècles laissent suggérer qu'il s'agissait très probablement d'infections liées au CHIKV, notamment avec la présence d'une forte fièvre associée à une arthralgie sévère. Cependant, il est souvent très difficile de dissocier rétrospectivement certaines arboviroses uniquement par le témoignage descriptif des symptômes qu'il en a été fait. En effet, plusieurs arboviroses peuvent se déclarer de façon très semblable chez les personnes atteintes, et c'est notamment le cas du Chikungunya et de la dengue (Carey 1971; Vasilakis and Weaver 2008). Le CHIKV fut identifié biologiquement et isolé pour la première fois en 1953 à partir du sérum d'un patient infecté lors d'une épidémie entre le Mozambique et la Tanzanie de 1952 à 1953 (Ross 1956). Pendant des dizaines d'années, la plupart des épidémies de chikungunya qui suivirent furent localisées en Afrique et en Asie, et furent de faible ampleur (Powers and Logue 2007; WHO 2020b). Puis à partir de la fin des années 1980, une flambée épidémique qui allait toucher une large partie de la ceinture tropicale commença avec des souches appartenant au clade ECSA (Powers and Logue 2007). Le CHIKV se propagea progressivement en Afrique de l'Ouest, du Centre, et de l'Est, et ce fut en 2004 que cette flambée épidémique prit de l'ampleur; depuis les côtes kenyanes elle se répandit vers les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien d'une part, et vers le sous-continent indien, puis en Asie du Sud-Est et même en Italie du Nord d'autre part (Powers and Logue 2007; Lo Presti et al. 2012; Lo Presti et al. 2014). Cette flambée sans précédent en termes d'incidence et de sévérité se poursuivit jusqu'en 2007 environ. Une mutation, trouvée pour la première fois à La Réunion en 2005, induit le remplacement de l'alanine du 226ème acide aminé de la séquence protéique de la protéine structurale E1 par une valine (E1-A226V) (Schuffenecker et al. 2006). Cette mutation semble conférer une meilleure compatibilité entre *Ae. albopictus* et le CHIKV en améliorant la réplication et la transmission du virus par ce vecteur (Vazeille et al. 2007; Tsetsarkin et al. 2007). Elle a également été retrouvée dans d'autres localités présentant une densité importante en vecteur *Ae. albopictus*, comme dans le district de Kerala en Inde (Kumar et al. 2008), ou en Italie du Nord (Rezza et al. 2007). L'apparition à plusieurs reprises de cette mutation dans des zones géographiques éloignées semble corrélée à la présence unique ou majoritaire des vecteurs *Ae. albopictus*, et l'hypothèse de la convergence évolutive a reçu certaines preuves phylogénétiques (de Lamballerie et al. 2008). Depuis cette flambée épidémique, le CHIKV circule de façon continue dans la ceinture tropicale, et son aire de répartition s'étend progressivement, causant de nombreuses épidémies. La région des Amériques, après la première occurrence du CHIKV en 2013, est particulièrement touchée (WHO 2020b). Le CHIKV est devenu endémique dans de nombreux pays d'Afrique et d'Asie, et s'étend même jusqu'en Europe avec des épidémies régulières en France et en Italie (WHO 2020b). Depuis 2007, les îles du SOOI n'ont connu que des flambées épidémiques de faible envergure comme rapporté à La Réunion en 2010 (Dehecq et al.

2011). Le risque d'une nouvelle épidémie y devient de ce fait plus probable à chaque année qui passe.

Le ZIKV est un *Orthoflavivirus* appartenant à la même famille des *Flaviviridae* que la dengue. Isolé et identifié pour la première fois en Ouganda en 1947 (Dick et al. 1952), la première épidémie est décrite des années après, en 2007 sur l'île de Yap (Micronésie) (Duffy et al. 2009). En 2013 et depuis 2015 des épidémies sont rapportées respectivement en Polynésie Française et sur le continent Américain (Musso et al. 2014; Weaver et al. 2016). Les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* participent très largement au cycle urbain du ZIKV, autrement dit à sa transmission aux humains (Sharma and Lal 2017; Obadia et al. 2022). La structure générale du génome du ZIKV est la même que celle du DENV, c'est-à-dire un ARN linéaire simple brin positif d'environ 11 kilobases codant pour une seule polyprotéine, clivée par la suite en trois protéines structurales (C, prM, et E) et sept non-structurales (NS1, NS2A/B, NS3, NS4A/B, et NS5) (Lazear and Diamond 2016). Les souches du ZIKV responsables des épidémies majeures citées ci-dessus appartiennent à la lignée asiatique (souches asiatiques, américaines et du Pacifique) qui est distante phylogénétiquement de celle regroupant les souches africaines (Haddock et al. 2012; Lanciotti et al. 2016). Les souches asiatiques épidémiques du ZIKV se sont révélées capables d'une propagation explosive, et les facteurs à l'origine de leur émergence ne sont pas encore connus (Aubry et al. 2021). Une évolution adaptative du virus induisant une meilleure transmission par leurs vecteurs ne semble pas en être la raison (Aubry et al. 2021). De façon globale, *Ae. aegypti* est un meilleur vecteur qu'*Ae. albopictus* mais les deux ont le potentiel pour engendrer de nouvelles épidémies, majoritairement avec des souches africaines pour *Ae. albopictus*, et avec des souches de toutes provenances pour *Ae. aegypti* (Obadia et al. 2022). *Ae. albopictus* est d'ailleurs considéré comme responsable de la chaîne de transmission du virus dans le Sud de la France en août 2019 (Giron et al. 2019), chaîne qui a heureusement pu être interrompue très rapidement par les organismes de lutte antivectorielle (LAV). Bien que pour l'instant les souches africaines n'aient pas causé d'épidémies notables, le risque est tout de même bien présent. En témoigne l'augmentation du nombre d'études démontrant que les souches africaines de ZIKV possèdent une meilleure transmissibilité par les vecteurs moustiques que les souches de la lignée asiatique (Smith et al. 2018; Aubry et al. 2021; Obadia et al. 2022), et présentent également des symptômes plus sévères, et une mortalité augmentée chez les modèles murins (Smith et al. 2018; Aubry et al. 2021). Pour l'instant, fort heureusement épargnée par le ZIKV, la région du SOOI présente pourtant les caractéristiques compatibles à la survenue épidémique d'un tel arbovirus, avec notamment une densité élevée de vecteurs *Aedes* et une population humaine *a priori* naïve face à la maladie.

3.2.2. Choix des souches virales de DENV, CHIKV et ZIKV pour l'étude

Pour la dengue, la souche DENV-1 RUN (réf PR1583 dans Hafsia et al. 2023) est utilisée pour les infections expérimentales. Comme expliqué précédemment, cette souche de dengue réunionnaise, appartenant au génotype I du DENV-1, provient du projet CARBO et a été isolée lors de cette thèse (première partie du mémoire expérimental). Elle présente

l'avantage d'avoir un fort titre viral (3.18×10^6 PFU/ml) avec relativement peu de passages *in cellulo* subis pour sa production (ici quatre passages sur cellules Véro). Par ailleurs, depuis son début en 2017, l'épidémie de dengue et l'apparition de cas graves à La Réunion se sont accélérées suite à l'émergence et à la dominance du DENV-1 sur les autres sérotypes (Hafsia et al. 2022). Le DENV-1 est également impliqué dans l'épidémie de 2019-2020 à Mayotte, avec une même survenue inhabituelle de cas graves et de décès (Santé Publique France 2021). Même si le lien phylogénétique entre souches mahoraises et réunionnaises reste encore à étudier, utiliser une de ces souches de DENV-1 pour les infections expérimentales des principaux moustiques *Aedes* des autres îles du SOOI, en l'occurrence la souche réunionnaise, permet d'établir la présence d'un risque d'émergence épidémique, de dissémination, dans la zone du SOOI d'une souche aux conséquences épidémiologiques importantes.

Pour le chikungunya, une des souches épidémiques de CHIKV ayant circulé lors de l'épidémie de 2005-2006 à La Réunion a été utilisée (référence dans l'article). Elle appartient à la lignée Océan Indien, phylogénétiquement proche de la lignée Afrique Centrale, au sein du clade ECSA (Parola et al. 2006; de Lamballerie et al. 2008). Elle a été isolée par un laboratoire de Marseille à partir du sang d'un patient hospitalisé en raison de fortes fièvres sur plusieurs jours accompagnées d'asthénie, myalgie, céphalées, nausées, anorexie, conjonctivites, et arthralgie particulièrement sévère, symptômes qui se sont déclarés quelques jours après son retour d'un voyage à La Réunion (Parola et al. 2006). Cette souche possède la mutation E1-A226V qui semble améliorer la transmission du CHIKV par les *Ae. albopictus* (Tsetsarkin et al. 2007). Il reste de ce fait très intéressant de l'utiliser dans cette étude malgré un nombre de passages de production virale relativement important (8 sur les cellules Véro, puis 2 sur les C6/36-Ni qui sont des cellules de moustiques *Ae. albopictus* curées de leur infection naturelle par *Wolbachia*). Par ailleurs, elle a déjà été utilisée dans des infections expérimentales avec, entre autres, des populations de génération F1 d'*Ae. albopictus* réunionnaises et mahoraises (Vazeille et al. 2007). Au vu de la circulation régionale fortement suggérée par les analyses phylogénétiques du DENV-2 (Pascalis et al. 2020), étendre les précédentes analyses de compétence vectorielle réalisées avec cette souche de CHIKV aux autres îles du SOOI prend toute son importance.

Pour le ZIKA, la souche PF-13 (référence complète dans l'article) de la lignée épidémique asiatique est utilisée (Cao-Lormeau et al. 2014; Hamel et al. 2015). Elle a été isolée en octobre 2013 en Polynésie Française à partir du sang d'un patient de l'île de Nuku Hiva (archipel des Marquises) présentant un syndrome de type dengue-like (incluant fièvre, céphalée, et arthralgie) et un rash cutané (Cao-Lormeau et al. 2014). Ce fut un des premiers cas de ZIKV détectés lors de l'épidémie qui eut lieu d'octobre 2013 à mars 2014 en Polynésie française (Cao-Lormeau et al. 2014; Musso et al. 2014; Aubry et al. 2017). À La Réunion des moustiques *Ae. albopictus* de terrain et *Ae. aegypti* de laboratoire infectés expérimentalement avec deux souches épidémiques asiatiques autres que PF-13, ont précédemment montré de faibles compétences vectorielles, voire même nulles dans certains cas, pour la transmission de ces souches de ZIKV (Gomard et al. 2020). Malgré ces résultats, il

est intéressant d'étendre les expérimentations de compétence vectorielle aux différentes îles du SOOI en utilisant une autre souche de lignée asiatique épidémique, ici PF-13, car seules les souches de cette lignée sont aujourd'hui connues pour être responsables des épidémies majoritaires recensées à l'échelle du globe. Par ailleurs, *Ae. aegypti* est considéré comme le vecteur majoritaire du ZIKV épidémique au niveau mondial, ce qui a également été prouvé expérimentalement (Souza-Neto et al. 2019; Obadia et al. 2022). Cette espèce étant a priori présente en nombre importants sur certaines îles du SOOI telles que les Comores ou Mayotte (Sang et al. 2008; Le Goff et al. 2014), tester leur compétence vectorielle vis-à-vis d'une souche épidémique asiatique est tout à fait pertinent afin d'estimer le risque d'émergence épidémique du ZIKV dans ces îles.

3.3 Campagnes de terrain et élevage

L'objectif de cet axe du projet VECTOBIOMES est donc d'évaluer la compétence vectorielle des moustiques majoritaires du genre *Aedes* des îles du SOOI vis-à-vis du DENV, du CHIKV, et du ZIKV. Pour ce faire, des campagnes de prospection et de collecte sur le terrain de populations de moustiques d'intérêt au stade d'œufs ont été réalisées à La Réunion, aux Seychelles, aux Comores, et à Mayotte entre 2019 et 2020. Des gîtes de ponte potentiels d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* sont repérés sur chaque île avec l'aide des partenaires locaux spécialistes en entomologie et/ou en LAV. Des pots de ponte avec des papiers humides destinés à recevoir les œufs sont déposés dans ces gîtes et relevés régulièrement. Les papiers de ponte chargés d'œufs sont ensuite séchés puis envoyés à La Réunion. Tous ces prélèvements d'échantillons vivants d'œufs de moustiques ont été réalisés selon les autorisations fournies par les autorités gouvernementales de chaque pays/îles et dans le strict respect du protocole de Nagoya (voir partie Ethics statement de l'article présenté ci-après).

De retour au laboratoire à La Réunion, les éclosions des différents papiers de ponte pour chaque population ont été synchronisées, et les moustiques élevés en conditions contrôlées au sein de l'insectarium de biosécurité de niveau 2 de PLATIN-OI. Les élevages ont dû être réalisés sur plusieurs générations afin d'atteindre un nombre suffisant d'individus pour réaliser les infections expérimentales avec les différents virus, le nombre de générations nécessaire dépendant du succès de l'élevage pour chaque population. De plus, pour des raisons purement techniques de nombre d'individus moustiques et de volumes de sang disponibles pour ces infections expérimentales, toutes les souches virales n'ont pas pu être testées sur une seule et même génération de moustiques pour chaque population. Le détails des méthodes et des résultats obtenus pour les tests de compétence vectorielle pour toutes ces populations et souches virales sont détaillés dans l'article présenté ci-dessous.

3.4. Publication 5: “*Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from the South-Western Indian Ocean experimentally transmit Chikungunya and Dengue-1 viruses but not Asian Zika virus”

~ PDF ARTICLE EN RÉVISION PAR CO-AUTEURS ~

***Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from the Southwestern Indian Ocean experimentally transmit Chikungunya and Dengue-1 viruses but not Asian Zika virus**

Sarah Hafsia^{1†}, Yann Gomard^{1††}, Cyrille Lebon¹, Haoues Alout², Fiona Baudino¹, Clément De Graaf¹, Patrick Rabarison², Ambdoul-bar Idaroussi², Amina Yssouf³, Simon Julienne⁴, David Wilkinson¹, Célestine Atyame^{1*} and Patrick Mavingui^{1*}

¹ Université de La Réunion, UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical) CNRS 9192, INSERM 1187, IRD 249, Université de La Réunion, île de La Réunion, France

² ARS Mayotte, Centre Kinga 97600, Kawéni, Mayotte, France

³ PNL P Malaria Control Program, Morini, Comoros

⁴ Ministry of Health, Victoria, Mahé, Seychelles

[†] Current address: Université de La Réunion, UMR PVBMT (Peuplements Végétaux et Bioagresseurs en Milieu Tropical), F-97410 Saint-Pierre, île de La Réunion, France

^{††} Sarah Hafsia and Yann Gomard contributed equally to this work

*Correspondence: Patrick Mavingui (Patrick.MAVINGUI@cnrs.fr) and Célestine Atyame (celestine.atyame-nten@univ-reunion.fr)

Running title: Vector competence of *Aedes* spp. for CHIKV, DENV and ZIKV in Indian Ocean

Abstract

Aedes albopictus and *Aedes aegypti* are vectors of numerous arboviruses such as Chikungunya (CHIKV), Dengue (DENV) and Zika (ZIKV). In localities where these mosquitoes evolve it is important to evaluate their vector competences to arboviruses and identify the factors modulating the viral transmissions. In this study, we evaluated the vector competences to epidemic CHIKV, DENV-1 and Asian ZIKV of eight *Ae. albopictus* and two *Ae. aegypti* lines collected on different islands within the Southwestern Indian Ocean (SWIO): Comoros archipelago, Seychelles archipelago and Reunion Island. According to the virus, the vector competence parameters (infection rate: IR, dissemination efficiency: DE and transmission efficiency: TE) were examined at different day post-exposure (dpe). The results display that none of the *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* lines were competent for the Asian ZIKV strain used in this study, with no or very limited viral infection and dissemination, and no transmission. On the other hand, all of the tested mosquito lines were susceptible to DENV-1 and CHIKV infections and were able to transmit the viruses with transmission rates reaching 35.4% and 62.5%, respectively. The vector competence parameters to DENV-1 and CHIKV are modulated by mosquito lines and/or dpe, but not by the geographic region (Comoros archipelago, Seychelles archipelago and Reunion Island). Altogether, these results indicated a limited risk of emergence of the tested Asian ZIKV due to *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* in the region while at the opposite, both epidemic DENV-1 and CHIKV strains present a risk of emergence or re-emergence in the different surveyed islands. These findings improve our understanding of the role of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* in the risk of arboviruses emergence and circulation in the SWIO region.

Keywords: *Aedes* spp., arboviruses, vector competence, Comoros archipelago, Seychelles archipelago, and Reunion Island.

Introduction

Mosquitoes are vectors of the most important human vector-borne diseases in terms of mortality and morbidity with almost putative 750,000 deaths every year (Gaythorpe et al., 2021; Puntasecca et al., 2021; Quan et al., 2020; World Health Organization, 2020, 2023). More than 3,600 species of mosquito are described in the world but only some of them are able to support and transmit infectious agents responsible of infectious diseases (Wilkerson et al., 2021). Among these mosquito species, the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) and the Yellow Fever mosquito *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) represent major problems as they are vectors of numerous arthropod-borne viruses (arboviruses) such as Chikungunya (Togaviridae), Dengue and Zika (Flaviviridae) (McKenzie et al., 2019; Paupy et al., 2009; Souza-Neto et al., 2019; Tsetsarkin et al., 2007). *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* present a worldwide distribution (Kraemer et al., 2015), hence it is crucial to estimate the capacity of these mosquito species to transmit viruses in order to evaluate the risks of epidemic emergence, and to plan preventive actions and effective vector control programs in specific regions. In addition, the identification of factors modulating the virus transmissions represent key elements to fight against the arbovirus epidemics. Indeed, studies reported that different factors can affect the vector competence of mosquito for arboviruses such as the mosquito and infectious agents genetic, the demographic history and microbiota of mosquitoes as well as the temperature (Aubry et al., 2018; Azar et al., 2017; Fernandes et al., 2020; Gloria-Soria et al., 2021; Gutiérrez-López et al., 2020; McKenzie et al., 2019; Paaijmans et al., 2013; Souza-Neto et al., 2019; Tsai et al., 2017; Vega-Rúa et al., 2020). Moreover, mosquito insecticide resistances can also impact the transmission of infectious agents (Alout et al., 2014; Atyame et al., 2019; Deng et al., 2021).

The islands of the South West Indian Ocean (SWIO) are not spared by arbovirus with different outbreaks due to CHIKV, DENV or Rift Valley Fever virus (RVFV) (Hafsia et al., 2022; Josseran et al., 2006; Ministry of Health - Seychelles, 2017; Santé Publique France, 2021; Youssouf et al., 2020). Despite these outbreaks and the presence of the *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti*, a limited number of studies have investigated the vector competence of regional mosquitoes to arboviruses such as CHIKV, DENV and ZIKV. To our knowledge, such studies are only available for Reunion Island *Aedes* spp. concerning the ZIKV (Bohers et al., 2020; Gomard et al., 2020; Obadia et al., 2022; Vazeille et al., 2018) and the DENV (Hafsia et al., submitted; Bohers et al., 2020; Mousson et al., 2012; Paupy and Girod, 2001; Vazeille et al., 2010), and only for Reunion Island and Mayotte regarding the CHIKV (Bohers et al., 2020; Martin et al., 2010; Vazeille et al., 2007, 2010). The results provided differ according to the studies considered, which could be due to differences in the protocols, mosquito lines and/or virus strains used. Indeed, such elements can introduce bias into the assessment of vector competence and create discrepancies between the results of the different studies. Consequently, the vector competence of regional mosquitoes to transmit CHIKV, DENV-1 and ZIKV has not been fully evaluated, stressing the importance to further investigate it. In the present study, we aimed to fill these gaps by examining the vector competence to CHIKV, DENV-1 and ZIKV of eight *Ae. albopictus* and two *Ae. aegypti* lines collected from five islands of the SWIO. The insights brought may help to examine the arbovirus transmission in this insular system.

Materials and methods

Mosquito lines

A total of eight *Ae. albopictus* lines and two *Ae. aegypti* lines collected in the islands of the SWIO were used. *Aedes albopictus* mosquitoes were collected between April and December 2019 in Mahé and Praslin (Seychelles archipelago); Grande Comore and Mayotte (Comoros archipelago) and Reunion Island (Figure 1 and Table S1). The two *Ae. aegypti* lines were collected in Grande Comore in 2019 and Reunion Island in 2014 (Figure 1). Mosquitoes were sampled as eggs and were reared in the insect laboratory under standard conditions ($26 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% relative humidity (RH), 12 h light/12 h dark photoperiod). Larvae were fed with yeast tablets and adults with 10% sucrose solution. Experimental infections were performed using *Ae. albopictus* lines of F_1 - F_9 generations and *Ae. aegypti* lines of F_2 - F_6 generations (for mosquitoes from Grande Comore) or F_{31} - F_{37} generations (for mosquitoes from Reunion Island) (Table S1).

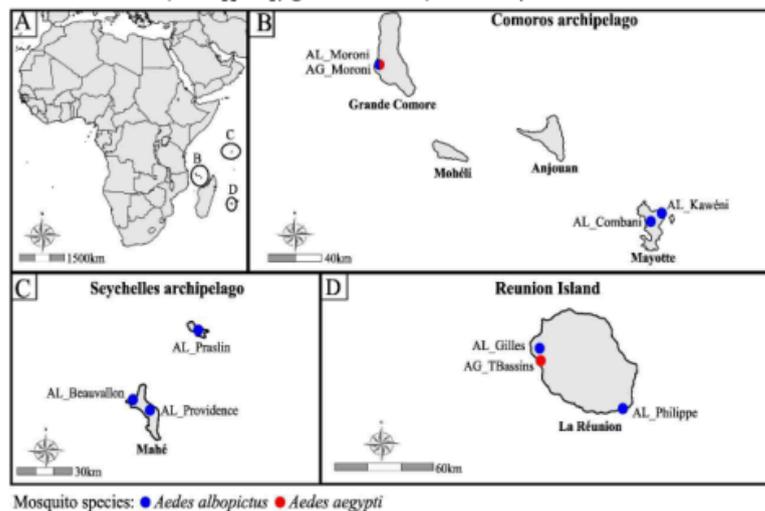


Figure 1. Maps of mosquito lines collection locations in the Southwestern Indian Ocean (SWIO). A Localization of surveyed islands in the SWIO. Localization of sampling sites on B Comoros archipelago, C Seychelles archipelago, and D Reunion Island. Blue and red points represent sites in which *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* lines were obtained, respectively.

Viruses

We used three arboviruses: ZIKV, DENV and CHIKV. The ZIKV strain (PF-25013-18; GenBank accession number: KJ579442) was isolated from a human in French Polynesia in 2013 as previously described (Cao-Lormeau et al., 2014); while the DENV strain corresponded to the PR-1583 strain of serotype 1 (DENV-1) (GenBank accession number: ON631277) that was isolated from a patient serum sampled in Reunion Island in 2019 (Hafsia et al. 2023). The ZIKV and DENV-1 strains were amplified on Vero E6 cells (ATCC, ref. CRL-1586) at a MOI of 0.1 in an Eagle's minimum essential medium (MEM) supplemented with 2% heat-inactivated FBS, 2 mmol/l L-glutamine, 1 mmol/l sodium pyruvate, 10 U/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin and 0.5 $\mu\text{g/ml}$ of fungizone (PAN Biotech, Aidenbach, Germany). For the production of both virus stocks, Vero cells were maintained at 37°C with a 5% CO_2 atmosphere

and supernatants were harvested five days post-infection and stored at -80°C until use. The CHIKV strain (UVE/CHIKV/2006/RE/LR2006_OPY1; GenBank accession number: DQ443544) was isolated from a human in Reunion Island in 2006 and was provided as a lyophilizate (passage eight) by the European Virus Archive goes global (EVAg). The lyophilizate was re-suspended into 200 μl distilled water and the virus stock was produced on *Ae. albopictus* C6/36 cells at MOI of 0.1 in MM, Schneider's Insect Medium (SIM) with L-glutamine and sodium bicarbonate (Sigma-Aldrich) supplemented with 2% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS), 10 U/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of fungizone (PAN Biotech, Aidenbach, Germany). The C6/36 cells were maintained at 26°C and the supernatant was harvested two days post-infection and subsequently stored at -80°C until experimental infections.

Oral infections of mosquitoes

Seven to 10-day-old female mosquitoes were placed in plastic boxes into a climatic chamber for a starvation period of 48 h under standard conditions ($26\pm 1^{\circ}\text{C}$; 80% RH; 12 h light/12 h dark). Then, mosquitoes were fed on a blood meal containing 1.4 ml of washed rabbit erythrocytes, 700 μl of virus (either ZIKV, DENV or CHIKV), and 5 mM (21 μl) adenosine triphosphate (ATP) as phagostimulant. The infectious blood meals were provided to mosquitoes by using a Hemotek feeding system (Hemotek Limited, Great Harwood, UK) and pig intestines as membranes. Female mosquitoes were allowed to feed during 30 min to 1 h. Finally, only fully engorged females were transferred into a climatic chamber and maintained with 10% sucrose up to 28 days for ZIKV and DENV-1, and 14 days for CHIKV. The titers of infectious blood meals were $10^{6.34}$ to $10^{6.38}$ PFU/ml, $10^{6.35}$ to $10^{6.65}$ PFU/ml, and $10^{6.90}$ to $10^{8.60}$ PFU/ml for ZIKV, DENV-1 and CHIKV, respectively.

Mosquito processing

A forced salivation method (Dubrulle et al., 2009) was used to collect saliva from individual mosquitoes (19 to 48 specimens) at 7, 14, 21 and 28 days post-exposure (dpe) for ZIKV, at 14, 21 and 28 dpe for DENV-1, and at 7 and 14 dpe for CHIKV (Table S1). This method allows to collect mosquito's saliva by removing the legs and wings of the mosquito and introducing its proboscis into a 20 μl pipette tip containing 5 μl of FBS. After 30 min (for DENV-1) or 45 min (for ZIKV and CHIKV), the solution containing the saliva was mixed with 45 μl of MEM supplemented with 2 mmol/l L-glutamine, 1 mmol/l sodium pyruvate, 10 U/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin and 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of fungizone. Then, the head and the body (abdomen and thorax) of each specimen were ground separately in 200 μl of the same MEM medium supplemented with 2% FBS and centrifuged at $10,000\times g$ for 5 min to pellet tissue debris. Finally, 150 μl of the supernatant of each sample was stored at -80°C until virus detection and titration.

Virus detection, titration and evaluation of vector competence

Viral infection status of bodies, heads and saliva were determined by using plaque forming unit (PFU) assays. For the detection of ZIKV and DENV in samples, Vero E6 cells were seeded either in 48-well culture plates at a density of 4×10^4 cells per well for testing body and head homogenates, or in 6-well culture plates at a density of 5×10^5 for saliva. The next day, cells were

infected with ten-fold dilutions of body and head homogenates or with saliva. For the detection of infectious CHIKV particles, Vero E6 cells were seeded in 96-well culture plates at a density of 3×10^4 cells per well or in 12-well culture plates at a density of 3×10^5 cells and incubated at 37 °C with a 5% CO₂ atmosphere. The next day, cells in 96-well culture plates were infected with ten-fold dilutions of body and head homogenates, while cells in 12-well culture plates were infected with ten-fold dilutions of saliva. For the detection of DENV and ZIKV in samples, Vero E6 cells were seeded either in 48-well culture plates at a density of 4×10^4 cells per well for testing body and head homogenates or in 6-well culture plates at a density of 5×10^5 for saliva. The next day, cells were infected with ten-fold dilutions of body and head homogenates or with saliva. After infection of cells with each of the three viral strains, MEM medium supplemented with 5% of FBS, 2 mmol/l L-glutamine, 1 mmol/l sodium pyruvate, 10 U/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin, 0.5 µg/ml of fungizone and 0.8% carboxymethylcellulose sodium salt (CMC; Sigma-Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was added in each well. Then cells were incubated at 37 °C with a 5% CO₂ atmosphere during 7, 5 and 3 days for ZIKV, DENV-1 and CHIKV, respectively. Afterward, the medium was removed and a solution of 3.7% paraformaldehyde (Sigma-Aldrich) was used to fix cells. Finally, cells were stained with 0.5% crystal violet (Sigma-Aldrich) diluted in 20% ethanol.

Vector competence was evaluated based on three parameters: (i) the infection rate (IR), (ii) the dissemination efficiency (DE) and (iii) the transmission efficiency (TE). The IR corresponded to the proportion of infected bodies (abdomen and thorax) among the total number of mosquitoes tested. The DE was the proportion of mosquitoes with infected heads among all blood-fed females. The TE corresponded to the proportion of females with virus in the saliva among the total number of mosquitoes tested. Vector competence parameters were then characterized at 7, 14 and 21 dpe for mosquito lines infected with ZIKV; at 14, 21 and 28 dpe for DENV-1 and at 7 and 14 dpe for CHIKV. We did not obtain data for all mosquito lines at each dpe. Therefore, for the ZIKV, vector competence parameters were examined for seven, nine and eight mosquito lines at 7, 14 and 21 dpe, respectively (Table S1). For the DENV-1, vector competence parameters were assessed for eight, ten, and nine mosquito lines at 14, 21 and 28 dpe, respectively (Table S1). For the CHIKV, vector competence parameters were examined for ten and nine mosquito lines at 7 and 14 dpe, respectively (Table S1).

Statistical analysis

We examined the influence of explanatory variables on vector competence parameters (IR, DE and TE) for each virus using generalized linear models (GLMs) with a binomial error distribution. For each GLM, the explanatory variables tested were: mosquito line, dpe and geographical region (Comoros archipelago, Seychelles archipelago and Reunion Island), as well as interactions between these variables. The selection of the best models was performed with the function *step* from R software. Then the significance of each variable was assessed using the *Anova* function from the *car* R package, which performs a type III hypothesis test (Fox and Weisberg, 2019). Based on the best GLM, the *emmeans* R package (Russell, 2021) was used to access the statistical difference. Among the three explanatory variables tested, the geographical region variable was not retained in any of the best models and did not influence the observed vector

competence parameters for DENV-1 and CHIKV. For ZIKV, no statistical analysis was carried out, as positive specimens were obtained for only one mosquito line (*see results section*). Statistical investigations were performed separately for *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* due to an unbalanced number of mosquito lines between the two species (two lines for *Ae. aegypti* and eight lines for *Ae. albopictus*). For *Ae. aegypti*, to avoid confounding effects between mosquito lines and geographical regions, only mosquito lines and dpe as well as their interactions were examined. For each virus and mosquito species, the Wilcoxon test (for comparisons between two groups), or the Kruskal-Wallis test (for comparisons between more than two groups) followed by a post-hoc Dunn analysis multiple tests, were used to compare viral loads in positive saliva between mosquito lines for each dpe. All statistical analyses were realized under the R software version 3.6.2 (R Core Team 2019).

Results

***Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* from SWIO are not able to transmit the Asian ZIKV strain PF-25013-18**

The exposure of mosquito lines to the ZIKV strain PF-25013-18 did not show infectious ZIKV particles in the bodies, the heads or the saliva of samples of any of the eight *Ae. albopictus* lines tested either at 7, 14 or 21 dpe (Table S2). Same refractoriness to the virus was observed for the *Ae. aegypti* from Comoros archipelago (AG_Moroni) (Table S2), whereas the *Ae. aegypti* line from Reunion Island (AG_TBassin) was able to be infected at 7 dpe (IR = 28.1%, 95%CI = [15.6 - 45.4%]), 14 dpe (IR = 3.1%, 95%CI = [0.6 - 15.7%]) and 21 dpe (IR = 5.0%, 95%CI = [1.4 - 16.5%]). However, ZIKV dissemination was only observed for two mosquitoes of the AG_TBassin line at 21 dpe (DE = 5.0%, 95%CI = [1.4 - 16.5%]), and no transmission was detected (Table S2).

***Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* from SWIO are competent for the transmission of DENV-1**

Unlike the previous results observed with the ZIKV strain, all tested *Ae. albopictus* were able to be infected, disseminate and transmit the DENV-1 strain tested (Figure 2 and Table S3). The IR was significantly influenced by the dpe (GLM, $X^2 = 10.272$, $df = 2$, $P = 0.006$) (Table 1), with a significant higher mean value of 57.7% (95%CI = [51.7 - 63.6%]) at 28 dpe all lines combined compared with that of 45.8% (95%CI = [40.2 - 51.5%]) at 21 dpe (Emmeans, z .ratio = 3.058, $P = 0.006$). The IR was also significantly influenced by the mosquito line (GLM, $X^2 = 23.029$, $df = 7$, $P = 0.002$) (Table 1) with the highest mean IR value observed for the AL_Combani line all dpe combined (mean = 74.4%, 95%CI = [59.8 - 85.1%]), significantly higher than those of the AL_Beauvallon (mean = 45.4%, 95%CI = [36.7 - 54.3%]; Emmeans, z .ratio = 3.105, $P = 0.040$) and AL_Providence lines (mean = 40.6%, 95%CI = [32.5 - 49.3%]; Emmeans, z .ratio = 3.663, $P = 0.006$). The mean IR value of the latter line (AL_Providence) was also significantly lower than that of AL_Gilles line all dpe combined (mean = 63.4%, 95%CI = [51.8 - 73.6%]; Emmeans, z .ratio = 3.117, $P = 0.039$). Disseminated DENV-1 infections were noted in almost all lines at each examined dpe, except for the AL_Praslin line where positive heads were reported only at 21 and 28 dpe (Figure 2B and Table S3). The DE was significantly influenced by the dpe ($X^2 = 48.532$, $df = 2$, $P < 0.001$), the mosquito line ($X^2 = 41.201$, $df = 7$, $P < 0.001$), and the interaction

between the dpe and mosquito line (GLM, $X^2 = 26.487$, $df = 11$, $P = 0.005$) (Table 1). Indeed, the DE value of some mosquito lines increased significantly over time, such as between 14 and 21 dpe for AL_Beuvallon (Emmeans, $z.ratio = 2.591$, $P = 0.026$), between 14 and 28 dpe for AL_Gilles (Emmeans, $z.ratio = 3.130$, $P = 0.005$) and AL_Providence (Emmeans, $z.ratio = 2.846$, $P = 0.012$), and between 21 and 28 dpe for AL_Combani (Emmeans, $z.ratio = 2.684$, $P = 0.007$) (Figure 2B and Table S3). Moreover, for a specific dpe, the DE value could vary depending on the mosquito line. At 21 dpe, the AL_Combani line showed a significantly higher DE value of 83.3% (95%CI = [64.1 – 93.3%]) compared to the DEs of all the other *Ae. albopictus* lines (all Emmeans, $3.525 < z.ratio < 4.510$, $P < 0.010$) ranging from 12.5% (for AL_Philippe, 95%CI = [4.3 – 31.0%]) to 31.3% (for AL_Kaweni, 95%CI = [18.0 – 48.6%]), with the exception of the AL_Beuvallon line (mean = 44.7%, 95%CI = [31.4 – 58.8%]; Emmeans, $z.ratio = 2.934$, $P = 0.066$) (Figure 2B and Table S3). The only significant difference found at 28 dpe was between the lowest DE value of 14.6% (95%CI = [7.2 – 27.2%]) shown by the AL_Moroni line compared with the highest of 56.5% (95%CI = [36.8 – 74.4%]) presented by the AL_Gilles line (Emmeans, $z.ratio = 3.460$, $P = 0.010$) (Figure 2B and Table S3). The effect of this interaction showed different kinetics of DENV propagation in mosquito bodies depending on their line. For example, the AL_Beuvallon line propagated DENV-1 more rapidly in a greater number of mosquitoes than the other lines, as shown by the results at 21 dpe, but this difference disappeared after three weeks (28 dpe). All the mosquito lines tested were able to transmit the DENV-1 at 21 and 28 dpe, and some females from the AL_Kaweni and AL_Beuvallon lines even showed infectious viral particles in their saliva as early as 14 dpe (Figure 2C and Table S3). The TE was significantly influenced by the dpe ($X^2 = 54.944$, $df = 2$, $P < 0.001$) (Table 1) with values increasing significantly with time, from a mean TE of 1.1% at 14 dpe (95%CI = [0.3 – 4.0%]), to 11.9% at 21 dpe (95%CI = [8.7 – 16.1%]), and 57.7% at 28 dpe (95%CI = [18.0 – 28.1%]) (all Emmeans, $3.244 < z.ratio < 4.546$, $P < 0.003$). The TE was also significantly influenced by the mosquito line ($X^2 = 17.597$, $df = 7$, $P = 0.014$) (Table 1) with a higher mean TE of the AL_Beuvallon line (mean = 19.3%, 95%CI = [13.2 – 27.3%]) compared to the AL_Moroni line (mean = 5.47%, 95%CI = [2.7 – 10.9%]; Emmeans, $z.ratio = 3.366$, $P = 0.017$). The geographic region (Comoros archipelago, Seychelles archipelago and Reunion Island) of origin of the mosquito lines was not retained in the GLM models for the three parameters, and thus it did not demonstrate a significant effect on the vector competence parameters. The quantification of viral loads in the saliva of positive samples revealed viral titers of 2.51, and 3.36 \log_{10} PFU/saliva at 14 dpe for the two positive specimens from AL_Kaweni, and AL_Beuvallon, respectively. Since the number of positive samples was too low at 14 dpe (N=2), this dpe was removed from the statistical analyses. At 21 and 28 dpe, the mean viral loads in saliva ranged from 1.70 to 3.70 \log_{10} PFU/saliva and from 1.52 (95%CI = [0.00 – 1.84]) to 3.36 \log_{10} PFU/saliva (95%CI = [2.44 – 3.64]), respectively (Table S3), without any significant statistical difference of the number of PFU/saliva between these two dpe for each mosquito lines analyzed separately (data in Table S3; all Wilcoxon tests, $8 < W < 38$; $P > 0.148$). This result is also true for all the mosquito lines combined (Wilcoxon test, $W = 1,088$, $P = 0.775$) with a mean of 3.14 \log_{10} PFU/saliva (95%CI = [2.79 – 3.34]) at 21 dpe et de 3.06 \log_{10} PFU/saliva (95%CI = [2.72 – 3.24]) at 28 dpe. Due to the absence of significant differences, data

from the two dpe were grouped by population for subsequent analysis. Mosquito line was found to have an effect on the number of PFU in individual saliva (Kruskal-Wallis, $X^2 = 24.127$, $df = 7$, $P = 0.001$), with a median of $1.70 \log_{10}$ PFU/saliva (95%CI = [1.40 – 2.24]) significantly lower for the AL_Gilles line compared with the medians of $2.85 \log_{10}$ PFU/saliva (95%CI = [2.18 – 3.56]) and of $2.62 \log_{10}$ PFU/saliva (95%CI = [2.30 – 3.52]) of the AL_Beauvallon (Dunn test, $D = 3.509$, $P = 0.013$) and AL_Kaweni lines (Dunn test, $D = 3.394$, $P = 0.019$), respectively.

The two *Ae. aegypti* lines tested were also able to be infected, to disseminate and to transmit the DENV-1 strain (Table S3) without any significant difference observed between their vector competence parameters, no effect of the mosquito line being observed on these results (Table 1). Nevertheless, and as for the *Ae. albopictus*, the dpe had a significant effect on the IR (GLM, $X^2 = 11.008$, $df = 2$, $P = 0.004$) and the DE (GLM, $X^2 = 57.198$, $df = 2$, $P < 0.001$) of the *Ae. aegypti* exposed to the DENV-1 strain (Table 1). Indeed, significant increases were observed in the mean IR value rising from 50.0% (95%CI = [40.2 – 59.8%]) to 74.4% (95%CI = [63.7 – 82.7%]) between 21 and 28 dpe both lines combined (Emmeans, z .ratio = 3.226, $P = 0.004$), and in the mean DE value rising from 6.3% (95%CI = [2.5 – 15.0%]) at 14 dpe, to 34.4% (95%CI = [25.6 – 44.3%]) at 21 dpe, and to 64.1% (95%CI = [53.0 – 73.9%]) at 28 dpe both lines combined (all Emmeans, $3.686 < z$.ratio < 5.791 , $P < 0.001$) (Figure 2 and Table S3). Regarding the TE values, although the minimal model selected by AIC criteria contained the parameters dpe, mosquito line, and interaction between them, the last two parameters showed no significant effect on the TE values (GLMs; $X^2 = 0.926$, $df = 1$, $P = 0.336$ for the mosquito line; $X^2 = 6.002$, $df = 2$, $P = 0.0497$ for the interaction), unlike the dpe parameter (GLM, $X^2 = 12.967$, $df = 2$, $P = 0.002$). Thus, another analysis was carried out including only the dpe parameter which still showed a significant effect on the TE value (GLM, $X^2 = 12.403$, $df = 2$, $P = 0.002$), with a significant increase observed between 14 and 28 dpe (EMMEANS, z .ratio = 2.498, $P = 0.033$) from 1.6% (95%CI = [0.3 – 8.3%]) to 17.9% (95%CI = [11.0 – 27.9%]) both lines included. The titration of viral loads in the saliva of mosquitoes showed a titer of $1.70 \log_{10}$ PFU/saliva for the positive specimen from the AG_Moroni line at 14 dpe. At 21 dpe, the titer of the unique positive saliva from the AG_Moroni line was $1.40 \log_{10}$ PFU/saliva, while the mean viral load of the seven positive specimens from the AG_TBassin line was $2.50 \log_{10}$ PFU/saliva (95%CI = [0.00 – 2.90]) (Table S3). Given the low number of samples at 14 dpe and 21 dpe (for AG_Moroni, $N=1$), statistical analyses were carried out only for 28 dpe, and the comparison between the two mosquito lines revealed no significant difference (Wilcoxon test, $W = 32$, $P = 0.228$) in their viral loads with a mean of $2.18 \log_{10}$ PFU/saliva for the AG_TBassin line (95%CI = [0.04 – 2.48]) and of $3.08 \log_{10}$ PFU/saliva for the AG_Moroni line (95%CI = [0.00 – 3.41]) (Table S3).

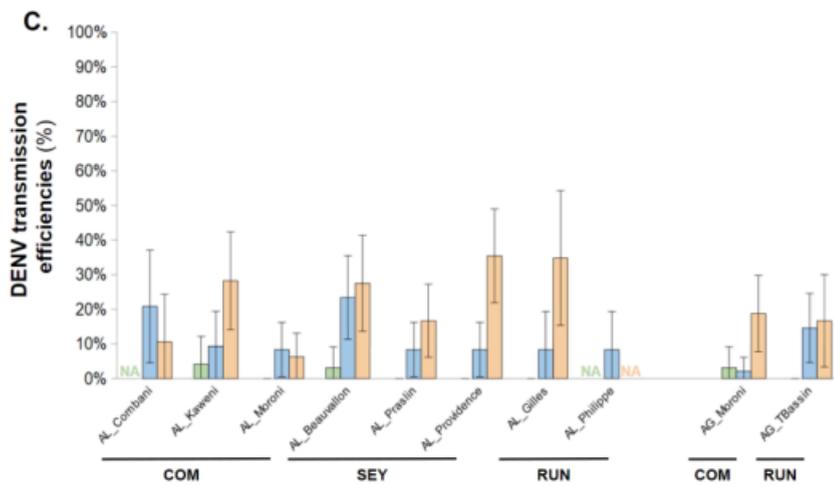
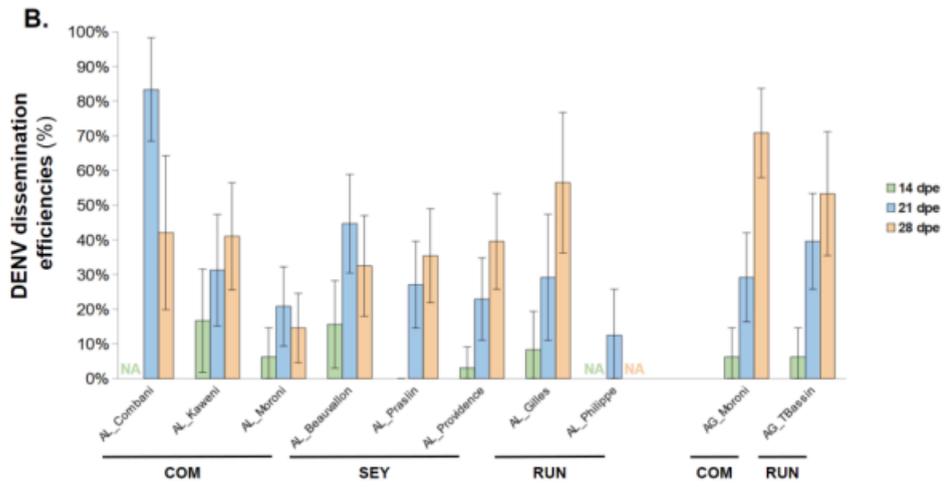
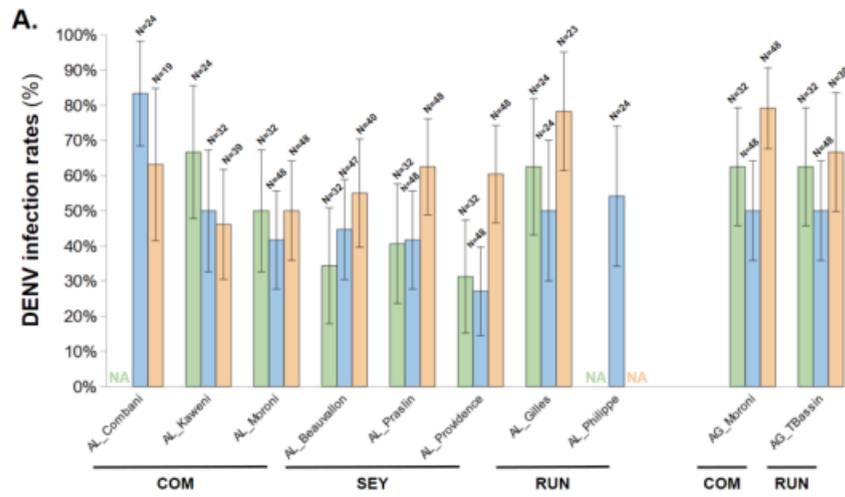


Figure 2. Vector competence parameters of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* lines from SOOI Islands (Comoros archipelago, Seychelles archipelago, and Reunion Island) exposed to the local DENV-1 strain. The graphics A–C correspond respectively to infection rate (IR), dissemination efficiency (DE), and transmission efficiency (TE) for each line tested at 14, 21, and 28 days post exposure (dpe) with the DENV-1. Therefore, mosquitoes were examined for the presence of infectious viral particles, detected by plaque forming unit (PFU) titration on Vero cells, in their body for the IR, head for the DE, and saliva for the TE. The error bars correspond to the 95% confidence interval. COM, Comoros archipelago; SEY, Seychelles archipelago; RUN, Reunion Island; N=X, number of mosquitoes tested; NA, not available.

Table 1. Statistical analyses of vector competence parameters after infections with Dengue virus serotype 1 (DENV-1) and Chikungunya virus (CHIKV). In these analyses, the influence of mosquito lines (AL_Combani, AL_Kaweni, AL_Moroni, AL_Beauvallon, AL_Praslin, AL_Providence, AL_Gilles, AL_Philippe or AG_Moroni, AG_TBassin), and days post-exposure (7 or 14 dpe) were tested for each mosquito species independently (*Ae. albopictus* or *Ae. aegypti*). *d.f.* is the degree of freedom and χ^2 is the Chi-square value. Significance of variables was obtained after GLM based on the selected minimal model. Variables with significant impact in the minimal model are shown in bold. The dashes indicate that the explanatory factor has not been tested in the chosen model.

Virus	Mosquito species	Sources	Infection rate			Dissemination efficiency			Transmission efficiency		
			χ^2	d.f.	p-value	χ^2	d.f.	p-value	χ^2	d.f.	p-value
DENV-1	<i>Aedes albopictus</i>	mosquito line (ML)	23.029	7	0.002	41.201	7	<0.001	17.597	7	0.014
		days post-exposure (dpe)	10.272	2	0.006	48.532	2	<0.001	54.944	2	<0.001
		ML x dpe	-	-	-	26.487	11	0.005	-	-	-
	<i>Aedes aegypti</i>	ML	-	-	-	-	-	-	0.926	1	0.336
		dpe	11.008	2	0.004	57.198	2	<0.001	12.967	2	0.002
		ML x dpe	-	-	-	-	-	-	6.002	2	0.050*
CHIKV	<i>Aedes albopictus</i>	ML	10.787	7	0.148	21.889	7	0.003	18.576	7	0.010
		dpe	0.939	1	0.332	23.042	1	<0.001	11.141	1	<0.001
		ML x dpe	23.670	6	<0.001	14.669	6	0.023	-	-	-
	<i>Aedes aegypti</i>	ML	3.549	1	0.060	10.952	1	<0.001	20.250	1	<0.001
		dpe	-	-	-	5.779	1	0.016	1.382	1	0.240
		ML x dpe	-	-	-	-	-	-	4.949	1	0.026

*precise value : 0.049727

***Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* from SWIO are competent for the transmission of CHIKV**

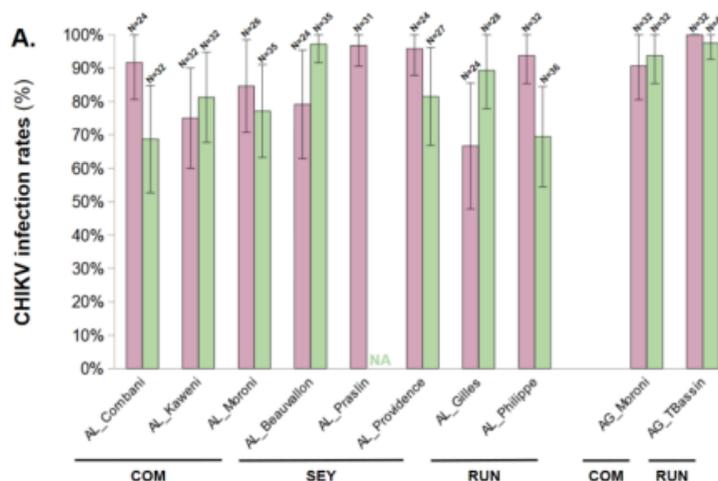
As observed with the DENV-1, all the *Ae. albopictus* lines tested were able to be infected, disseminate and transmit the tested CHIKV strain. First of all, it should be noted that the geographic region (Comoros archipelago, Seychelles archipelago and Reunion Island) of origin of the of the mosquito lines was not retained in the GLM models, and thus this parameter did not demonstrate a significant effect on the vector competence parameters. The IRs were high, ranging from 66.7% (AL_Gilles at 7 dpe, 95%CI = [46.7 – 82.0%]) to 97.1% (AL_Beauvallon at 7 dpe, 95%CI = [85.5 – 99.5%]) (Figure 3A and Table S4). The IRs were significantly influenced by the interaction between mosquito lines and dpe (GLM, $\chi^2 = 23.670$, *df* = 6, *P* < 0.001) (Table 1), with a decrease of the IR value over time for AL_Philippe (Emmeans, *z*.ratio = 2.315, *P* = 0.021)

from 93.8% at 7 dpe (95%CI = [79.9 – 98.3%]) to 69.4% at 14 dpe (95%CI = [53.1 – 82.0%]) (Figure 3A and Table S4). No significant difference was found between the IRs of the mosquito lines at a same dpe. The DE was significantly influenced by the dpe (GLM, $X^2 = 23.042$, $df = 1$, $P < 0.001$), the mosquito line (GLM, $X^2 = 21.889$, $df = 7$, $P = 0.003$), and by the interaction between these two parameters (GLM, $X^2 = 14.669$, $df = 6$, $P = 0.023$) (Table 1). The effect of this interaction showed different kinetics of CHIKV propagation in mosquito bodies depending on their line. Indeed, post-hoc analysis demonstrated a significantly lower DE value of 9.4% (95%CI = [3.2 – 24.2%]) for the AL_Kaweni line at 7 dpe compared to the ones of 50.0% (95%CI = [33.6 – 66.4%]) for the AL-Philippe line (Emmeans, z .ratio = 3.232 $P = 0.030$) and of 54.2% (95%CI = [35.1 – 72.1%]) for the AL_Providence line (Emmeans, z .ratio = 3.328 $P = 0.020$). At 14 dpe, only one significant difference was found, with the AL_Beuvallon line presenting a significant higher DE value (mean = 80.0%, 95%CI = [64.1 – 90.0%]) compared to the AL_Philippe line (mean = 41.7%, 95%CI = [27.1 – 57.8%]). Moreover, the DE value rised over time for the AL_Beuvallon, AL_Gilles, and AL_Kaweni lines (see all DEs values in Table S4 ; all Emmeans, $2.639 < z$.ratio < 3.232 , $P < 0.008$). All tested *Ae. albopictus* lines presented infectious viral particles in their saliva at 7 and 14 dpe, except for the AL_Kaweni line for which infectious viral particles were detected only at 14 dpe (Figure 3C and Table S4). The TE was significantly influenced by the dpe (GLM, $X^2 = 11.141$, $df = 1$, $P < 0.001$), rising from a mean value of 12.0% (95%CI = [8.3 – 17.0%]) at 7 dpe all lines combined to 23.6% at 14 dpe (95%CI = [18.5 – 29.5%] ; Emmeans, z .ratio = 3.215, $P = 0.001$). The TE was also significantly influenced by the mosquito line (GLM, $X^2 = 18.576$, $df = 7$, $P = 0.010$), with a significantly lower mean TE value of 6.3% (95%CI = [2.5 – 15.0%]) both dpe combined for AL_Kaweni compared to the ones of 29.4% (95%CI = [18.7 – 43.0%] ; Emmeans, z .ratio = 3.051, $P = 0.047$) and 30.8% (95%CI = [19.9 – 44.3%] ; Emmeans, z .ratio = 3.167, $P = 0.033$) for the AL_Providence and AL_Gilles lines, respectively. The titration of viral load in positive saliva showed means ranging from 2.02 (95%CI = [1.58 – 2.24]) to 3.83 (95%CI = [0.00 – 4.36]) \log_{10} PFU/saliva and from 2.12 (95%CI = [0.20 – 2.42]) to 3.57 (95%CI = [0.00 – 3.95]) \log_{10} PFU/saliva at 7 and 14 dpe, respectively (Table S4). The mean viral load showed to raise significantly over time for the lines of AL_Combani (Wilcoxon test, $W < 0.1$, $P = 0.047$), AL_Philippe (Wilcoxon test, $W = 3$, $P = 0.042$), and AL_Gilles (Wilcoxon test, $W = 6$, $P = 0.033$) (Table S4), or for all the mosquito lines combined (Wilcoxon test, $W = 328$, $P < 0.001$) with a mean passing from 3.19 \log_{10} PFU/saliva at 7 dpe (95%CI = [2.50 – 3.45]) to 3.56 \log_{10} PFU/saliva at 14 dpe (95%CI = [3.17 – 3.76]). Pairwise comparisons between mosquito lines did not reveal a significant difference between mosquito lines either at 7 dpe (Kruskal-Wallis test, $X^2 = 12,787$, $df = 6$, $P = 0.047$, but all Dunn tests $P > 0,09$), or at 14 dpe (Kruskal-Wallis test, $X^2 = 6,582$, $df = 6$, $P = 0.361$).

The two *Ae. aegypti* lines tested were also able to be infected, to disseminate and to transmit the CHIKV strain (Table S4). The IRs, ranging from 90.6% (95%CI = [75.8 – 96.8%]) to 100.0% (95%CI = [89.3 – 100.0%]) for the two dpe and the two lines tested (Figure 3 and Table S4), appeared to be unaffected by the variable « mosquito line » (GLM, $X^2 = 3.549$, $df = 1$, $P = 0.060$), only variable retained for the GLM by the AIC selection process (Table 1). The DE, for its part, was significantly influenced by the dpe (GLM, $X^2 = 5.779$, $df = 1$, $P = 0.016$), rising over time

with a higher mean DE value at 14 dpe both lines combined (mean = 87.5, 95%CI = [77.9 – 93.3%]) than at 7 dpe (mean = 70.3, 95%CI = [58.2 – 80.1%] ; Emmeans, z.ratio = 2.334, $P = 0.012$). The mosquito line also had a significant effect on the DE (GLM, $X^2 = 10.952$, $df = 1$, $P < 0.001$), with a higher mean DE value of 90.3% both dpe combined (95%CI = [81.3 – 95.2%]) for the AG_TBassin line compared with that of 67.2% (95%CI = [55.0 – 77.4%]) for the AG_Moroni line (Emmeans, z.ratio = 3.107, $P = 0.002$) (Figure 3B). The TE was significantly influenced by the mosquito line (GLM, $X^2 = 20.250$, $df = 1$, $P < 0.001$) and the interaction between mosquito line and dpe (GLM, $X^2 = 4.949$, $df = 1$, $P = 0.026$) (Table 1). Indeed, the TE value of the AG_Moroni line rised over time from 9.4% (95%CI = [3.2 – 24.2%]) at 7 dpe to 34.4% (95%CI = [20.4 – 51.7%]) at 14 dpe (Emmeans, z.ratio = 2.280, $P = 0.023$), and this TE value of 9.4% observed for the AG_Moroni line at 7 dpe was significantly lower compared to the one of 62.5% (95%CI = [45.3 – 77.1%]) shown by the AG_TBassin line (Emmeans, z.ratio = 3.926, $P < 0.001$). The effect of this interaction showed different kinetics of CHIKV spread in saliva according to mosquito line, with a greater proportion of females of the AG_TBassin line becoming infectious more rapidly than the ones of the AG_Moroni line, a difference that dissipated over time with no difference found between the TEs of the two lines at 14 dpe.

The titration of viral load in positive saliva showed a significant decrease from a mean of 3.99 \log_{10} PFU/saliva at 7 dpe (95%CI = [0.00 – 4.54]) to that of 1.95 \log_{10} PFU/saliva at 14 dpe (95%CI = [1.59 – 2.13]) for AG_Moroni (Wilcoxon test, $W < 0.1$, $P = 0.012$), and from a mean of 3.83 \log_{10} PFU/saliva (95%CI = [3.51 – 4.01]) to that of 2.81 \log_{10} PFU/saliva (95%CI = [2.30 – 3.04]) for AG_TBassin (Wilcoxon test, $W = 20$, $P < 0.001$) (Table S4). The two *Ae. aegypti* lines did not present significant difference in their saliva viral load at 7 dpe (Wilcoxon test, $W = 37.5$, $P = 0.52$), while at 14 dpe, the viral loads in mosquitoes saliva from the AG_TBassin line were significantly higher than that of mosquitoes from the AG_Moroni line (Wilcoxon test, $W = 37.5$, $P = 0.001$) (Table S4).



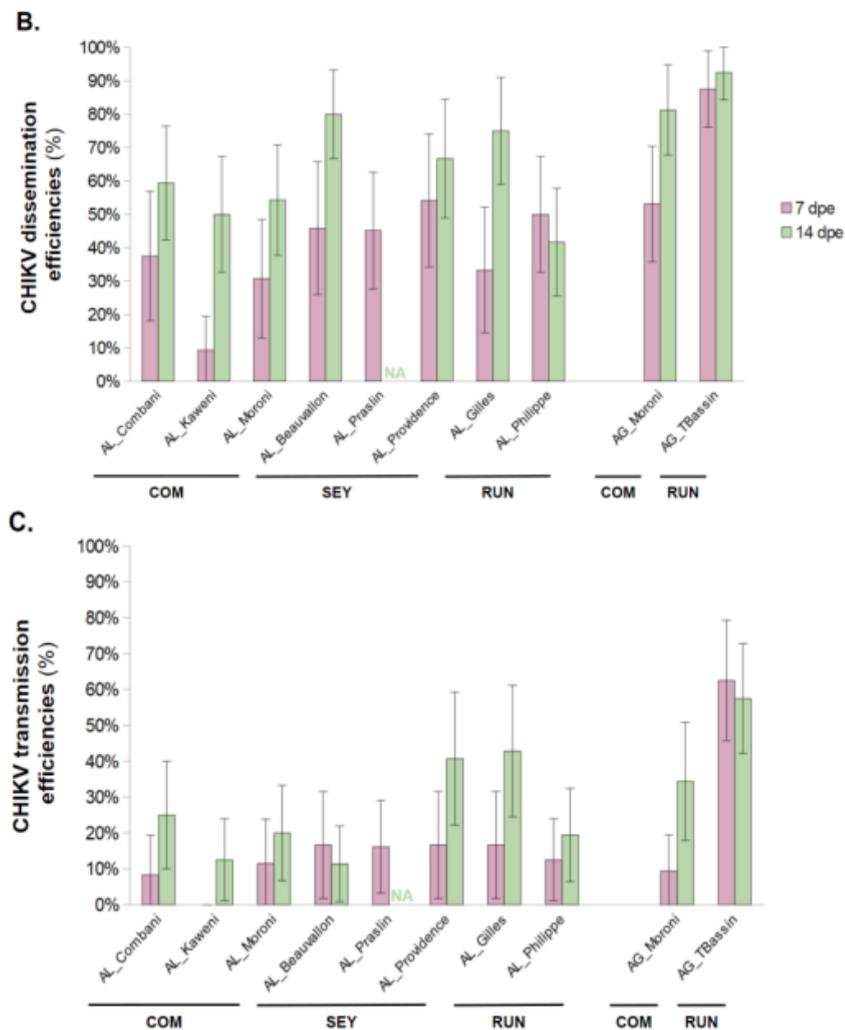


Figure 3. Vector competence parameters of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* lines from SOOI islands (Comoros archipelago, Seychelles archipelago, and Reunion Island) infected with an epidemic local CHIKV strain. The graphics A–C correspond respectively to infection rate (IR), dissemination efficiency (DE), and transmission efficiency (TE) for each mosquito line tested at 7 and 14 days post exposure (dpe) with the CHIKV. Therefore, mosquitoes were examined for the presence of infectious viral particles, detected by plaque forming unit (PFU) titration on Vero cells, in their body for the IR, head for the DE, and saliva for the TE. The error bars correspond to the 95% confidence interval. COM, Comoros archipelago; SEY, Seychelles archipelago; RUN, Reunion Island; N=X, number of mosquitoes tested; NA, not available.

Discussion

In the present study, we aimed to examine the vector competence of eight *Ae. albopictus* and two *Ae. aegypti* lines collected on different islands within Comoros archipelago, Seychelles

archipelago and on Reunion Island in the SWIO. The results showed no transmission of the ZIKV strain (PF-25013-18) for all tested lines from both mosquito species. At the opposite all tested mosquito lines were susceptible to infection with the epidemic DENV-1 and CHIKV local strains, supported viral dissemination, and were able to experimentally transmit these viruses. It should be noted that the different vector competence parameters were higher for CHIKV (IR from 66.7 to 100.0%; DE from 9.4 to 92.5%; TE from 0.0 to 62.5%) relative to DENV-1 (IR from 27.1 to 83.3%; DE from 0.0 to 83.3%; TE from 0.0 to 35.4%). The analyses showed that the vector competence parameters for DENV-1 and CHIKV were globally modulated by the mosquito lines and/or by the dpe, but not by the geographic region (Comoros archipelago, Seychelles archipelago and Reunion Island).

For ZIKV, we have shown that *Aedes spp.* from SWIO do not transmit the PF-25013-18 strain belonging to the Asian lineage, a highly epidemic lineage worldwide. This result is in line with some previous studies on mosquitoes from Reunion Island that have demonstrated an absence or low transmission of other Asian ZIKV, i.e. NC-2014-5132 strain in a first study (Vazeille et al., 2018), and PaRi_2015 and MAS66 strains in a second one (Gomard et al., 2020). It is interesting to note that this absence of vector competence was obtained with field mosquito lines, bred over a limited number of generations in the laboratory, but that in contrast, a 10% TE for the Asian ZIKV NC-2014-5132 was observed in a laboratory *Ae. albopictus* line originally collected in Reunion Island (Bohers et al., 2020). From a more global perspective, vector competence results for mosquitoes of the genus *Aedes spp.* are heterogenous, and depend largely on the viral strains and mosquito lines used in each study (Bisia et al., 2023; Obadia et al., 2022).

The results of our present study show that all *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* lines tested for the SWIO islands can transmit the DENV-1 strain that circulated during the last epidemic in Reunion Island (Hafsia et al., 2023). Overall, the three parameters of vectorial competence towards DENV-1 showed an increase over time for both mosquito species, and also demonstrated to be influenced by the *Ae. albopictus* line observed. For example, the AL_Beauvallon line was one of the lines with the highest DE, TE and salivary viral titer, while the AL_Moroni line was one with the lowest. However, the differences between the parameters of these two lines were not always significant, and it was therefore difficult to establish that the AL-Beauvallon line was a better vector of DENV-1 than the AL-Moroni line. This was also true for the other *Ae. Albopictus* lines. In fact, no obvious pattern of difference in terms of vectorial competence emerged from the study, with the vast majority of mosquito lines showing no significant difference between their vectorial competence parameters. Except in Reunion Island and Mayotte, no other epidemic with a DENV-1 strain has been reported in the rest of the SWIO during the last years (Hafsia et al., 2022). However, our results demonstrated the potential of this particular DENV-1 strain to circulate and emerge in all the SWIO islands, as in the Seychelles archipelago with the AL-Beauvallon line for example. Indeed, with an equivalent TE value and a higher salivary viral titer, the AL_Beauvallon line demonstrated the potential to be as good or even a better vector than the AL-Gilles line from Reunion Island, where the epidemic has already occurred. Although TE is relatively low in our study, averaging 11.9% across all dpe and

tested lines, the high abundance of mosquito vectors on these islands (Boussès et al., 2018) could be one of the factor explaining the large epidemic with significant human health costs as it was the case in Reunion Island. The result of the vector competence for the DENV-1 on the surveyed SWIO islands is in accordance with our other study on the vector competence of eight different lines of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* from Reunion Island using the same viral strain, with an average TE of 13.2% (Hafsia et al., submitted). This similarity between the results for the whole SWIO region and those focusing on Reunion Island underlines the fact that the geographical region within the SWIO has no impact on the vector competence parameters observed, a lack of influence demonstrated in our present study. However, our results are in contradiction with the previous study by Mousson et al. (2012) in Reunion Island, which showed the absence of transmission of a DENV-2 strain by local *Ae. albopictus* due to their natural bi-infection by *Wolbachia* (Mousson et al., 2012). This difference in results reflects the diversity of results found for dengue worldwide, a diversity that can be explained by the choices of mosquito lines, viral strains, as well as the protocols used to carry out these studies (Bohers et al., 2020; Delrieu et al., 2023; Gloria-Soria et al., 2021; Mariconti et al., 2019; Souza-Neto et al., 2019).

For CHIKV, the DE, TE and salivary viral titre were influenced by the dpe, rising over time. The DE and TE were also influenced by the mosquito lines and/or by the mosquito line in interaction with the dpe. The only difference in terms of vector competence that emerged from the study was the fact that the AL_Providence and AL_Gilles lines appeared to be better vectors than the AL_Kaweni line, the formers showing among the highest values for DE, TE, and salivary viral titres, and the latter line showing among the lowest values for these same parameters, although not all the differences between these lines were significant. Overall, we showed an average DE of 55.0% and TE of 22.7% for the SWIO regions, all dpe and all lines combined. Although the tested mosquito lines are different, these results are similar to previous studies carried out in the region with *Aedes spp.* mosquito lines from Reunion Island and Mayotte (Martin et al., 2010; Vazeille et al., 2010, 2007). The results are also consistent with the high incidence of CHIKV epidemics between 2004 and 2006: Grande Comores and Moroni (in Comoros archipelago) and Seychelles archipelago in 2005, Reunion Island between 2005 and 2006, and Mayotte (Comoros archipelago) in 2006 (Kariuki Njenga et al., 2008; Schuffenecker et al., 2006). Our results, although presenting lower TEs, are also in line with previous vector competence studies on American *Aedes spp.* and Italian *Ae. albopictus* lines regarding the transmission of the same CHIKV strain (Severini et al., 2018; Vega-Rúa et al., 2014). This strain has a high affinity for *Ae. albopictus* due to the E1-226V mutation (Martin et al., 2010; Vazeille et al., 2007), which could facilitate epidemic emergence in areas colonized by this vector, such as France (Giunti et al., 2023). Interestingly, the main significant difference observed between CHIKV TEs in our study were found between those of one *Ae. aegypti* line that can be considered laboratory-grown as it was reared for F₃₁ to F₃₇ generations in the insectarium (AG_TBassin), and the other *Ae. aegypti* line (AG_Moroni), which was reared for only two generations in the insectarium. This supports concerns about the impact of laboratory rearing

on vector competence test results already revealed elsewhere (Azar and Weaver, 2019), notably through microbiome modification (Azar and Weaver, 2019; Hegde et al., 2018).

This study showed that in the SWIO region, CHIKV had more affinity with *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* than DENV, and that there is little or no affinity between ZIKV and these mosquito species. This perfectly reflects the epidemiological history of the SWIO region, with numerous small-scale epidemics of DENV prior to 2017 (Hafsia et al., 2022), one major epidemic of CHIKV linked to the aforementioned mutation (Kariuki Njenga et al., 2008; Schuffenecker et al., 2006), and no epidemics of ZIKV. These results are also in line with more global studies (Gloria-Soria et al., 2021; Amraoui et al., 2019; Mariconti et al., 2019; Talbalaghi et al., 2010; Vega-Rua et al., 2013), and contrast with others depending on the virus x mosquito line combinations tested (Bohers et al., 2020; Gutiérrez-Bugallo et al., 2020). Furthermore, the extrinsic incubation period for CHIKV in this study is shorter than that for DENV for all lines after exposure to CHIKV, which is consistent with previous studies (Gloria-Soria et al., 2021; Amraoui et al., 2019; Dubrulle et al., 2009; Souza-Neto et al., 2019; Talbalaghi et al., 2010; Vega-Rua et al., 2013). These differences in extrinsic incubation period and vector competence may be among the factors explaining the fulgurating epidemic of CHIKV compared to DENV-1 observed in Reunion Island, with 266,000 symptomatic cases in 19 months for CHIKV versus nearly 50,000 in approximately three years for DENV-1 (Hafsia et al., 2022; Renault et al., 2012).

Our results demonstrating the influence of the mosquito lines on the TE for CHIKV and DENV highlighted the already widely recognized importance of genotype x genotype interactions in defining vector competence (Azar and Weaver, 2019; Lambrechts et al., 2009). In addition to these interactions, the effects of the environment such as temperature, and other factors such as the nature and number of blood meals, must also be considered (Delrieu et al., 2023; Conway and al., 2014; Armstrong et al., 2020). This implies that, in order to understand vector competence of mosquitoes as accurately as possible, experimental studies must be the best possible reflection of field reality for the vector pathosystem being tested. To achieve this, appropriate protocols must be used, with viral strains, mosquito lines and abiotic conditions as close as possible to those found locally.

Our present study confirmed that an epidemic emergence of ZIKV was unlikely in the SWIO area, at least for the tested viral strain and mosquito lines. It also strengthened vector competence data for epidemic CHIKV transmission in the region, and showed that the risk of epidemic emergence of contemporary DENV-1 in SWIO islands other than Reunion Island and Mayotte should not be underestimated, since all the tested lines are competent vectors. The generated data are of great importance for estimating the risks of epidemic emergence in the SWIO region, where inter-island exchanges of viral strains have already been suspected (Hafsia et al., 2022; Renault et al., 2012). Moreover, the strong economic and cultural links between the islands of SWIO and certain European countries make these islands gateways for the importation of viral strains to this continent. *Aedes spp.* vectors are constantly expanding their range in Europe, particularly *Ae. albopictus* (Giunti et al., 2023), and European human populations are mostly naïve to the three arboviruses studied in this work. Their importation could therefore have serious consequences in terms of public health, and preventing this risk of

epidemic emergence through researches regarding the vector competence of European mosquito lines to transmit contemporary epidemic viral strains circulating in the SWIO would be of interest for alerting local vector and health surveillance systems.

Supplemental informations legends

Table S1. Information on mosquito lines used in the present study for vector competence evaluation with CHIKV, DENV and ZIKV. NA: Not available.

Island (geographic region)	Site	Mosquito species	Line code	Generation	Viruses tested	Number of mosquitoes tested		
						7 dpe	14 dpe	21 dpe
Reunion Island (Reunion Island)	Trois Bassins	<i>Aedes aegypti</i>	AG_TBassin	F31	CHIKV	32	40	NA
					ZIKV	NA	32	40
				F37	DENV	NA	32	48
	Saint Gilles	<i>Aedes albopictus</i>	AL_Gilles	F1	CHIKV	24	28	NA
					ZIKV	NA	NA	NA
				F7	DENV	NA	24	24
	Saint Philippe	<i>Aedes albopictus</i>	AL_Philippe	F2	CHIKV	32	36	NA
					ZIKV	NA	32	31
				F5	DENV	NA	NA	24
Mahe (Seychelles archipelago)	Beauvallo n	<i>Aedes albopictus</i>	AL_Beauvall on	F2	CHIKV	24	35	NA
				F3	ZIKV	32	32	40
				F6	DENV	NA	32	47
	Providenc e	<i>Aedes albopictus</i>	AL_Providenc e	F2	CHIKV	24	27	NA
				F3	ZIKV	24	32	22
				F6	DENV	NA	32	48
Praslin (Seychelles archipelago)	Praslin	<i>Aedes albopictus</i>	AL_Praslin	F3	CHIKV	31	NA	NA
					ZIKV	NA	32	NA
				F6	DENV	NA	32	48
Grande Comore (Comoros archipelago)	Moroni	<i>Aedes aegypti</i>	AG_Moroni	F2	CHIKV	32	32	NA
				F3	ZIKV	32	32	40
				F6	DENV	NA	32	48
		<i>Aedes albopictus</i>	AL_Moroni	F2	CHIKV	26	35	NA
				F3	ZIKV	32	32	40
				F7	DENV	NA	32	48
Mayotte (Comoros archipelago)	Combani	<i>Aedes albopictus</i>	AL_Combani	F4	CHIKV	24	32	NA
				F5	ZIKV	32	32	40
				F8	DENV	NA	NA	24
	Kawéni	<i>Aedes albopictus</i>	AL_Kaweni	F5	CHIKV	32	32	NA
				F6	ZIKV	32	32	40
				F9	DENV	NA	24	32

Table S2. Details on vector competence parameters of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* lines from the SWIO region after exposure to the ZIKV strain. Infection rates (IR), dissemination efficiencies (DE), and transmission efficiencies (TE) are presented for 7, 14, and 21 days post-exposure (dpe) to infectious blood meal. IR = number of infected bodies among the mosquitoes tested (%); DE = number of infected heads among the mosquitoes tested (%); TE = number of infected saliva among the mosquitoes tested (%). The fraction in brackets represents the number of positive samples out of the total number of samples tested, and the numbers in square brackets correspond to the 95% confidence interval. For more details on mosquito lines see the Table S1. NA, Not available.

Mosquito line	7 dpe			14 dpe			21 dpe		
	IR	DE	TE	IR	DE	TE	IR	DE	TE
AL_Combani	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]
AL_Kaweni	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]
AL_Moroni	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]
AG_Moroni	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]
AL_Beauvallon	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/24) [0.0 – 13.8%]	0.0% (0/24) [0.0 – 13.8%]	0.0% (0/24) [0.0 – 13.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]
AL_Praslin	NA	NA	NA	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	NA	NA	NA
AL_Providence	0.0% (0/24) [0.0 – 13.8%]	0.0% (0/24) [0.0 – 13.8%]	0.0% (0/24) [0.0 – 13.8%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/22) [0.0 – 14.9%]	0.0% (0/22) [0.0 – 14.9%]	0.0% (0/22) [0.0 – 14.9%]
AL_Gilles	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
AL_Philippe	NA	NA	NA	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/31) [0.0 – 11.0%]	0.0% (0/31) [0.0 – 11.0%]	0.0% (0/31) [0.0 – 11.0%]
AG_TBassin	28.1% (9/32) [15.6 – 45.4%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	3.1% (1/32) [0.6 – 15.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32)[0.0 – 10.7%]	5.0% (2/40)[1.4 – 16.5%]	5.0% (2/40) [1.4 – 16.5%]	0.0% (0/40) [0.0 – 8.8%]

Table S3. Details on vector competence parameters of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* lines from the SWIO region after exposure to the DENV-1 strain. Infection rates (IR), dissemination efficiencies (DE), and transmission efficiencies (TE) are presented for 14, 21, and 28 days post-exposure (dpe) to infectious blood meal. IR = number of infected bodies among the mosquitoes tested (%); DE = number of infected heads among the mosquitoes tested (%); TE = number of infected saliva among the mosquitoes tested (%); Mean VT = mean of the viral titers found in saliva of the positive sample (log₁₀ PFU/saliva). The fraction in brackets represents the number of positive samples out of the total number of samples tested, and the numbers in square brackets correspond to the 95% confidence interval. For more details on mosquito lines see the Table S1. NA, Not available.

Mosquito line	14 dpe				21 dpe				28 dpe			
	IR	DE	TE	Mean VT (Log ₁₀ PFU/saliva)	IR	DE	TE	Mean VT (Log ₁₀ PFU/saliva)	IR	DE	TE	Mean VT (Log ₁₀ PFU/saliva)
AL_Combani	NA	NA	NA	NA	83.3% (20/24) [64.1 –	83.3% (20/24) [64.1 –	20.8% (5/24) [9.2 –	2.54 [0.00 – 2.97]	63.2% (12/19) [41.0 –	42.1% (8/19) [23.1 –	10.5% (2/19) [2.9 –	1.70 [0.00 – 2.57]

					93.3%	93.3%	40.5%		80.9%	63.7%	31.4%	
AL_Kaweni	66.7% (16/24) [46.7 – 82.0%]	16.7% (4/24) [6.7 – 35.9%]	4.2% (1/24) [0.7 – 20.2%]	2.51 [NA]	50.0% (16/32) [33.6 – 66.4%]	31.3% (10/32) [18.0 – 48.6%]	9.4% (3/32) [3.2 – 24.2%]	3.41 [0.00 – 3.99]	46.2% (18/39) [31.6 – 61.4%]	41.0% (16/39) [27.1 – 56.6%]	28.2% (11/39) [16.5 – 43.8%]	3.04 [2.32 – 3.30]
AL_Moroni	50.0% (16/32) [33.6 – 66.4%]	6.3% (2/32) [1.7 – 20.1%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	NA	41.7% (20/48) [28.8 – 55.7%]	20.8% (10/48) [11.7 – 34.3%]	8.3% (4/48) [3.3 – 19.6%]	3.12 [0.00 – 3.60]	50.0% (24/48) [36.4 – 63.6%]	14.6% (7/48) [7.2 – 27.2%]	6.3% (3/48) [2.1 – 16.8%]	1.52 [0.00 – 1.84]
AG_Moroni	62.5% (20/32) [45.3 – 77.1%]	6.3% (2/32) [1.7 – 20.1%]	3.1% (1/32) [0.6 – 15.7%]	1.70 [NA]	50.0% (24/48) [36.4 – 63.6%]	29.2% (14/48) [18.2 – 43.2%]	2.1% (1/48) [0.4 – 10.9%]	1.40 [NA]	79.2% (38/48) [65.7 – 88.3%]	70.8% (34/48) [56.8 – 81.8%]	18.8% (9/48) [10.2 – 31.9%]	3.08 [0.00 – 3.41]
AL_Beauvallon	34.4% (11/32) [20.4 – 51.7%]	15.6% (5/32) [6.9 – 31.8%]	3.1% (1/32) [0.6 – 15.7%]	3.36 [NA]	44.7% (21/47) [31.4 – 58.8%]	44.7% (21/47) [31.4 – 58.8%]	23.4% (11/47) [13.6 – 37.2%]	3.23 [2.32 – 3.50]	55.0% (22/40) [39.8 – 69.3%]	32.5% (13/40) [20.1 – 48.0%]	27.5% (11/40) [16.1 – 42.8%]	3.36 [2.44 – 3.64]
AL_Praslin	40.6% (13/32) [25.5 – 57.8%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	NA	41.7% (20/48) [28.8 – 55.7%]	27.1% (13/48) [16.6 – 41.0%]	8.3% (4/48) [3.3 – 19.6%]	2.94 [0.00 – 3.51]	62.5% (30/48) [48.4 – 74.8%]	35.4% (17/48) [23.4 – 49.6%]	16.7% (8/48) [8.7 – 29.6%]	2.20 [0.00 – 2.54]
AL_Providence	31.3% (10/32) [18.0 – 48.6%]	3.1% (1/32) [0.6 – 15.7%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	NA	27.1% (13/48) [16.6 – 41.0%]	22.9% (11/48) [13.3 – 36.5%]	8.3% (4/48) [3.3 – 19.6%]	2.69 [0.00 – 3.13]	60.4% (29/48) [46.3 – 73.0%]	39.6% (19/48) [27.0 – 53.7%]	35.4% (17/48) [23.4 – 49.6%]	3.23 [0.00 – 3.53]
AL_Gilles	62.5% (15/24) [42.7 – 78.8%]	8.3% (2/24) [2.3 – 25.8%]	0.0% (0/24) [0.0 – 13.8%]	NA	50.0% (12/24) [31.4 – 68.6%]	29.2% (7/24) [14.9 – 49.2%]	8.3% (2/24) [2.3 – 25.8%]	1.70 [NA]	78.3% (18/23) [58.1 – 90.3%]	56.5% (13/23) [36.8 – 74.4%]	34.8% (8/23) [19.8 – 55.1%]	2.12 [0.00 – 2.47]
AL_Philippe	NA	NA	NA	NA	54.2% (13/24) [35.1 – 72.1%]	12.5% (3/24) [4.3 – 31.0%]	8.3% (2/24) [2.3 – 25.8%]	3.70 [0.00 – 4.83]	NA	NA	NA	NA
AG_TBassin	62.5% (20/32) [45.3 – 77.1%]	6.3% (2/32) [1.7 – 20.1%]	0.0% (0/32) [0.0 – 10.7%]	NA	50.0% (24/48) [36.4 – 63.6%]	39.6% (19/48) [27.0 – 53.7%]	14.6% (7/48) [7.2 – 27.2%]	2.50 [0.00 – 2.90]	66.7% (20/30) [48.8 – 80.8%]	53.3% (16/30) [36.1 – 69.8%]	16.7% (5/30) [7.3 – 33.6%]	2.18 [0.04 – 2.48]

Table S4. Details on vector competence parameters of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* lines from the SWIO region after exposure to the CHIKV strain. Infection rates (IR), dissemination efficiencies (DE), and transmission efficiencies (TE) are presented for 7, and 14 days post-exposure (dpe) to infectious blood meal. IR = number of infected bodies among the mosquitoes tested (%); DE = number of infected heads among the mosquitoes tested (%); TE = number of infected saliva among the mosquitoes tested (%); VT = mean of the viral titers found in saliva of the positive sample (log₁₀ PFU/saliva). The fraction in brackets represents the number of positive samples out of the total number of samples tested, and the numbers in square brackets correspond to the 95% confidence interval. For more details on mosquito lines see the Table S1. NA, Not available.

Mosquito line	7 dpe				14 dpe			
	IR	DE	TE	Mean VT (Log ₁₀ PFU/saliva)	IR	DE	TE	Mean VT (Log ₁₀ PFU/saliva)
AL_Combani	91.7% (22/24) [74.2 – 97.7%]	37.5% (9/24) [21.2 – 57.3%]	8.3% (2/24) [2.3 – 25.8%]	3.18 [0.00 – 3.90]	68.8% (22/32) [51.4 – 82.0%]	59.4% (19/32) [42.3 – 74.5%]	25.0% (8/32) [13.3 – 42.1%]	2.12 [0.20 – 2.42]
AL_Kaweni	75.0% (24/32) [57.9 –]	9.4% (3/32) [3.2 –]	0.0% (0/32) [0.0 –]	NA	81.3% (26/32) [64.7 –]	50.0% (16/32) [33.6 –]	12.5% (4/32) [5.0 –]	2.59 [0.00 – 3.04]

	86.7% 84.6% (22/26) [66.5 – 93.8%]	24.2% 30.8% (8/26) [16.5 – 50.0%]	10.7% 11.5% (3/26) [4.0 – 29.0%]		91.1% 77.1% (27/35) [61.0 – 87.9%]	66.4% 54.3% (19/35) [38.2 – 69.5%]	28.1% 20.0% (7/35) [10.0 – 35.9%]	
AL_Moroni				3.37 [0.00 – 3.91]				2.88 [0.00 – 3.19]
AG_Moroni	90.6% (29/32) [75.8 – 96.8%]	53.1% (17/32) [36.4 – 69.1%]	9.4% (3/32) [3.2 – 24.2%]	3.99 [0.00 – 4.54]	93.8% (30/32) [79.9 – 98.3%]	81.3% (26/32) [64.7 – 91.1%]	34.4% (11/32) [20.4 – 51.7%]	1.95 [1.59 – 2.13]
AL_Beauvallon	79.2% (19/24) [59.5 – 90.8%]	45.8% (11/24) [27.9 – 64.9%]	16.7% (4/24) [6.7 – 35.9%]	3.52 [0.00 – 3.84]	97.1% (34/35) [85.5 – 99.5%]	80.0% (28/35) [64.1 – 90.0%]	11.4% (4/35) [4.5 – 26.0%]	2.26 [0.00 – 2.59]
AL_Praslin	96.8% (30/31) [83.8 – 99.4%]	45.2% (14/31) [29.2 – 62.2%]	16.1% (5/31) [7.1 – 32.6%]	2.02 [1.58 – 2.24]	NA	NA	NA	NA
AL_Providence	95.8% (23/24) [79.8 – 99.3%]	54.2% (13/24) [35.1 – 72.1%]	16.7% (4/24) [6.7 – 35.9%]	3.83 [0.00 – 4.36]	81.5% (22/27) [63.3 – 91.8%]	66.7% (18/27) [47.8 – 81.4%]	40.7% (11/27) [24.5 – 59.3%]	3.57 [0.00 – 3.95]
AL_Gilles	66.7% (16/24) [46.7 – 82.0%]	33.3% (8/24) [18.0 – 53.3%]	16.7% (4/24) [6.7 – 35.9%]	3.74 [0.00 – 4.15]	89.3% (25/28) [72.8 – 96.3%]	75.0% (21/28) [56.6 – 87.3%]	42.9% (12/28) [26.5 – 60.9%]	3.34 [0.00 – 3.76]
AL_Philippe	93.8% (30/32) [79.9 – 98.3%]	50.0% (16/32) [33.6 – 66.4%]	12.5% (4/32) [5.0 – 28.1%]	3.72 [0.00 – 4.20]	69.4% (25/36) [53.1 – 82.0%]	41.7% (15/36) [27.1 – 57.8%]	19.4% (7/36) [9.8 – 35.0%]	2.97 [0.00 – 3.35]
AG_TBassin	100.0% (32/32) [89.3 – 100.0%]	87.5% (28/32) [71.9 – 95.0%]	62.5% (20/32) [45.3 – 77.1%]	3.83 [3.51 – 4.01]	97.5% (39/40) [87.1 – 99.6%]	92.5% (37/40) [80.1 – 97.4%]	57.5% (23/40) [42.2 – 71.5%]	2.81 [2.30 – 3.04]

Funding

This work was funded by the European Regional Development Funds (ERDF) PO INTERREG through VECTOBIOMES project, number RE0009962. SH was supported by a European Regional development Fund Dired/20181182 from the Conseil Régional de La Reunion. YG was supported by a post-doctoral fellowship provided by the VECTOBIOMES project. The CARBO Cohort which enabled us to acquire the DENV-1 strain was supported by a grant from the French Ministry of Health (PHRC, 2009, n°29-01), the French network for Research and Action targeting emerging infectious diseases (REACTING).

Acknowledgements

We thank all collaborators from Union of the Comoros for their help on the field, in labs and transport of samples: Mohamed Salim Ben Said Hafi (General Directors of Health, Anjouan), Djamaldine Mohamed Sambi (General Directors of Health, Mohéli) and Daanti Mouhtal Elhad and Idami Ousseni (PNLP, Anjouan), Yousra Ahamada Ali (PNLP, Mohéli), Youssouf Ismainla and Amblat Ali Ahmed (PNLP, Moroni). We thank all collaborators from Mayotte for their help on the field and in labs: Ismael Nahouda, Mikidachi Said and Mourssalina Haraouna (ARS). We thank Louis Collet (Centre Hospitalier de Mayotte) for his help in the storage and transport of samples. We are grateful to collaborators from Seychelles to their help on the field, in labs, the storage and transport of samples: Kerina Jean-Baptiste, Merna

Amade, Nerrick Fred (Ministry of Health), Leon Biscornet and Brigitte Pool (Seychelles Public Health Laboratory). We thank Aymeric Lecouffe (Direction de l'Alimentation et de l'Agriculture et de la Forêt, DAAF, Reunion Island) and Ashley Dias (Ministry of Environment, Energy and Climate Change, Seychelles) for their help for administrative documents. We would like to thank Mai-Lormeau and Didier Musso for kindly providing the ZIKV strain PF-25013-18.

Ethics

Authorizations to import mosquitoes in the BSL3 PLATIN-OI (Plateau Infectiologie Océan Indien) on Reunion Island were provided by the DAAF of Reunion Island under the following numbers FR/974/19/012, FR/974/19/013 and FR/974/19/014 for samples from Mayotte, Seychelles and Union of the Comoros, respectively. In Seychelles, the research was approved by the SEYCHELLES BUREAU OF STANDARDS (SBS) under the Research Approval Letter A0175. For experimental infection, the blood was obtained from rabbits which were housed in the animal laboratory of Cyclotron Reunion Océan Indien (CYROI) on Reunion Island. Experimental procedures were conducted in the BSL3 facility PLATIN-OI (Plateau Infectiologie Océan Indien) and performed according to the guidelines for care and use of laboratory animals of European Council Directive 2010/63/EU approved by Ethic Committee of Reunion Island and registered under the reference APAFIS #16365-2018020611417370 v4.

Availability of data and materials

All data generated or analysed during this study are included in this published article.

References

- Alout, H., Krajacich, B.J., Meyers, J.I., Grubaugh, N.D., Brackney, D.E., Kobylinski, K.C., Diclaro, J.W., Bolay, F.K., Fakoli, L.S., Diabaté, A., Dabiré, R.K., Bougma, R.W., Foy, B.D., 2014. Evaluation of ivermectin mass drug administration for malaria transmission control across different West African environments. *Malar. J.* 13, 417. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-13-417>
- Amraoui, F., Ayed, W.B., Madec, Y., Faraj, C., Himmi, O., Btissam, A., Sarih, M., Failloux, A.-B., 2019. Potential of *Aedes albopictus* to cause the emergence of arboviruses in Morocco. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 13, e0006997. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006997>
- Atyame, C.M., Alout, H., Mousson, L., Vazeille, M., Diallo, M., Weill, M., Failloux, A.-B., 2019. Insecticide resistance genes affect *Culex quinquefasciatus* vector competence for West Nile virus. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* 286, 20182273. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2273>
- Aubry, F., Martynow, D., Baidaliuk, A., Merkling, S.H., Dickson, L.B., Romero-Vivas, C.M., Vega-Rúa, A., Dusfour, I., Jiolle, D., Paupy, C., Mayanja, M.N., Lutwama, J.J., Kohl, A., Duong, V., Ponlawat, A., Cao-Lormeau, V.-M., Jarman, R.G., Diagne, C.T., Faye, Oumar, Faye, Ousmane, Sall, A.A., Lambrechts, L., 2018. Worldwide survey reveals lower susceptibility of African *Aedes aegypti* mosquitoes to diverse strains of Zika virus. <https://doi.org/10.1101/342741>
- Azar, S.R., Roundy, C.M., Rossi, S.L., Huang, J.H., Leal, G., Yun, R., Fernandez-Salas, I., Vitek, C.J., Paploski, I.A.D., Stark, P.M., Vela, J., Debboun, M., Reyna, M., Kitron, U., Ribeiro, G.S., Hanley, K.A., Vasilakis, N., Weaver, S.C., 2017. Differential Vector Competency of *Aedes albopictus* Populations from the Americas for Zika Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 97, 330–339. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0969>
- Azar, S.R., Weaver, S.C., 2019. Vector Competence: What Has Zika Virus Taught Us? *Viruses* 11, 867. <https://doi.org/10.3390/v11090867>
- Bisia, M., Montenegro-Quinoñez, C.A., Dambach, P., Deckert, A., Horstick, O., Kolimenakis, A., Louis, V.R., Manrique-Saide, P., Michaelakis, A., Runge-Ranzinger, S., Morrison, A.C., 2023. Secondary vectors of Zika Virus, a systematic review of laboratory vector competence studies. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 17, e0011591. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011591>
- Bohers, C., Mousson, L., Madec, Y., Vazeille, M., Rhim, A., M'ghirbi, Y., Bouattour, A., Failloux, A.-B., 2020. The recently introduced *Aedes albopictus* in Tunisia has the potential to transmit chikungunya, dengue and

- Zika viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008475. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008475>
- Boussès, P., Le Goff, G., Robert, V., 2018. Inventaire des moustiques (Diptera : Culicidae) des îles du sud-ouest de l'océan Indien, Madagascar excepté — Une revue critique. *Ann. Société Entomol. Fr.* NS 54, 89–110. <https://doi.org/10.1080/00379271.2018.1429951>
- Delrieu, M., Martinet, J.-P., O'Connor, O., Viennet, E., Menkes, C., Burtet-Sarramegna, V., D. Frentiu, F., Dupont-Rouzeyrol, M., 2023. Temperature and transmission of chikungunya, dengue, and Zika viruses: A systematic review of experimental studies on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Curr. Res. Parasitol. Vector-Borne Dis.* 4, 100139. <https://doi.org/10.1016/j.crvpbd.2023.100139>
- Deng, J., Guo, Y., Su, X., Liu, S., Yang, W., Wu, Y., Wu, K., Yan, G., Chen, X.-G., 2021. Impact of deltamethrin-resistance in *Aedes albopictus* on its fitness cost and vector competence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, e0009391. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009391>
- 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, e5895. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005895>
- Fernandes, R.S., O'Connor, O., Bersot, M.I.L., Girault, D., Dokunengo, M.R., Pocquet, N., Dupont-Rouzeyrol, M., Lourenço-de-Oliveira, R., 2020. Vector Competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia for Three Zika Virus Lineages. *Pathog. Basel Switz.* 9, 575. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070575>
- Fox, J., Weisberg, S., 2019. *An R Companion to Applied Regression, Third Edition*. ed. Sage Publications.
- Gaythorpe, K.A., Hamlet, A., Jean, K., Garkauskas Ramos, D., Cibrelus, L., Garske, T., Ferguson, N., 2021. The global burden of yellow fever. *eLife* 10, e64670. <https://doi.org/10.7554/eLife.64670>
- Giunti, G., Becker, N., Benelli, G., 2023. Invasive mosquito vectors in Europe: From bioecology to surveillance and management. *Acta Trop.* 239, 106832. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106832>
- Gloria-Soria, A., Payne, A.F., Bialosuknia, S.M., Stout, J., Mathias, N., Eastwood, G., Ciota, A.T., Kramer, L.D., Armstrong, P.M., 2021. Vector Competence of *Aedes albopictus* Populations from the Northeastern United States for Chikungunya, Dengue, and Zika Viruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 104, 1123–1130. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0874>
- Gomard, Y., Lebon, C., Mavingui, P., Atyame, C.M., 2020. Contrasted transmission efficiency of Zika virus strains by mosquito species *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Reunion Island. *Parasit. Vectors* 13, 398. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04267-z>
- Gutiérrez-Bugallo, G., Boullis, A., Martínez, Y., Hery, L., Rodríguez, M., Bisset, J.A., Vega-Rúa, A., 2020. Vector competence of *Aedes aegypti* from Havana, Cuba, for dengue virus type 1, chikungunya, and Zika viruses. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 14, e0008941. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008941>
- Gutiérrez-López, R., Puente, J.M. la, Gangoso, L., Soriguer, R., Figuerola, J., 2020. Plasmodium transmission differs between mosquito species and parasite lineages. *Parasitology* 147, 441–447. <https://doi.org/10.1017/S0031182020000062>
- Hafsia, S., Barbar, T., Wilkinson, D.A., Atyame, C., Biscornet, L., Bibi, J., Louange, M., Gedeon, J., De Santis, O., Flahault, A., Cabie, A., Bertolotti, A., Mavingui, P., 2023. Genetic characterization of dengue virus serotype 1 circulating in Reunion Island, 2019–2021, and the Seychelles, 2015–2016. *BMC Infect. Dis.* 23, 294. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08125-y>
- Hafsia, S., Haramboure, M., Wilkinson, D.A., Baldet, T., Yemadje-Menudier, L., Vincent, M., Tran, A., Atyame, C., Mavingui, P., 2022. Overview of dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 16, e0010547. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010547>
- Hegde, S., Khanipov, K., Albayrak, L., Golovko, G., Pimenova, M., Saldaña, M.A., Rojas, M.M., Hornett, E.A., Motl, G.C., Fredregill, C.L., Dennett, J.A., Debboun, M., Fofanov, Y., Hughes, G.L., 2018. Microbiome Interaction Networks and Community Structure From Laboratory-Reared and Field-Collected *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquito Vectors. *Front. Microbiol.* 9.
- Josseran, L., Paquet, C., Zehgnoun, A., Caillere, N., Le Tertre, A., Solet, J.-L., Ledrans, M., 2006. Chikungunya Disease Outbreak, Reunion Island. *Emerg. Infect. Dis.* 12, 1994–1995. <https://doi.org/10.3201/eid1212.060710>
- Kariuki Njenga, M., Nderitu, L., Ledermann, J.P., Ndirangu, A., Logue, C.H., Kelly, C.H.L., Sang, R., Sergon, K., Breiman, R., Powers, A.M., 2008. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *J. Gen. Virol.* 89, 2754–2760. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/005413-0>
- Kraemer, M.U.G., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne, A., Shearer, F.M., Brady, O.J., Messina, J.P., Barker, C.M., Moore, C.G., Carvalho, R.G., Coelho, G.E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Wint, G.R.W., Elyazar, I.R.F., Teng, H.-J., Hay, S.I., 2015. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Sci. Data* 2, 150035. <https://doi.org/10.1038/sdata.2015.35>

- 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. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-160>
- Mariconti, M., Obadia, T., Mousson, L., Malacrida, A., Gasperi, G., Failloux, A.-B., Yen, P.-S., 2019. Estimating the risk of arbovirus transmission in Southern Europe using vector competence data. *Sci. Rep.* 9, 17852. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-54395-5>
- Martin, E., Moutailler, S., Madec, Y., Failloux, A.-B., 2010. Differential responses of the mosquito *Aedes albopictus* from the Indian Ocean region to two chikungunya isolates. *BMC Ecol.* 10, 8. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-10-8>
- McKenzie, B.A., Wilson, A.E., Zohdy, S., 2019. *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PLOS ONE* 14, e0216794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216794>
- Ministry of Health - Seychelles, 2017. Health of our nation: health sector performance report 2017.
- 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, e1989. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001989>
- Obadia, T., Gutierrez-Bugallo, G., Duong, V., Nuñez, A.I., Fernandes, R.S., Kamgang, B., Hery, L., Gomard, Y., Abbo, S.R., Jiolle, D., Glavinic, U., Dupont-Rouzeyrol, M., Atyame, C.M., Pocquet, N., Boyer, S., Dauga, C., Vazeille, M., Yébakima, A., White, M.T., Koenraadt, C.J.M., Mavingui, P., Vega-Rua, A., Veronesi, E., Pijlman, G.P., Paupy, C., Busquets, N., Lourenço-de-Oliveira, R., De Lamballerie, X., Failloux, A.-B., 2022. Zika vector competence data reveals risks of outbreaks: the contribution of the European ZIKAlliance project. *Nat. Commun.* 13, 4490. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32234-y>
- Paaijmans, K.P., Cator, L.J., Thomas, M.B., 2013. Temperature-Dependent Pre-Bloodmeal Period and Temperature-Driven Asynchrony between Parasite Development and Mosquito Biting Rate Reduce Malaria Transmission Intensity. *PLOS ONE* 8, e55777. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0055777>
- 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, 1177–1185. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
- Paupy, C., Girod, R., 2001. Population structure of *Aedes albopictus* from La ReÅ union Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to a dengue virus 11.
- Puntasecca, C.J., King, C.H., LaBeaud, A.D., 2021. Measuring the global burden of chikungunya and Zika viruses: A systematic review. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 15, e0009055. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009055>
- Quan, T.M., Thao, T.T.N., Duy, N.M., Nhat, T.M., Clapham, H., 2020. Estimates of the global burden of Japanese encephalitis and the impact of vaccination from 2000-2015. *eLife* 9, e51027. <https://doi.org/10.7554/eLife.51027>
- Renault, P., Ballez, E., D'Ortenzio, E., Bâville, M., Filleul, L., 2012. Epidemiology of chikungunya infection on Reunion Island, Mayotte, and neighboring countries. *Médecine Mal. Infect.* 42, 93–101. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2011.12.002>
- Russell, V.L., 2021. Emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. R package version 1.5.5.1. <https://CRAN.R-project.org/package=emmeans>
- Santé Publique France, 2021. Points Épidémiologiques - Dengue - Océan Indien [WWW Document]. URL <https://www.santepubliquefrance.fr/recherche/#search=dengue&themes=dengue®ions=Oc%C3%A9an%20Indien> (accessed 9.8.21).
- Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M.-C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J.-M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M.-P., Bréhin, A.-C., Cubito, N., Desprès, P., Kunst, F., Rey, F.A., Zeller, H., Brisse, S., 2006. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLoS Med.* 3, e263. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>
- Severini, F., Boccolini, D., Fortuna, C., Luca, M.D., Toma, L., Amendola, A., Benedetti, E., Minelli, G., Romi, R., Venturi, G., Rezza, G., Remoli, M.E., 2018. Vector competence of Italian *Aedes albopictus* populations for the chikungunya virus (E1-226V). *PLoS Negl. Trop. Dis.* 12, e0006435. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006435>
- Souza-Neto, J.A., Powell, J.R., Bonizzoni, M., 2019. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect. Genet. Evol.* 67, 191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>
- Talbalaghi, A., Moutailler, S., Vazeille, M., Failloux, A.-B., 2010. Are *Aedes albopictus* or other mosquito species from northern Italy competent to sustain new arboviral outbreaks? *Med. Vet. Entomol.* 24, 83–87. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2009.00853.x>
- Tsai, C.-H., Chen, T.-H., Lin, C., Shu, P.-Y., Su, C.-L., Teng, H.-J., 2017. The impact of temperature and *Wolbachia* infection on vector competence of potential dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the

- transmission of dengue virus serotype 1 in southern Taiwan. *Parasit. Vectors* 10, 551. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2493-x>
- 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, e201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>
- Vazeille, M., Dehecq, J.-S., Failloux, A.-B., 2018. Vectorial status of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* of La Réunion Island for Zika virus. *Med. Vet. Entomol.* 32, 251–254. <https://doi.org/10.1111/mve.12284>
- Vazeille, M., Mousson, L., Martin, E., Failloux, A.-B., 2010. Orally Co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, Can Deliver Both Dengue and Chikungunya Infectious Viral Particles in Their Saliva. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4, e706. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000706>
- Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., Thiria, J., Dehecq, J.-S., Fontenille, D., Schuffenecker, I., Despres, P., 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, e1168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001168>
- Vega-Rúa, A., Marconini, M., Madec, Y., Manni, M., Carraretto, D., Gomulski, L.M., Gasperi, G., Failloux, A.-B., Malacrida, A.R., 2020. Vector competence of *Aedes albopictus* populations for chikungunya virus is shaped by their demographic history. *Commun. Biol.* 3, 326. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1046-6>
- Vega-Rúa, 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, e59716. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>
- Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B., Lourenço-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, 6294–6306. <https://doi.org/10.1128/jvi.00370-14>
- Wilkerson, R.C., Linton, Y.-M., Strickman, D., 2021. *Mosquitoes of the World*. Johns Hopkins University Press, Baltimore.
- World Health Organization, (WHO), 2023. Fact sheet about malaria [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria> (accessed 10.3.23).
- World Health Organization, (WHO), 2020. Vector-borne diseases [WWW Document]. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases> (accessed 9.28.22).
- Youssouf, H., Subiros, M., Denetiere, G., Collet, L., Dommergues, L., Pauvert, A., Rabarison, P., Vauloup-Fellous, C., Le Godais, G., Jaffar-Bandjee, M.-C., Jean, M., Paty, M.-C., Noel, H., Oliver, S., Filleul, L., Larsen, C., 2020. Rift Valley Fever Outbreak, Mayotte, France, 2018–2019. *Emerg. Infect. Dis.* 26, 769–772. <https://doi.org/10.3201/eid2604.191147>

3.5. Discussion et perspectives

L'objectif de cette troisième partie du mémoire expérimental était d'étudier l'ouverture du filtre de compatibilité entre les moustiques du genre *Aedes* de la région du SOOI et les arbovirus du DENV, du CHIKV, et du ZIKV. Dans un premier temps, les prospections de terrain réalisées afin de collecter les populations de moustiques, nous ont permis d'actualiser nos connaissances sur la répartition des espèces vectrices du genre *Aedes* au sein des différentes îles de la région partenaires du projet VECTOBIOMES. À La Réunion, rien de nouveau, les *Ae. albopictus* sont l'espèce dominante tandis que les *Ae. aegypti* se trouvent toujours uniquement dans des poches résiduelles au sein de ravines difficiles d'accès dans l'Ouest et le Sud de l'île (Salvan and Mouchet 1994; Delatte, Dehecq, et al. 2008; Bagny et al. 2009; Boussès et al. 2018). C'est pourquoi il n'a pas été possible d'obtenir une population de terrain de ce vecteur et, qu'à la place, une population de laboratoire d'*Ae. aegypti*, initialement prélevée à Trois Bassins en 2014 puis élevée sur maintes générations en insectarium, a été utilisée comme témoin. Pour l'archipel des Seychelles, deux îles ont été prospectées : Mahé, l'île principale des Seychelles, et Praslin, une île située à environ 50 km au Nord-Est des côtes de Mahé. Des populations d'*Ae. albopictus* ont pu être collectées sur ces deux îles tandis qu'aucune population d'*Ae. aegypti* n'y a été observée. Ces résultats corroborent les observations de terrain faites en 2008 aux Seychelles annonçant une possible disparition des *Ae. aegypti* des îles de Mahé et Praslin (Le Goff et al. 2012). Pour l'archipel des Comores, l'acquisition de populations de moustiques s'est révélée contrastée. Dans un premier temps, aucune population de ces espèces de moustiques n'a pu être collectée sur les îles d'Anjouan et de Mohéli. L'île de Grande Comore a, quant à elle, présenté une seule localité permettant de récupérer des œufs de moustiques. Après tri et vérification au laboratoire, deux populations monospécifiques distinctes ont été obtenues à partir de cette localité de Moroni; l'une d'*Ae. aegypti*, et l'autre d'*Ae. albopictus*, alors même que cette dernière espèce n'était pas présente sur l'île de Grande Comore en 2008 lors d'une enquête entomologique visant à déterminer les vecteurs du CHIKV durant l'épidémie de 2005 (Sang et al. 2008). Cependant, présente dans d'autres îles de l'archipel des Comores, comme à Mayotte par exemple, il est probable que cette espèce vectrice ait depuis colonisé l'île de Grande Comore (Boussès et al. 2018). En effet, pour l'île de Mayotte, des populations d'*Ae. albopictus* ont pu être prélevées. En revanche, aucune population d'*Ae. aegypti* n'a pu y être obtenue alors que les dernières données disponibles présentaient cette espèce comme une des plus abondantes à Mayotte en 2014 (Le Goff et al. 2014). Il est envisageable que cette espèce ait, depuis, été remplacée par *Ae. albopictus* dont la première occurrence sur l'île date de 2001 (Girod 2004).

Dans un second temps, ce travail nous a permis de rendre compte d'un filtre de compatibilité à l'ouverture contrastée entre les différents arbovirus étudiés. Notre étude a en effet montré qu'aucune population testée n'était compétente pour la transmission du ZIKV PF-13, que l'efficacité de la transmission moyenne pour le DENV-1 réunionnais dans la région était de 11,00% à 21 jours post-exposition (jpe) et de 21,57% à 28 jpe, et que celle pour le CHIKV était de 17,44% à 7 jpe et de 29,29% à 14 jpe. Ces résultats montrent que le filtre de compatibilité des moustiques *Aedes* au sein du SOOI est fermé vis-à-vis du ZIKV testé, qu'il est partiellement ouvert pour le DENV-1, et qu'il l'est légèrement plus et plus rapidement

pour le CHIKV. Comme discuté dans l'article, ces résultats sont en adéquation avec la situation épidémiologique de ces trois arbovirus observée dans la région du SOOI (Kariuki Njenga et al. 2008; Hafsia et al. 2022), validant ainsi le fait que nos protocoles expérimentaux soient un reflet relativement fidèle de la réalité de terrain. Le filtre de compatibilité fermé pour la souche ZIKV PF-13 dans la région n'est pas surprenant au vu des précédents résultats réunionnais et globaux concernant les souches de la lignée asiatique, celles-ci étant moins compatibles avec les moustiques du genre *Aedes* que les souches de ZIKV de la lignée africaine (Gomard et al. 2020; Obadia et al. 2022). Puisque ces dernières souches ont un potentiel épidémique important (Smith et al. 2018; Aubry et al. 2021), elles représentent un réel risque sanitaire à l'échelle globale. A notre connaissance, les études de transcriptomiques se sont pour l'instant intéressées uniquement aux différences de transcriptomes entre deux populations d'*Ae. albopictus* possédant des compétences vectorielles différentes pour une même souche de ZIKV (Jia et al. 2023), ou entre les vecteurs *Ae. aegypti* exposés ou non à une même souche virale (Etebari et al. 2017). Afin de comprendre ces différences de compatibilité des *Aedes* avec les diverses lignées géographiques de ZIKV observées à l'échelle globale, il serait donc très intéressant de réaliser des études transcriptomiques chez les *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* après leur exposition à ces différentes lignées virales. Par ailleurs, notre étude n'a pas révélé de différence de compétence vectorielle entre les groupements d'îles de la région du SOOI (i.e. La Réunion, archipel des Seychelles et archipel des Comores) et ce, pour les trois arbovirus. Bien que certaines populations (pas les mêmes pour les différents arbovirus) présentaient des différences significatives de leurs paramètres de compétence vectorielle pour un des arbovirus, la majorité d'entre elles n'en présentaient aucune. De ce fait, les résultats de notre étude permettent de mettre en garde les autorités sanitaires du SOOI quant au risque concret de la circulation d'un de ces arbovirus sur l'ensemble de la région après une émergence épidémique au sein d'une des îles.

De plus, tout comme à La Réunion (Latreille et al. 2019), il n'existe pas de structuration géographique de la diversité génétique des *Ae. albopictus* au sein de la région du SOOI (Delatte et al. 2011). Les interactions génotype x génotype étant un facteur majeur dans la détermination de la compétence vectorielle des moustiques, cette absence de structuration géographique peut en partie expliquer le fait qu'aucune différence de compétence vectorielle entre groupements d'îles n'ait été retrouvée lors de notre étude pour les trois arbovirus testés. Cette compétence vectorielle, a minima aussi efficace entre toutes les îles investiguées, permet aussi d'expliquer la possibilité d'une propagation des arbovirus entre les îles du SOOI. Cette propagation est déjà avérée pour le CHIKV puisqu'il a circulé dans la région entre 2005 à 2007 (Kariuki Njenga et al. 2008), et a été suggérée à plusieurs reprises pour le DENV depuis 1976 du fait de l'émergence épidémique d'un même sérotype (DENV-1, DENV-2, ou DENV-3) dans différentes îles du SOOI, soit la même année soit à une ou deux années d'intervalle (Hafsia et al. 2022). Comme expliqué dans la première partie du mémoire expérimental, cette possibilité pourrait être vérifiée par des études phylogénétiques approfondies des souches de dengue circulant dans les îles du SOOI et donc par la caractérisation moléculaire complète de nombreux échantillons de DENV de la région au cours du temps. Ce genre d'études pourrait commencer dès à présent en vérifiant si les

épidémies de dengue observées à Mayotte de 2019 à 2020 (Santé Publique France 2021) et plus récemment en 2024 à Maurice et à Rodrigues (ARS La Réunion 2024), sont liées phylogénétiquement à une ou des souches ayant circulé ou circulant toujours à La Réunion depuis fin 2017. Il serait également intéressant de se demander pourquoi malgré cette compétence vectorielle semblable entre les îles du SOOI, certaines îles présentent plus d'épidémies de certains arbovirus et/ou des incidences plus importantes. Cela a notamment été montré pour le DENV et le CHIKV sur l'île de Grande Comores par rapport aux autres îles de l'archipel des Comores (Dellagi et al. 2016), ou encore par le nombre très important d'épidémies de dengue recensées à La Réunion par rapport aux autres îles du SOOI (Hafsia et al. 2022). Cela vient en partie de la différence de facilité d'accès aux systèmes de santé et d'efficacité des veilles sanitaires entre les îles. Toutefois, d'autres paramètres pourraient également entrer en compte comme la densité de vecteurs, certaines caractéristiques sociodémographiques des populations humaines, ou encore des paramètres environnementaux particuliers. Connaître ces facteurs aggravants permettrait de mieux orienter et prioriser les processus de prévention et de contrôle contre ces maladies dans la région du SOOI. Par ailleurs, bien qu'ils puissent tous deux circuler dans le SOOI, les patterns de propagation régionale du CHIKV et du DENV ne présentent pas les mêmes caractéristiques temporelles. Contrairement au CHIKV qui a connu une épidémie intense mais brève avec une propagation très rapide entre les îles de la région, le DENV semble créer plus d'épidémies mais de plus faible intensité et dont les souches peuvent prendre jusqu'à plusieurs années avant d'émerger dans une autre île. S'il s'agit bien des mêmes souches qui émergent dans les autres îles, ce qui reste à vérifier comme expliqué précédemment, il serait intéressant de chercher ce qui crée ces différences entre CHIKV et DENV. Cela est en partie dû au degré d'ouverture plus faible et au temps plus long nécessaire à l'ouverture du filtre de compatibilité du DENV comparé à celui du CHIKV dans la région, comme démontré dans notre travail. Cependant, deux autres axes pourraient être investigués pour expliquer ces différences. Premièrement, il s'agirait d'étudier la proportion des cas asymptomatiques et leur implication dans la transmission de chacun de ces arbovirus, comme cela a été fait pour le DENV à La Réunion par notre étude DEMARE (De Santis et al. 2023). Deuxièmement, il faudrait explorer l'importance de la transmission verticale chez les vecteurs pouvant constituer des réservoirs et pouvant ainsi permettre une circulation silencieuse pendant plusieurs années de certains arbovirus, ce qui est notamment reconnu pour le DENV (Ferreira-de-Lima and Lima-Camara 2018). A l'échelle globale, il a été rapporté une efficacité de la transmission verticale du DENV plus importante chez les *Ae. albopictus* que chez les *Ae. aegypti*, et de la même façon le DENV-1 a montré être transmis verticalement plus que les autres sérotypes (Lequime et al. 2016). Or, comme nous l'avons vu, les îles du SOOI sont de plus en plus colonisées par les *Ae. albopictus*, la possibilité d'un maintien inter-épidémique du DENV, et plus particulièrement du DENV-1, dans la région est de ce fait plus que probable. Ces données, qui sont à explorer plus en profondeur, sont d'un intérêt tout particulier pour les services de LAV de la région.

Tous les résultats discutés ci-dessus sont d'ailleurs importants pour aider à la prise de décisions par les autorités sanitaires et de LAV afin de prévenir et lutter efficacement contre ces arbovirus. Le remplacement d'*Ae. aegypti* par *Ae. albopictus* qui semble opérer dans

toutes les îles du SOOI inspectées doit par exemple être pris en compte dans le choix des stratégies de LAV déployées au sein de la région, notamment en ce qui concerne les stratégies innovantes de lutte avec le lâcher de moustiques transgéniques (ex. TIS) ou paratransgéniques (ex. transfectés avec des souches de *Wolbachia*) qui doivent correspondre à l'espèce vectrice ciblée. De plus, les efforts de LAV contre les *Ae. albopictus* devraient se poursuivre après le déclin de l'incidence épidémique, spécialement si l'épidémie concernait le DENV-1, pour les raisons de maintien de l'arbovirus par transmission verticale que nous venons de voir à la fin du paragraphe précédent. Les investigations entomologiques permettent aussi de mieux comprendre le comportement des moustiques (distance de vol, taux de piqûre, lieux de repos, gîtes de ponte privilégiés...) et donc d'améliorer les stratégies de LAV, mais aussi de repérer les espèces vectrices potentielles (Delatte, Dehecq, et al. 2008; Le Goff et al. 2012; Boussès et al. 2018). Par exemple, l'importante densité des moustiques *Eretmapodites subsimplicipes* autour des foyers épidémiques de fièvre de la vallée du Rift à Mayotte a été repérée lors des campagnes de terrain visant à collecter des moustiques du genre *Aedes* pour le projet VECTOBIOME, avant d'être définie expérimentalement comme une des espèces vectrices par une autre étude (Cêtre-Sossah et al. 2023). C'est d'ailleurs suite à cette observation que nous nous sommes intéressés à deux espèces de ce genre: les *Er. subsimplicipes* et les *Er. quinquevittatus* vivant en sympatrie dans l'archipel des Comores. Nous avons décrit pour la première fois leur infection par *Wolbachia*, mono-infections causées par l'une des deux nouvelles souches découvertes de *Wolbachia* appartenant aux supergroupes A et B et proches phylogénétiquement de souches retrouvées chez des *Drosophiles* (Gomard et al. 2024). Ce travail a été valorisé par la rédaction d'un article dont je suis co-première auteure avec le Dr Yann Gomard (voir en Annexe 3. Publication 8 : "Genetic diversity of endosymbiotic bacteria *Wolbachia* infecting two mosquito species of the genus *Eretmapodites* occurring in sympatry in the Comoros archipelago." Gomard et al., 2024).

En ce qui concerne le degré d'ouverture des filtres de compatibilité des moustiques du genre *Aedes* qui diffèrent selon les arbovirus testés, ce résultat permettrait, quant à lui, de savoir comment prioriser la gestion des épidémies en cas de survenues multiples. Cela s'avèrerait notamment utile si la dengue devient endémique dans la région du SOOI et que le CHIKV y commence une nouvelle flambée épidémique, notre étude nous indiquant que les foyers épidémiques de CHIKV devraient être prioritaires sur ceux du DENV en raison d'un filtre de compatibilité ouvert plus rapidement et de façon plus importante pour le premier que pour le second. Pour finir, la circulation inter-île possible et probable de certaines souches virales démontre la nécessité d'une collaboration des systèmes de surveillance entre les îles du SOOI. En effet, toutes les îles du SOOI n'ont pas les mêmes moyens pour lutter contre les arbovirus et, afin de minimiser la propagation à toutes les îles du SOOI lorsqu'une épidémie se déclare quelque part, une collaboration inter-îles serait plus efficace. De plus, le ZIKV, le CHIKV et le DENV ne sont pas les seules menaces de pathogènes à transmission vectorielle qui planent sur le SOOI, et les moustiques du genre *Aedes* ne sont pas les seuls vecteurs compétents de ces pathogènes (Le Goff et al. 2012; Boussès et al. 2013; Boussès et al. 2018; Santé Publique France 2024a). Par exemple, la fièvre de la vallée du Rift est une réelle menace puisque déjà présente à Mayotte et vectorisée par les *Er. subsimplicipes* et les *Ae. albopictus* comme énoncé précédemment (Cêtre-Sossah et al. 2023). Des systèmes de

veille sanitaire inter-îles (comme ce qui est fait à La Réunion et Mayotte, mais devraient impliquer plus d'îles de la région), pourraient donc alerter rapidement de la moindre menace, permettant la mise en place efficace d'actions de prévention.

Par ailleurs, La Réunion et Mayotte ne sont pas les seuls outre-mers français (DROM-COM) menacés ou faisant face aux arbovirus testés dans notre étude. En fait, la plupart d'entre eux sont situés dans la ceinture tropicale et subtropicale, zone d'incidence majoritaire de ces arbovirus, au sein de complexes insulaires avec, par exemple, la Guadeloupe et la Martinique dans la mer des Caraïbes, ou encore la Polynésie française ou la Nouvelle Calédonie dans le Sud de l'Océan Pacifique. Toutes ces îles ont subi et/ou subissent toujours actuellement des épidémies des trois arbovirus testés dans notre étude (Alibert et al. 2011; Cao-Lormeau et al. 2014; Daudens-Vaysse et al. 2016; Agence Régionale de Santé - Guadeloupe, Saint-Martin, Saint-Barthélemy 2017; Dorléans et al. 2018; Calvez et al. 2018; Garcia--Van Smévoorde et al. 2023), et toutes possèdent des vecteurs efficaces quant à leur transmission. Il s'agit notamment des *Ae. aegypti* et les *Ae. mediovittatus* pour la Guadeloupe et la Martinique (Poole-Smith et al. 2015), les *Ae. aegypti* en Nouvelle Calédonie (Dupont-Rouzeyrol et al. 2012; O'Connor et al. 2020), et les *Ae. aegypti* et les *Ae. polynensis* en Polynésie française (Richard et al. 2016; Calvez et al. 2017). Pour la dengue, certains de ces complexes insulaires sont considérées en tant que zone endémique, comme c'est le cas des îles du Pacifique Sud avec une circulation continue de la dengue connaissant des pics épidémies, et des remplacements de sérotypes/souches de DENV après qu'un précédent ait circulé quelques années (Calvez et al. 2017). Et d'autres encore, sont en cours d'hyperendémisation, comme c'est le cas pour les DROM-COM des Caraïbes (L'Azou et al. 2014; Garcia--Van Smévoorde et al. 2023). Puisque notre étude dans le SOOI a montré que toutes les îles investiguées avaient une compétence similaire à transmettre le DENV testé, il est possible que le processus d'endémisation supposé par notre revue ne se cantonne pas uniquement à La Réunion, mais se produise sur l'ensemble de la région. Et, comparer les patterns épidémiologiques de La Réunion et du SOOI, avec les autres complexes insulaires comprenant des DROM-COM pourrait permettre, bien qu'ils ne possèdent pas forcément les mêmes vecteurs, d'avoir une idée de ce qui attend la région du SOOI dans le futur, comme par exemple une augmentation des formes sévères du fait d'une hausse du nombre de cas d'infection secondaire liés à l'endémisation, ou à l'inverse une atténuation de la sévérité d'une souche de dengue au cours de sa propagation d'île en île comme ce qui a déjà été observé dans les îles du Pacifique Sud (Steel et al. 2010). Pour finir, ces DROM-COM français sont de réelles portes d'entrée pour les arbovirus vers l'Europe via la France, comme en témoignent les 755 et 612 cas de dengue importés dans l'hexagone entre mai et décembre 2023 depuis la Martinique et la Guadeloupe, respectivement (Santé Publique France 2024b). En effet, avec la conquête par *Ae. albopictus* de la grande majorité du territoire (Ministère du travail, de la santé et des solidarités 2023), des importations régulières d'arbovirus tel que le DENV, le ZIKV ou le CHIKV (Santé Publique France 2024b), et une population très largement naïve face à ces maladies, la France possède maintenant un filtre de rencontre ouvert entre tous les acteurs des pathosystèmes vectoriels. Pour ce qui est du filtre de compatibilité, le fait que des chaînes de transmission autochtones se mettent parfois en place pour ces trois arbovirus indiquent qu'il est également ouvert, au moins partiellement (Ruche et al. 2010;

Grandadam et al. 2011; Delisle et al. 2015; Succo et al. 2016; Calba et al. 2017; ECDC 2018; ECDC 2019; Giron et al. 2019; Santé Publique France 2024b). Au vu de l'avancée d'*Ae. albopictus* en Europe, la France n'est pas le seul pays au climat tempéré qui risque de se retrouver de plus en plus confronté à ces arboviroses aux vecteurs d'origine plus tropicale et subtropicale. En témoigne la présence de cas autochtones de CHIKV et de DENV en Italie (Rezza et al. 2007; Venturi et al. 2017; Lazzarini et al. 2020) et, celle des cas autochtones de DENV en Croatie, au Portugal et en Espagne (Gjenero-Margan et al. 2011; Alves et al. 2013; ECDC 2018; ECDC 2019). Par ailleurs, il est à noter que des populations d'*Ae. albopictus* de France et d'Italie proviennent du mélange de lignées génétiquement différentes introduites à partir de diverses localités à travers le monde, dont la lignée réunionnaise introduite dans le Sud de la France en 2004 (Vega-Rúa et al. 2020). Du fait d'un fond génétique en partie commun, il serait très intéressant de comparer les compétences vectorielles de ces populations d'*Ae. albopictus* françaises et réunionnaises quant aux souches virales circulant ou ayant circulé à La Réunion pour le CHIKV et le DENV. Bien que moins nombreux pour l'instant que les cas importés depuis les DROM-COM des Caraïbes, une attention toute particulière devrait de ce fait être apportée aux cas d'arbovirus importés depuis le SOOI, et surtout depuis La Réunion vers la France et l'Europe. De plus, si la dengue devient endémique, voire hyperendémique, le nombre de cas importés depuis le SOOI vers la France risque également d'augmenter, nécessitant encore plus d'attention. De ce fait, continuer d'affiner notre compréhension des patterns épidémiologiques et poursuivre/améliorer la surveillance du ZIKV, du CHIKV et du DENV dans le SOOI, permettra dans un premier temps de lutter plus efficacement contre leur (ré)émergence dans la région, mais aidera aussi à protéger la France et l'Europe de ces maladies à transmission vectorielle.

Conclusion générale

1. Résumé des travaux de la thèse

A La Réunion, la circulation de la dengue est reconnue depuis la fin des années 1970, et seules des épidémies de faible ampleur avaient depuis été enregistrées sur le territoire. En même temps que j'arrivais à La Réunion au sein de l'UMR PIMIT pour mon stage de Master 2 en 2018, une nouvelle épidémie de dengue avait débuté. Avec mon équipe de direction, nous avons donc souhaité utiliser ce contexte pour élaborer un projet de thèse répondant à la question de l'ouverture du filtre de compatibilité entre *Ae. albopictus* réunionnais et virus de la dengue en prenant en compte la bi-infection naturelle des moustiques par la bactérie *Wolbachia*. L'hypothèse sous-jacente du projet, intégré à part entière dans le projet VECTOBIOMES, était alors que les interactions multipartites entre DENV, *Ae. albopictus* et *Wolbachia* définissent la trajectoire et le devenir des épidémies de dengue à La Réunion. Non pas que cette question n'avait jamais été adressée auparavant, mais les résultats des précédentes études restaient questionnables, et les protocoles utilisés ne représentaient pas totalement les conditions de terrain. Or la mise en place, cette même année, d'une

plateforme d'infectiologie de biosécurité de niveau 3 gérée par l'UMR PIMIT et permettant de recréer le cycle parasitaire de la dengue en milieu contrôlé, nous autorisait à restituer expérimentalement des conditions au plus proche de la réalité de terrain.

Contrairement aux précédentes épidémies, celle-ci ne s'était pas arrêtée à la fin d'année, au cours de la saison sèche. Le pattern devenait de plus en plus intéressant d'un point de vue scientifique tout en étant inquiétante d'un point de vue santé publique. L'épidémie a finalement duré tout au long de ma thèse, et au fil des mois mon projet a évolué en parallèle de l'évolution de celle-ci. En effet, avant de répondre à notre questionnement sur l'effet de *Wolbachia*, cette situation particulière nous a dans un premier temps amené à avoir un regard critique sur les patterns épidémiologiques originaux observés lors de cette épidémie. C'est pourquoi nous avons retracé le contexte historique de la dengue à La Réunion, et plus largement dans le SOOI, par le biais d'une revue. Comme énoncé dans celle-ci, avec 71 061 cas autochtones symptomatiques, 2 686 hospitalisations dont 455 formes sévères et 75 décès de fin 2017 à octobre 2021, la dengue a montré une intensification de son incidence, de sa sévérité, mais également de sa durée comparée aux précédentes épidémies. Tous ces paramètres, ajoutés à la circulation de trois sérotypes différents (DENV-1, DENV-2, DENV-3), nous ont conduit à l'hypothèse d'un processus d'endémisation de la dengue à La Réunion. Nous avons alors voulu évaluer les raisons se trouvant derrière de tels changements en explorant différents facteurs anthropiques et écologiques. La démographie et la mobilité géographique humaine à La Réunion ne pouvaient pas expliquer les patterns d'incidence observés sur l'île, la seconde rendant toutefois compte des importations de cas de dengue via les échanges aériens, avec le continent asiatique notamment. En revanche, la température avait montré être un des facteurs expliquant cette intensification, avec une concordance entre émergences épidémiques et températures annuelles moyennes supérieures à la normale sur l'île. Par ailleurs, des températures plus élevées induisent à la fois un développement larvaire plus rapide des moustiques, une meilleure compétence vectorielle vis-à-vis de la dengue, mais également des comportements humains de stockage d'eau (pots de fleurs). Or, la combinaison de ces trois facteurs favorise la densité en vecteurs ainsi que la transmission de la dengue. Ceci peut en partie expliquer la plus forte incidence de la maladie observée dans la zone Ouest de La Réunion, zone présentant les températures les plus élevées sur l'île. Cependant, d'autres éléments pouvant aussi avoir un rôle dans les patterns épidémiologiques observés restaient à investiguer. Nous avons ainsi souhaité étudier la compétence vectorielle de différentes populations géographiques d'*Ae. albopictus* réunionnais vis-à-vis du DENV.

Pour tester cela, il nous fallait dans un premier temps accéder aux souches épidémiques locales de DENV et les caractériser. En amont de la thèse, notre équipe avait pu montrer que le DENV-2 ayant circulé au début de l'épidémie et appartenant à la lignée I du génotype cosmopolite, avait également circulé aux Seychelles quelques années auparavant. Ce résultat a souligné la possibilité d'échange de souches de DENV entre les îles de la région du SOOI. Puis, lors de cette thèse, nous avons montré que les échantillons de DENV-1 réunionnais testés étaient regroupés en un seul cluster appartenant au génotype I, mais que les souches ayant auparavant circulées aux Seychelles étaient regroupées en deux clusters

distincts au sein du génotype V. Ces résultats suggèrent des événements d'introduction différents entre les deux îles, mais également au sein même des Seychelles. Tous les échantillons testés dans ces études sont proches génétiquement de souches provenant de pays asiatiques, mettant l'accent sur l'importance des échanges avec ce continent dans l'importation de cas de dengue. Ces résultats ont apporté des éléments d'informations sur les patterns de transmission au sein de ce contexte particulier qu'est le contexte insulaire du SOOI, avec des échanges de cas de dengue régionaux mais aussi plus globaux, et avec des successions d'introduction pouvant parfois avoir lieu au cours d'une seule et même épidémie. L'isolement et la caractérisation des souches virales ainsi réalisées, nous avons pu produire trois d'entre elles en vue des infections expérimentales : une de DENV-1, et deux de DENV-2, toutes d'origine réunionnaise. Il est à noter que nous n'avons pas pu isoler, caractériser, et produire le DENV-3 réunionnais en raison de trop faibles titres viraux dans les échantillons de sang obtenus. Les souches épidémiques locales de DENV en notre possession, l'étape suivante était alors de réaliser des tests de compétences vectorielles avec les moustiques réunionnais.

En effet, et toujours dans l'optique de comprendre l'hétérogénéité spatiale de l'incidence de la dengue à La Réunion au cours de cette épidémie, nous avons testé expérimentalement l'ouverture du filtre de compatibilité entre souches de DENV épidémiques locales et différentes populations d'*Ae. albopictus* de La Réunion. Nos hypothèses étaient alors que (1) le DENV avait un filtre de compatibilité plus ouvert avec les populations vectrices de l'Ouest et du Sud de l'île comparées à celles du Nord et de l'Est, et (2) que cette différence pourrait être liée à une densité en *Wolbachia* hétérogène entre ces populations. Nous souhaitons rester au plus proche de la réalité de terrain en utilisant des populations de vecteurs de première génération (F0) que nous avons alors collecté sur le terrain dans différentes localités de l'île. Pour des raisons indépendantes de notre volonté, nous avons alors dû travailler avec des moustiques de générations F0 à F2, et nous avons dû faire des choix concernant les virus testés pour chaque population du fait d'effectifs moindres que ceux planifiés. Malgré les difficultés rencontrées, nous avons tout de même pu montrer que les populations d'*Ae. albopictus* de La Réunion étaient toutes compétentes pour transmettre le DENV-1, conclusion que nous n'avons pas pu établir pour les souches de DENV-2. Avec ce protocole et niveau d'échantillonnage, nous n'avons pas pu montrer de lien entre compétence vectorielle vis-à-vis du DENV-1 d'une part, et zone géographique d'échantillonnage ou densité en *Wolbachia* d'autre part. Cependant, il était intéressant d'observer la tendance inverse entre densité en *Wolbachia* d'une part et incidence de la dengue d'autre part. En effet, les plus fortes densités bactériennes ont été retrouvées chez les populations de l'Est et du Nord de l'île, localités géographiques présentant respectivement les deux plus faibles taux d'incidence de la dengue. Cette étude a également permis de noter que le taux d'efficacité de la transmission du DENV-1 chez les moustiques tigres réunionnais de terrain (génération F0) était relativement faible et, à l'inverse, que le temps nécessaire à ce que les femelles soient infectieuses était relativement long. Ces informations sont importantes pour les agences régionales de santé et de lutte anti-vectorielle puisqu'elles peuvent leur permettre d'adapter leurs systèmes de lutte à la réalité du pathosystème vectoriel local. Pour finir, cette étude a également montré que les

populations de générations F2 présentait des aptitudes à transmettre le DENV supérieures à celles de générations plus précoces, apportant des preuves supplémentaires quant à l'importance du choix des protocoles expérimentaux dans les études de compétence vectorielle.

Du fait des échanges supposés ou avérés de certaines souches de DENV entre les îles de la région du SOOI au cours des dernières décennies, nous avons ensuite voulu replacer ces précédents résultats entre *Ae. albopictus* et DENV observés à La Réunion dans un contexte plus régional. Pour ce faire, nous avons testé et comparé l'ouverture du filtre de compatibilité entre le DENV-1 d'une part, et des population de moustiques tigres de trois îles ou archipels du SOOI d'autre part, à savoir: La Réunion, l'archipel des Seychelles, et l'archipel des Comores. Etant donné que les moustiques tigres n'avaient pas été officiellement décrétés vecteurs du DENV dans les autres îles du SOOI, des populations d'*Ae. aegypti* ont aussi été collectées lorsque présentes lors des investigations de terrain. Les résultats de compétence vectorielle pour la dengue étaient en accord avec ceux de notre étude à La Réunion: un filtre de compatibilité ouvert entre DENV-1 et moustiques du SOOI, avec une efficacité de transmission moyenne de l'ensemble des populations du SOOI équivalente à celle de notre précédente étude à La Réunion. La grande majorité des populations du SOOI ne présentait pas de différence significative entre leur paramètre de compétence vectorielle vis-à-vis du DENV-1 réunionnais, et aucune différence significative n'a été observée entre les trois archipels/île. De plus, puisque la dengue n'était pas la seule arbovirose ayant circulé ou menaçant le SOOI, nous avons également testé l'ouverture des filtres de compatibilité de ces mêmes populations vectrices face à des souches épidémiques d'intérêt de CHIKV et de ZIKV. Ce filtre est apparu totalement fermé pour la souche de ZIKV asiatique testée et, à l'inverse, amplement ouvert pour la souche de CHIKV utilisée car préalablement épidémiques dans le SOOI. Comme pour le DENV, aucune différence entre archipels/île n'a été observée pour les paramètres de compétence vectorielle du CHIKV, et la grande majorité des populations ne présentaient aucune différence significative entre elles. Il a été très intéressant de constater que les résultats obtenus pour les trois virus étaient en accord avec les patterns épidémiologiques observés dans la zone du SOOI: aucune épidémie de ZIKV, des épidémies de DENV de faible intensité, et une épidémie intense de CHIKV généralisée à l'ensemble de la zone du SOOI. Ce constat nous a permis de valider la cohérence de nos protocoles expérimentaux face à la réalité de terrain, même si cela pourrait être amélioré en utilisant notamment des générations plus précoces de moustiques. Enfin, le fait que les autres îles du SOOI aient des vecteurs tout aussi efficaces que ceux de La Réunion quant à la transmission du DENV-1 réunionnais témoigne d'un risque avéré de l'importation et de l'émergence épidémique dans l'ensemble de la zone de cette souche continuant vraisemblablement de circuler à La Réunion, et y ayant causé une épidémie sans précédent en terme de durée, d'intensité et de gravité.

Les travaux principaux de la thèse que nous avons mené à La Réunion sur l'ouverture du filtre de compatibilité entre moustiques *Ae. albopictus* et souches épidémiques locales et contemporaines de DENV, ont ouvert de nouvelles questions de recherche. Comme détaillées dans les différentes parties du mémoire expérimental, ces perspectives de recherche, tout comme les travaux de cette thèse, s'intéressent à divers aspects du

pathosystème vectoriel avec des questions relatives à la diversité des souches de DENV en circulation et aux conséquences épidémiologiques, à l'importance du choix des protocoles expérimentaux, aux mécanismes d'interaction mis en jeu au sein du pathosystème vectoriel incluant les bactéries endosymbiotiques *Wolbachia*, ou encore à l'évolution de celui-ci. Avant de conclure ce manuscrit de thèse, un bilan des dernières informations épidémiologiques disponibles concernant la dengue à La Réunion va maintenant être dressé.

2. Epilogue de l'histoire de la dengue à La Réunion

Qu'est-il advenu de l'épidémie de dengue à La Réunion depuis octobre 2021, dernière date prise en compte dans notre revue sur son historique à La Réunion (Hafsia et al. 2022)? Depuis fin 2017 et jusqu'à présent, la circulation virale de la dengue n'a pas connu d'interruption de plusieurs mois lors de la saison sèche à La Réunion, contrairement à ce qui était précédemment le cas. Cependant, après le pic épidémique de l'année 2021 (29 951 cas confirmés, 1 178 hospitalisations, et 33 décès directement liés à la dengue), l'intensité de l'épidémie a drastiquement diminué avec 1 212 cas confirmés dont 61 hospitalisations et 2 décès en 2022, puis 177 cas confirmés dont 9 hospitalisations et aucun décès à déplorer en 2023 (Santé Publique France 2024a). En juillet 2023, cette baisse d'intensité a d'ailleurs fait passer le plan ORSEC du niveau épidémie 4 "épidémie de moyenne intensité", mis en application depuis le 27 mars 2018, au niveau d'alerte 2A "circulation virale modérée autochtone" (ARS 2023). Cependant, depuis le début de l'année 2024 (Santé Publique France 2024a), les autorités sanitaires de La Réunion craignent une recrudescence épidémique, avec 84 cas recensés en quelques semaines, représentant le double de ce qui avait été observé en 2023 pour la même période. Si cette crainte est avérée, le pattern épidémiologique qui en ressortira, alternant de façon continue pics épidémiques de forte ou moyenne intensité et circulation à bas bruit du DENV, pourrait confirmer une endémisation de la dengue sur l'île comme suggéré par la revue, ce pattern étant celui observé dans les pays/régions endémiques, comme à Singapour par exemple (Ooi et al. 2006).

Depuis 2024, le DENV-2 est de nouveau le sérotype circulant à La Réunion. En extrapolant les résultats des sérotypages effectués depuis le début de l'épidémie fin 2017 à l'ensemble des infections confirmées, il est intéressant de voir qu'au minimum 5,24% de la population réunionnaise aurait été infectée par le DENV-1, 2,85% par le DENV-2, 0,07% par le DENV-3, tandis que le DENV-4 n'a pas été détecté. A ces estimations, considérant uniquement les cas confirmés, devraient s'ajouter les cas probables (cliniquement évocateurs avec preuves biologiques limites ou négatives au moment des prélèvements) et les cas asymptomatiques, ces derniers représentant environ 75% des cas de dengue globaux chaque année (Bhatt et al. 2013). Cependant, l'étude DEMARE, n'a trouvé aucun cas asymptomatique actif de dengue à La Réunion, et uniquement un très faible nombre d'anciens cas asymptomatiques potentiels. En effet, sur 605 volontaires prélevés à moins de 200 mètres d'un des 17 cas confirmés sélectionnés pour l'étude, tous les cas présentant des RT-qPCR DENV positive (présence virale confirmée) étaient symptomatiques (De Santis et al. 2023). Et, uniquement 15 des 100 cas de dengue possibles et avérés (échantillons positifs au

RT-qPCR et/ou présentants des IgM) n'ont présenté ni preuve d'infection par le DENV (négatif en RT-qPCR), ni symptômes de type dengue-like, faisant d'eux d'anciens cas asymptomatiques potentiels, mais sans certitude (De Santis et al. 2023). Quoi qu'il en soit, ces résultats ont démontré un taux d'asymptomatiques relativement faible à La Réunion comparé à l'estimation globale de 75% (Bhatt et al. 2013), bien qu'ils soient en accord avec d'autres études réalisées à travers le monde (Asish et al. 2023). Cette différence a notamment été justifiée par l'inclusion d'uniquement 7% d'enfants à l'étude, alors qu'il est possible que les enfants puissent présenter plus de cas asymptomatiques comparés aux adultes, comme cela a déjà été montré pour le CHIKV par exemple (Martins et al. 2020). Les données épidémiologiques observées à La Réunion, avec une majorité des cas de dengue détectés au sein de la population adulte (Vincent et al. 2019), seraient-elles le témoignage d'une plus importante proportion d'asymptomatiques chez les enfants? Pour répondre à cette question il serait intéressant de pouvoir recruter plus d'enfants lors d'une étude similaire afin de voir si cela modifie les données du nombre d'asymptomatiques total à La Réunion et les fait rejoindre les estimations globales plus élevées (Bhatt et al. 2013; Asish et al. 2023) ou, au contraire, si cela consolide les résultats obtenus lors du projet DEMARE. De la même façon, il serait intéressant d'étendre les horaires de recrutement puisqu'il est probable qu'un grand nombre de cas asymptomatiques ne soient pas à leur domicile au cours de la journée (travail, école, ou autres). Toujours est-il qu'il est justifié de se demander si ce n'est pas le pourcentage d'asymptomatiques au niveau mondial en lui-même qui est surestimé, et non pas celui de La Réunion qui est sous-estimé. En effet, de nombreuses études ne réalisent pas de suivi temporel des cas catégorisés comme asymptomatiques et, une survenue tardive de symptômes, même légers, peut ne pas être détectée. Ceci conduit à une surestimation des asymptomatiques, comme cela a été montré par une méta-analyse avec pour résultats une proportion de ces cas passant de 65,26% pour les études sans suivi à 31,7% pour celles avec suivi des symptômes post-prélèvement (Asish et al. 2023). A La Réunion, peu de cas non diagnostiqués de dengue ont été observés lors de l'étude DEMARE (De Santis et al. 2023). En plus de renforcer la fiabilité des résultats sur le nombre d'asymptomatiques (moins de chance d'avoir de faux asymptomatiques), cela démontre la facilité d'accès aux systèmes de santé en France et leur efficacité, dont un aspect non négligeable sont les indemnités journalières versées par l'Etat pour compenser le salaire des personnes nécessitant une période de convalescence. Le faible nombre de cas asymptomatiques et non diagnostiqués à La Réunion suggère que les extrapolations de l'incidence des différents sérotypes de DENV, réalisées ci-dessus, représentent de façon relativement fiable la couverture immunitaire au sein de la population réunionnaise totale. Et, cela démontre qu'une large partie de la population est toujours susceptible à l'infection, et ce, face à l'ensemble des sérotypes. Ces résultats laissent envisager une potentielle continuité épidémique du DENV à La Réunion, comme cela est le cas à Bangkok, par exemple, où la dengue est endémique (Adams et al. 2006). En effet, le pattern épidémiologique de la dengue à Bangkok suit un cycle oscillant entre circulation à bas bruit et pics épidémiques observés tous les cinq ans environ, et alterne entre des épidémies causées par les sérotypes 1, 2 et 3 qui se déclarent à peu près en même temps d'une part, et des épidémies isolées de sérotype 4 survenant dans les années intermédiaires d'autre part (Adams et al. 2006). Au vu de la co-circulation des sérotypes 1, 2

et 3, et du pic épidémique atteint en 2021, il est possible qu'un même pattern finisse par se dessiner à La Réunion.

Dans les prochaines décennies, il va être très important de poursuivre les efforts visant à monitorer les cas de dengue à La Réunion et à comprendre les patterns épidémiologiques locaux. En effet, ces informations peuvent aider les systèmes de veille sanitaire, de lutte antivectorielle (LAV), et de santé à prévenir et à lutter contre les épidémies sur l'île et dans la région du SOOI. Par exemple, si cette surveillance permet de confirmer une endémisation de la dengue à La Réunion, cela aidera les autorités sanitaires à anticiper et faire face plus efficacement à de potentielles répercussions telle qu'une augmentation de la sévérité des symptômes pouvant faire suite aux infections secondaires (Guzman et al. 2013; Katzelnick et al. 2017). De la même façon, affiner notre compréhension des chaînes de transmission locales et des facteurs prédictifs influençant leur apparition et leur continuation permettra une meilleure organisation du système de LAV. L'étude DEMARE a démontré, entre autres, que les chaînes de transmission de la dengue à La Réunion étaient limitées dans l'espace avec, par exemple, certains quartiers plus impactés par la dengue de façon générale que d'autres (IgG et cas confirmés les plus prévalents se trouvant au sein des mêmes quartiers), et que l'apparition de ces chaînes de transmission était positivement influencée par la présence d'une cour, d'une ferme ou de déchets dans le voisinage (De Santis et al. 2023). Ces résultats donnent des indications claires aux décideurs locaux de LAV quant aux zones/quartiers à privilégier lors de la prévention du fait d'une circulation de la dengue qui y est plus régulière, et au rayon restreint à traiter suite à la mise en place d'une chaîne de transmission. De plus, certains paramètres météorologiques ont aussi montré être des facteurs prédictifs du risque d'émergence épidémique de la dengue à La Réunion du fait de l'influence qu'ils exercent sur la densité des populations vectrices. La température et les précipitations de ces dernières années ont en effet été tenues pour responsables, en partie, de l'épidémie de dengue sans précédent à laquelle l'île fait face depuis 2017 (DiSera et al. 2020; Hafsia et al. 2022). Ces paramètres prédictifs devraient de ce fait être monitorés en parallèle des cas de dengue afin d'organiser des plans de prévention de LAV lorsqu'ils atteignent un seuil de risque qui est critique pour la mise en place d'une épidémie de dengue. D'autres informations, telles que les caractéristiques des souches circulant sur l'île (origine, génotype, circulation dans la région du SOOI, sévérité...) et la compétence vectorielle des moustiques locaux vis-à-vis de leur transmission, permettent également d'améliorer les prises de décisions quant à la prévention et la lutte contre la dengue à La Réunion, et les efforts en ce sens sont à poursuivre. Par ailleurs, le management sanitaire de la dengue à La Réunion, si renforcé par une étroite collaboration avec les recherches scientifiques locales, pourrait constituer un précédent inspirant de démarche à suivre pour la France hexagonale déjà menacée par la mise en place de chaînes de transmission de dengue suite à la conquête de la majorité du territoire par le vecteur *Ae. albopictus* comme expliqué précédemment (Cochet et al. 2022; Ministère du travail, de la santé et des solidarités 2023; Santé Publique France 2024a). Pour terminer sur un aspect plus scientifique, La Réunion représente à mon sens un terrain d'étude propice pour une recherche originale sur la dengue. En effet, différents aspects font de l'île un cas d'étude à part, à savoir : la vexion par *Ae. albopictus*, vecteur considéré globalement comme secondaire et donc moins étudié

qu'*Ae. aegypti*, son isolement géographique, sa diversité de climat, le processus d'endémisation que nous pensons être actuellement en cours, et le fait que ce soit une île appartenant à un pays avec des revenus élevés contrairement à la plupart des zones déjà endémiques. Tout cela représente une chance unique d'étudier des patterns épidémiologiques particuliers de la dengue au niveau local, mais qui permettraient d'améliorer les connaissances et la compréhension de la dengue à l'échelle globale.

3. Conclusion

Comme relaté dans ce manuscrit, la dengue a été depuis de longues années, et est toujours aujourd'hui un problème majeur en santé publique, mais pas uniquement. Comme d'autres agents infectieux à transmission vectorielle, le DENV a pu et peut toujours aujourd'hui influencer l'histoire des populations humaines, notamment en affaiblissant économiquement des pays aux niveaux de vie déjà plus que fragiles. De plus, les prédictions sur la future incidence et répartition de la dengue au niveau mondial montrent une aggravation de la situation dans des pays extrêmement pauvres de la ceinture tropicale et subtropicale, comme en Inde par exemple. Bien qu'un nouveau vaccin tétravalent prometteur ait récemment été mis sur le marché, la couverture vaccinale va prendre du temps à se mettre en place. La LAV reste de ce fait le moyen de lutte à court terme le plus efficace contre la dengue, et pour être pleinement efficace, celle-ci doit se reposer sur les études des interactions se déroulant au sein du pathosystème vectoriel. Autrement dit, elle doit s'appuyer sur les études visant à déterminer l'ouverture des filtres de rencontre et de compatibilité entre les acteurs du cycle parasitaire de la dengue, ce qui inclut les études de compétence vectorielle. Cette thèse a permis de renforcer les connaissances au sujet de la compétence vectorielle des *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* quant à la transmission de la dengue dans le SOOI, et surtout à La Réunion. Elle a aussi mis en relief l'impact du choix des protocoles expérimentaux sur les résultats des études de compétence vectorielle, et la nécessité de rester au plus proche de la réalité de terrain. Cette thèse, et le projet VECTOBIOMES dont elle dépend, ont également permis d'aider à la mise en fonction des laboratoires de biosécurité de niveau 3, nécessaire pour l'utilisation et l'étude de tels virus, ce qui facilitera les prochaines études, et donc l'acquisition de nouvelles connaissances sur la dengue, contribuant ainsi à faire rayonner la recherche réunionnaise au-delà de l'île.

Références

- Adams B, Holmes EC, Zhang C, Mammen MP, Nimmannitya S, Kalayanarooj S, Boots M. 2006. Cross-protective immunity can account for the alternating epidemic pattern of dengue virus serotypes circulating in Bangkok. *PNAS*. 103(38):14234–14239. <https://doi.org/doi/10.1073/pnas.0602768103>
- Agboli E, Leggewie M, Altinli M, Schnettler E. 2019. Mosquito-Specific Viruses—Transmission and Interaction. *Viruses*. 11(9):873. <https://doi.org/10.3390/v11090873>
- Agence Régionale de Santé - Guadeloupe, Saint-Martin, Saint-Barthélemy (ARS). 2017. Bilan de la gestion du Zika: Les réponses face à l'épidémie de Zika en Guadeloupe, Saint-martin et Saint-Barthélemy. [Internet]. [place unknown]; [accessed 2024 Apr 2]. [http://www.guadeloupe.gouv.fr/content/download/11441/78607/file/RETEX%20BILAN%204P%202017%20\(1\).pdf](http://www.guadeloupe.gouv.fr/content/download/11441/78607/file/RETEX%20BILAN%204P%202017%20(1).pdf).
- Ahmad A, Tandon S, Xuan TD, Nooreen Z. 2017. A Review on Phytoconstituents and Biological activities of *Cuscuta* species. *Biomed Pharmacother*. 92:772–795. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.05.124>
- Aleshin AE, Shiryaev SA, Strongin AY, Liddington RC. 2007. Structural evidence for regulation and specificity of flaviviral proteases and evolution of the Flaviviridae fold. *Protein Sci*. 16(5):795–806. <https://doi.org/10.1110/ps.072753207>
- Alibert A, Pfannstiel A, Grangeon J. 2011. Chikungunya outbreak in New Caledonia in 2011, Status report as at 22 August 2011. *Inform'Action*.:34:3–9.
- Alto BW, Lounibos LP. 2013. Vector competence for arboviruses in relation to the larval environment of mosquitoes. In: *Ecol Control Vector-Borne Dis* [Internet]. Vol. 3. [place unknown]; [accessed 2023 Aug 7]; p. 81–101. https://link.springer.com/chapter/10.3920/978-90-8686-744-8_4
- Alto BW, Lounibos LP, Mores CN, Reiskind MH. 2008. Larval competition alters susceptibility of adult *Aedes* mosquitoes to dengue infection. *Proc R Soc B Biol Sci*. 275(1633):463–471. <https://doi.org/10.1098/rspb.2007.1497>
- Alves MJ, Fernandes PL, Amaro F, Osório H, Luz T, Parreira P, Andrade G, Zé-Zé L, Zeller H. 2013. Clinical presentation and laboratory findings for the first autochthonous cases of dengue fever in Madeira island, Portugal, October 2012. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 18(6):20398.
- Anderson SL, Richards SL, Tabachnick WJ, Smartt CT. 2010. Effects Of West Nile Virus Dose And Extrinsic Incubation Temperature On Temporal Progression Of Vector Competence In *Culex Pipiens Quinquefasciatus*. *J Am Mosq Control Assoc*. 26(1):103–107.
- Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, Deobagkar DN. 2012. *Serratia odorifera* a Midgut Inhabitant of *Aedes aegypti* Mosquito Enhances Its Susceptibility to Dengue-2 Virus. *PLOS ONE*. 7(7):e40401. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040401>
- Armstrong PM, Ehrlich H, Bransfield A, Warren JL, Pitzer VE, Brackney DE. 2018. Successive Bloodmeals Enhance Virus Dissemination Within Mosquitoes And Increase Transmission Potential [Internet]. [accessed 2023 Aug 12]:246306. <https://doi.org/10.1101/246306>
- Armstrong PM, Ehrlich HY, Magalhaes T, Miller MR, Conway PJ, Bransfield A, Misencik MJ, Gloria-Soria A, Warren JL, Andreadis TG, et al. 2020. Successive blood meals enhance virus dissemination within mosquitoes and increase transmission potential. *Nat Microbiol*. 5(2):239–247. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0619-y>
- Armstrong PM, Rico-Hesse R. 2001. Differential Susceptibility of *Aedes aegypti* to Infection by the American and Southeast Asian Genotypes of Dengue Type 2 Virus. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 1(2):159–168. <https://doi.org/10.1089/153036601316977769>
- Armstrong PM, Rico-Hesse R. 2003. EFFICIENCY OF DENGUE SEROTYPE 2 VIRUS STRAINS TO INFECT AND DISSEMINATE IN *AEDES AEGYPTI*. *Am J Trop Med Hyg*. 68(5):539–544.
- ARS AR de SLR. 2023. Dengue : chiffres et zones concernées [Internet]. [accessed 2024 Mar 15]. <https://www.lareunion.ars.sante.fr/dengue-chiffres-et-zones-concernees>
- ARS La Réunion AR de SLR. 2024. Attention à la dengue à Maurice et à Rodrigues [Internet]. [accessed 2024 Apr 1]. https://www.lareunion.ars.sante.fr/system/files/2024-02/ARS_Atention%20%C3%A0%20la%20deng

ue%20C3%A0%20Maurice%20et%20C3%A0%20Rodrigues_06.02.2024_0.pdf

Asgari S. 2017. Host–Microbe Interactions. In: *Arthropod Vector Control Dis Transm Vol 1* [Internet]. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2019 Aug 27]; p. 173–183. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805350-8.00010-6>

Asish PR, Dasgupta S, Rachel G, Bagepally BS, Girish Kumar CP. 2023. Global prevalence of asymptomatic dengue infections - a systematic review and meta-analysis. *Int J Infect Dis.* 134:292–298. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2023.07.010>

Atkinson, Samuel. 2010. Avian malaria *Plasmodium relictum* in native Hawaiian forest birds: epizootiology and demographic impacts on *Apapane Himatione sanguinea* [Internet]. [accessed 2022 Dec 21]. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1600-048X.2009.04915.x>

Atyame CM, Alout H, Mousson L, Vazeille M, Diallo M, Weill M, Failloux A-B. 2019. Insecticide resistance genes affect *Culex quinquefasciatus* vector competence for West Nile virus. *Proc R Soc B Biol Sci.* 286(1894):20182273. <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2273>

Atyame CM, Delsuc F, Pasteur N, Weill M, Duron O. 2011. Diversification of *Wolbachia* Endosymbiont in the *Culex pipiens* Mosquito. *Mol Biol Evol.* 28(10):2761–2772. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr083>

Aubry F, Jacobs S, Darmuzey M, Lequime S, Delang L, Fontaine A, Jupatanakul N, Miot EF, Dabo S, Manet C, et al. 2021. Recent African strains of Zika virus display higher transmissibility and fetal pathogenicity than Asian strains. *Nat Commun.* 12(1):916. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21199-z>

Aubry M, Teissier A, Huart M, Merceron S, Vanhomwegen J, Roche C, Vial A-L, Teururai S, Sicard S, Paulous S, et al. 2017. Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. *Emerg Infect Dis.* 23(4):669–672. <https://doi.org/10.3201/eid2304.161549>

Azar SR, Roundy CM, Rossi SL, Huang JH, Leal G, Yun R, Fernandez-Salas I, Vitek CJ, Paploski IAD, Stark PM, et al. 2017. Differential Vector Competency of *Aedes albopictus* Populations from the Americas for Zika Virus. *Am J Trop Med Hyg.* 97(2):330–339. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0969>

Azar SR, Weaver SC. 2019. Vector Competence: What Has Zika Virus Taught Us? *Viruses.* 11(9):867. <https://doi.org/10.3390/v11090867>

Bagny Beilhe L, Delatte H, Juliano SA, Fontenille D, Quilici S. 2013. Ecological interactions in *Aedes* species on Reunion Island. *Med Vet Entomol.* 27(4):387–397. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2012.01062.x>

Bagny L, Delatte H, Quilici S, Fontenille D. 2009. Progressive Decrease in *Aedes aegypti* Distribution in Reunion Island Since the 1900s. *J Med Entomol.* 46(6):1541–1545. <https://doi.org/10.1603/033.046.0644>

Baldo L, Dunning Hotopp JC, Jolley KA, Bordenstein SR, Biber SA, Choudhury RR, Hayashi C, Maiden MCJ, Tettelin H, Werren JH. 2006. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl Environ Microbiol.* 72(11):7098–7110. <https://doi.org/10.1128/AEM.00731-06>

Balenghien T, Cardinale E, Chevalier V, Elissa N, Failloux A-B, Jean Jose Nipomichene TN, Nicolas G, Rakotoharinome VM, Roger M, Zumbo B. 2013. Towards a better understanding of Rift Valley fever epidemiology in the south-west of the Indian Ocean. *Vet Res.* 44(1):78. <https://doi.org/10.1186/1297-9716-44-78>

Bancroft TL. 1906. On the aetiology of dengue fever. *Austral Med Gaz.* 25:17–18.

Barillas-Mury C, Han YS, Seeley D, Kafatos FC. 1999. *Anopheles gambiae* Ag-STAT, a new insect member of the STAT family, is activated in response to bacterial infection. *EMBO J.* 18(4):959–967. <https://doi.org/10.1093/emboj/18.4.959>

de Barros FSM, Honório NA, Arruda ME. 2011. Survivorship of *Anopheles darlingi* (Diptera: Culicidae) in Relation with Malaria Incidence in the Brazilian Amazon. *PLOS ONE.* 6(8):e22388. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022388>

Bartenschlager R, Miller S. 2008. Molecular aspects of Dengue virus replication. *Future Microbiol.* 3(2):155–165. <https://doi.org/10.2217/17460913.3.2.155>

Bartholomay LC, Christensen BM. 2002. Vector-Parasite Interactions in Mosquito-Borne Filariasis. In: *The Filaria* [Internet]. Vol. 5. Boston, MA: Springer US; [accessed 2024 Jan 14]; p. 9–19. https://doi.org/10.1007/0-306-47661-4_2

Battsetseg B, Xuan X, Ikadai H, Bautista JLR, Byambaa B, Boldbaatar D, Battur B, Battsetseg G, Batsukh Z, Igarashi I, et al. 2001. Detection of *Babesia caballi* and *Babesia equi* in *Dermacentor nuttalli* adult ticks. *Int J Parasitol.* 31(4):384–386. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(01\)00120-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(01)00120-5)

Beckmann JF, Ronau JA, Hochstrasser M. 2017. A *Wolbachia* deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. *Nat Microbiol.* 2(5):17007. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.7>

Begum F, Das S, Mukherjee D, Mal S, Ray U. 2019. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. *Viruses.* 11(12):1136. <https://doi.org/10.3390/v11121136>

Beklemishev WN. 1940. Gonotrophic rhythm as a basic principle of the biology of *Anopheles* [Internet]. [accessed 2022 Sep 28]. https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Gonotrophic%20rhythm%20as%20a%20basic%20principle%20of%20the%20biology%20of%20Anopheles&journal=Vop%20Fiziol%20Ekol%20Malyar%20Konara&volume=1&pages=3-22&publication_year=1940&author=Beklemishev%20CWN

Bellone R, Lequime S, Jupille H, Göertz GP, Aubry F, Mousson L, Piorkowski G, Yen P-S, Gabiane G, Vazeille M, et al. 2020. Experimental adaptation of dengue virus 1 to *Aedes albopictus* mosquitoes by in vivo selection. *Sci Rep.* 10(1):18404. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-75042-4>

Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP. 2007. Spread of The Tiger: Global Risk of Invasion by The Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 7(1):76–85. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0562>

Benelli G, Wilke ABB, Beier JC. 2020. *Aedes albopictus* (Asian Tiger Mosquito). *Trends Parasitol.* 36(11):942–943. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2020.01.001>

Benkimoun S, Atyame C, Haramboure M, Degenne P, Thébaud H, Dehecq J-S, Tran A. 2021. Dynamic mapping of dengue basic reproduction number. *Results Phys.* 29:104687. <https://doi.org/10.1016/j.rinp.2021.104687>

Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO. 2003. Selection-Driven Evolution of Emergent Dengue Virus. *Mol Biol Evol.* 20(10):1650–1658. <https://doi.org/10.1093/molbev/msg182>

Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, Gubler DJ, McMillan WO. 2006. Molecular evolution of dengue 2 virus in Puerto Rico: positive selection in the viral envelope accompanies clade reintroduction. *J Gen Virol.* 87(4):885–893. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81309-0>

Bhatt P, Sabeena SP, Varma M, Arunkumar G. 2021. Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Curr Microbiol.* 78(1):17–32. <https://doi.org/10.1007/s00284-020-02284-w>

Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, et al. 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* 496(7446):504–507. <https://doi.org/10.1038/nature12060>

Bian G, Xu Y, Lu P, Xie Y, Xi Z. 2010. The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. Schneider DS, editor. *PLoS Pathog.* 6(4):e1000833. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833>

Bian G, Zhou G, Lu P, Xi Z. 2013. Replacing a Native *Wolbachia* with a Novel Strain Results in an Increase in Endosymbiont Load and Resistance to Dengue Virus in a Mosquito Vector. O'Neill SL, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 7(6):e2250. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002250>

Blagrove MSC, Arias-Goeta C, Failloux A-B, Sinkins SP. 2012. *Wolbachia* strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc Natl Acad Sci.* 109(1):255–260. <https://doi.org/10.1073/pnas.1112021108>

Blair CD. 2011. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol.* 6(3):265–277. <https://doi.org/10.2217/fmb.11.11>

Bohers C, Mousson L, Madec Y, Vazeille M, Rhim A, M'ghirbi Y, Bouattour A, Failloux A-B. 2020. The recently introduced *Aedes albopictus* in Tunisia has the potential to transmit chikungunya, dengue and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 14(10):e0008475. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008475>

Bolling BG, Olea-Popelka FJ, Eisen L, Moore CG, Blair CD. 2012. Transmission dynamics of an insect-specific flavivirus in a naturally infected *Culex pipiens* laboratory colony and effects of co-infection on vector competence for West Nile virus. *Virology.* 427(2):90–97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.02.016>

Bonilauri P, Romeo Bellini,†, Raffaella Angelini,‡, Luciano Venturi,‡, Francesca Fallacara,*, Paolo Cordioli,*, Paola Angelini,§, Claudio Venturelli,¶, Giuseppe Merialdi,*, and Michele Dottori*, Mattia

- Calzolar. 2008. Chikungunya Virus in *Aedes albopictus*, Italy.
- Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, James AA. 2013. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol.* 29(9):460–468. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.07.003>
- Bonneau M, Atyame C, Beji M, Justy F, Cohen-Gonsaud M, Sicard M, Weill M. 2018. *Culex pipiens* crossing type diversity is governed by an amplified and polymorphic operon of *Wolbachia*. *Nat Commun.* 9(1):319. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02749-w>
- Bonneau M, Landmann F, Labbé P, Justy F, Weill M, Sicard M. 2018. The cellular phenotype of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* in the light of *cidB* diversity. *PLOS Pathog.* 14(10):e1007364. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007364>
- Bordenstein SR, Marshall ML, Fry AJ, Kim U, Wernegreen JJ. 2006. The Tripartite Associations between Bacteriophage, *Wolbachia*, and Arthropods. Schneider D, editor. *PLoS Pathog.* 2(5):e43. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0020043>
- Bos S, Graber AL, Cardona-Ospina JA, Duarte EM, Zambrana JV, Ruíz Salinas JA, Mercado-Hernandez R, Singh T, Katzelnick LC, de Silva A, et al. 2024. Protection against symptomatic dengue infection by neutralizing antibodies varies by infection history and infecting serotype. *Nat Commun.* 15(1):382. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-44330-8>
- Bourtzis K, Dobson SL, Xi Z, Rasgon JL, Calvitti M, Moreira LA, Bossin HC, Moretti R, Baton LA, Hughes GL, et al. 2014. Harnessing mosquito–*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Trop.* 132:S150–S163. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.004>
- Bourtzis K, Pettigrew MM, O’Neill SL. 2000. *Wolbachia* neither induces nor suppresses transcripts encoding antimicrobial peptides. *Insect Mol Biol.*:5.
- Boussès P, Dehecq JS, Brengues C, Fontenille D. 2013. Inventaire actualisé des moustiques (Diptera : Culicidae) de l’île de La Réunion, Océan Indien. *Bull Société Pathol Exot.* 106(2):113–125. <https://doi.org/10.1007/s13149-013-0288-7>
- Boussès P, Le Goff G, Robert V. 2018. Inventaire des moustiques (Diptera : Culicidae) des îles du sud-ouest de l’océan Indien, Madagascar excepté — Une revue critique. *Ann Société Entomol Fr NS.* 54(2):89–110. <https://doi.org/10.1080/00379271.2018.1429951>
- Box ED. 1966. Blood and Tissue Protozoa of the English Sparrow (*Passer domesticus domesticus*) in Galveston, Texas*. *J Protozool.* 13(2):204–208. <https://doi.org/10.1111/j.1550-7408.1966.tb01895.x>
- Boyer S, Calvez E, Chouin-Carneiro T, Diallo D, Failloux A-B. 2018. An overview of mosquito vectors of Zika virus. *Microbes Infect.* 20(11):646–660. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2018.01.006>
- Boyle L, O’Neill SL, Robertson HM, Karr TL. 1993. Interspecific and intraspecific horizontal transfer of *Wolbachia* in *Drosophila*. *Science.* 260(5115):1796–1799. <https://doi.org/10.1126/science.8511587>
- Brackney DE, Beane JE, Ebel GD. 2009. RNAi Targeting of West Nile Virus in Mosquito Midguts Promotes Virus Diversification. *PLOS Pathog.* 5(7):e1000502. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000502>
- Brackney DE, LaReau JC, Smith RC. 2021. Frequency matters: How successive feeding episodes by blood-feeding insect vectors influences disease transmission. *PLOS Pathog.* 17(6):e1009590. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009590>
- Brady OJ, Gething PW, Bhatt S, Messina JP, Brownstein JS, Hoen AG, Moyes CL, Farlow AW, Scott TW, Hay SI. 2012. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. Reithinger R, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(8):e1760. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001760>
- Brady OJ, Hay SI. 2020. The Global Expansion of Dengue: How *Aedes aegypti* Mosquitoes Enabled the First Pandemic Arbovirus. *Annu Rev Entomol.* 65(1):191–208. <https://doi.org/10.1146/annurev-ento-011019-024918>
- Brasier CM, Webber JF. 2019. Is there evidence for post-epidemic attenuation in the Dutch elm disease pathogen *Ophiostoma novo-ulmi*? *Plant Pathol.* 68(5):921–929. <https://doi.org/10.1111/ppa.13022>
- Briscoe D a., Malpica J m., Robertson A, Smith GJ, Frankham R, Banks R g., Barker J s. f. 1992. Rapid Loss of Genetic Variation in Large Captive Populations of *Drosophila* Flies: Implications for the Genetic Management of Captive Populations. *Conserv Biol.* 6(3):416–425. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.1992.06030416.x>

- Brown DT, Hernandez R. 2012. Infection of Cells by Alphaviruses. In: Rossmann MG, Rao VB, editors. *Viral Mol Mach* [Internet]. Boston, MA: Springer US; [accessed 2024 Jan 14]; p. 181–199. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-0980-9_8
- Brown JE, Evans BR, Zheng W, Obas V, Barrera-Martinez L, Egizi A, Zhao H, Caccone A, Powell JR. 2014. HUMAN IMPACTS HAVE SHAPED HISTORICAL AND RECENT EVOLUTION IN Aedes Aegypti, THE DENGUE AND YELLOW FEVER MOSQUITO. *Evolution*. 68(2):514–525. <https://doi.org/10.1111/evo.12281>
- Brownlie JC, Adamski M, Slatko B, McGraw EA. 2007. Diversifying selection and host adaptation in two endosymbiont genomes. *BMC Evol Biol*. 7(1):68. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-68>
- Brownlie JC, Cass BN, Riegler M, Witsenburg JJ, Iturbe-Ormaetxe I, McGraw EA, O'Neill SL. 2009. Evidence for Metabolic Provisioning by a Common Invertebrate Endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during Periods of Nutritional Stress. *PLOS Pathog*. 5(4):e1000368. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000368>
- Burivong P, Pattanakitsakul S-N, Thongrungskiat S, Malasit P, Flegel TW. 2004. Markedly reduced severity of Dengue virus infection in mosquito cell cultures persistently infected with *Aedes albopictus* densovirus (AalDENV). *Virology*. 329(2):261–269. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.032>
- Burkett-Cadena ND. 2019. Morphological Adaptations of Parasitic Arthropods. In: *Med Vet Entomol* [Internet]. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2022 Sep 26]; p. 17–22. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00002-9>
- Butrapet S, Huang CY, Pierro DJ, Bhamarapravati N, Gubler DJ, Kinney RM. 2000. Attenuation markers of a candidate dengue type 2 vaccine virus, strain 16681 (PDK-53), are defined by mutations in the 5' noncoding region and nonstructural proteins 1 and 3. *J Virol*. 74(7):3011–3019. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3011-3019.2000>
- Calba C, Guerbois-Galla M, Franke F, Jeannin C, Auzet-Caillaud M, Grard G, Pigaglio L, Decoppet A, Weicherding J, Savail M-C, et al. 2017. Preliminary report of an autochthonous chikungunya outbreak in France, July to September 2017. *Eurosurveillance*. 22(39):17–00647. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00647>
- Calisher CH, Nuti M, Lazuick JS, Ferrari JDM, Kappus KD. 1981. Dengue in the Seychelles. *Bull World Health Organ*. 59(4):619–622.
- Calvez E, Guillaumot L, Girault D, Richard V, O'Connor O, Paoaafaite T, Teurlai M, Pocquet N, Cao-Lormeau V-M, Dupont-Rouzeyrol M. 2017. Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia. *Parasit Vectors*. 10(1):381. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2319-x>
- Calvez E, Mousson L, Vazeille M, O'Connor O, Cao-Lormeau V-M, Mathieu-Daudé F, Pocquet N, Failloux A-B, Dupont-Rouzeyrol M. 2018. Zika virus outbreak in the Pacific: Vector competence of regional vectors. *PLoS Negl Trop Dis*. 12(7):e0006637. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006637>
- Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, Sall AA, Musso D. 2014. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 20(6):1085–1086. <https://doi.org/10.3201/eid2006.140138>
- Caragata EP, Rancès E, Hedges LM, Gofton AW, Johnson KN, O'Neill SL, McGraw EA. 2013. Dietary Cholesterol Modulates Pathogen Blocking by *Wolbachia*. Vernick KD, editor. *PLoS Pathog*. 9(6):e1003459. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003459>
- Carey DE. 1971. Chikungunya and dengue: A Case of Mistaken Identity? *J Hist Med Allied Sci*. XXVI(3):243–262. <https://doi.org/10.1093/jhmas/XXVI.3.243>
- Carissimo G, Pondeville E, McFarlane M, Dietrich I, Mitri C, Bischoff E, Antoniewski C, Bourgouin C, Failloux A-B, Kohl A, Vernick KD. 2015. Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 112(2):E176–185. <https://doi.org/10.1073/pnas.1412984112>
- Carnevale P, Robert V. 2009. 2. Morphologie. In: *Anophèles Biol Transm Plasmodium Lutte Antivectorielle* [Internet]. Marseille: IRD Éditions; [accessed 2022 Sep 25]; p. 22–46. <http://books.openedition.org/irdeditions/10388>
- Carpenter A, Clem RJ. 2023. Factors Affecting Arbovirus Midgut Escape in Mosquitoes. *Pathogens*. 12(2):220. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020220>

Carvalho DO, McKemey AR, Garziera L, Lacroix R, Donnelly CA, Alphey L, Malavasi A, Capurro ML. 2015. Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. Olson KE, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 9(7):e0003864. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003864>

Carvalho-Leandro D, Ayres CFJ, Guedes DRD, Suesdek L, Melo-Santos MAV, Oliveira CF, Cordeiro MT, Regis LN, Marques ET, Gil LH, Magalhaes T. 2012. Immune transcript variations among *Aedes aegypti* populations with distinct susceptibility to dengue virus serotype 2. *Acta Trop*. 124(2):113–119. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2012.07.006>

CDC. 2022. *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquito Life Cycles | CDC. Cent Dis Control Prev [Internet]. [accessed 2024 Apr 18]. <https://www.cdc.gov/mosquitoes/about/life-cycles/aedes.html>

CDC. 2023. About Dengue | CDC. Cent Dis Control Prev [Internet]. [accessed 2023 Oct 2]. <https://www.cdc.gov/dengue/about/index.html>

CDC - DPDx - Dicrocoeliasis. 2019. [accessed 2022 Sep 23]. <https://www.cdc.gov/dpdx/dicrocoeliasis/index.html>

CDC of DC. 2022. Bartonella quintana infection | Bartonella | CDC [Internet]. [accessed 2022 Dec 20]. <https://www.cdc.gov/bartonella/bartonella-quintana/index.html>

Cerny D, Haniffa M, Shin A, Bigliardi P, Tan BK, Lee B, Poidinger M, Tan EY, Ginhoux F, Fink K. 2014. Selective Susceptibility of Human Skin Antigen Presenting Cells to Productive Dengue Virus Infection. *PLOS Pathog*. 10(12):e1004548. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004548>

Cêtre-Sossah C, Lebon C, Rabarison P, Cardinale E, Mavingui P, Atyame C. 2023. Evidence of *Eretmapodites subsimplicipes* and *Aedes albopictus* as competent vectors for Rift Valley fever virus transmission in Mayotte. *Acta Trop*. 239:106835. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2023.106835>

Chambers R. 1960. FLA\|VIRUS GENOME ORG\|NIZATION, EXPRESSION, AND REPLICATION. :40.

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. 1990. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 44:649–688. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.44.100190.003245>

Chan KWK, Watanabe S, Jin JY, Pompon J, Teng D, Alonso S, Vijaykrishna D, Halstead SB, Marzinek JK, Bond PJ, et al. 2019. A T164S mutation in the dengue virus NS1 protein is associated with greater disease severity in mice. *Sci Transl Med*. 11(498):eaat7726. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aat7726>

Chan M, Johansson MA. 2012. The Incubation Periods of Dengue Viruses. *PLOS ONE*. 7(11):e50972. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050972>

Chao L-L, Castillo CT, Shih C-M. 2021. Molecular detection and genetic identification of Wolbachia endosymbiont in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) ticks of Taiwan. *Exp Appl Acarol*. 83(1):115–130. <https://doi.org/10.1007/s10493-020-00574-3>

Charan SS, Pawar KD, Severson DW, Patole MS, Shouche YS. 2013. Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. *Parasitol Res*. 112(7):2627–2637. <https://doi.org/10.1007/s00436-013-3428-x>

Chaves BA, Godoy RSM, Campolina TB, Júnior ABV, Paz A da C, Vaz EB da C, Silva BM, Nascimento RM, Guerra M das GVB, Lacerda MVG, et al. 2022. Dengue Infection Susceptibility of Five *Aedes aegypti* Populations from Manaus (Brazil) after Challenge with Virus Serotypes 1–4. *Viruses*. 14(1):20. <https://doi.org/10.3390/v14010020>

Chen R, Mukhopadhyay S, Merits A, Bolling B, Nasar F, Coffey LL, Powers A, Weaver SC, ICTV Report Consortium. 2018. ICTV Virus Taxonomy Profile: Togaviridae. *J Gen Virol*. 99(6):761–762. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001072>

Chen R, Vasilakis N. 2011. Dengue — Quo tu et quo vadis? *Viruses*. 3(9):1562–1608. <https://doi.org/10.3390/v3091562>

Chen T-H, Lo Y-P, Yang C-F, Chen W-J. 2012. Additive Protection by Antioxidant and Apoptosis-Inhibiting Effects on Mosquito Cells with Dengue 2 Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(4):e1613. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001613>

Cheng D, Huang S-W, Chin W-X, Hung S-J, Tsai H-P, Chu JH, Chao C-H, Wang J-R. 2022. Impact of Intrahost NS5 Nucleotide Variations on Dengue Virus Replication. *Front Microbiol*. 13:894200. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.894200>

Chernin E. 1983. Sir Patrick Manson's Studies on the Transmission and Biology of Filariasis. *Rev Infect Dis*. 5(1):148–166. <https://doi.org/10.1093/clinids/5.1.148>

- Chirgwin SR, Coleman SU, Porthouse KH, Nowling JM, Punkosdy GA, Klei TR. 2003. Removal of *Wolbachia* from *Brugia pahangi* Is Closely Linked to Worm Death and Fecundity but Does Not Result in Altered Lymphatic Lesion Formation in Mongolian Gerbils (*Meriones unguiculatus*). *Infect Immun.* 71(12):6986–6994. <https://doi.org/10.1128/IAI.71.12.6986-6994.2003>
- Ci Y, Shi L. 2021. Compartmentalized replication organelle of flavivirus at the ER and the factors involved. *Cell Mol Life Sci.* 78(11):4939–4954. <https://doi.org/10.1007/s00018-021-03834-6>
- Ciota AT, Keyel AC. 2019. The Role of Temperature in Transmission of Zoonotic Arboviruses. *Viruses.* 11(11):1013. <https://doi.org/10.3390/v11111013>
- Cirimotich CM, Dong Y, Clayton AM, Sandiford SL, Souza-Neto JA, Mulenga M, Dimopoulos G. 2011. Natural Microbe-Mediated Refractoriness to Plasmodium Infection in *Anopheles gambiae*. *Science.* 332(6031):855–858. <https://doi.org/10.1126/science.1201618>
- Cirimotich CM, Dong Y, Garver LS, Sim S, Dimopoulos G. 2010. Mosquito immune defenses against Plasmodium infection. *Dev Comp Immunol.* 34(4):387–395. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2009.12.005>
- Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G. 2011. Native Microbiota Shape Insect Vector Competence for Human Pathogens. *Cell Host Microbe.* 10(4):307–310. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.006>
- Cleland JB, Bradley B, McDonald W. 1916. On the Transmission of Australian Dengue by the Mosquito *Stegomyia Fasciata*. *Med J Aust [Internet].* [accessed 2020 Jun 25] 2(11). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19172900668>
- Clem RJ. 2016. Arboviruses and apoptosis: the role of cell death in determining vector competence. *J Gen Virol.* 97(Pt 5):1033–1036. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000429>
- Clum S, Ebner KE, Padmanabhan R. 1997. Cotranslational Membrane Insertion of the Serine Proteinase Precursor NS2B-NS3(Pro) of Dengue Virus Type 2 Is Required for Efficient in Vitro Processing and Is Mediated through the Hydrophobic Regions of NS2B *. *J Biol Chem.* 272(49):30715–30723. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.49.30715>
- Cochet A, Calba C, Jourdain F, Grard G, Durand GA, Guinard A, Noël H, Paty M-C, Franke F, Auzet-Cailaud M, et al. 2022. Autochthonous dengue in mainland France, 2022: geographical extension and incidence increase. *Eurosurveillance.* 27(44):2200818. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.44.2200818>
- Coffey LL, Vasilakis N, Brault AC, Powers AM, Tripet F, Weaver SC. 2008. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proc Natl Acad Sci.* 105(19):6970–6975. <https://doi.org/10.1073/pnas.0712130105>
- Combes C. 2001. Parasitism: The Ecology and Evolution of Intimate Interactions - Google Livres [Internet]. [accessed 2019 Sep 2]. <https://books.google.fr/books?hl=fr&lr=&id=LovrfCYloxgC&oi=fnd&pg=PR9&dq=combes+2001&ots=DviW16cfmi&sig=E5oVWgWMrvKFFsj583GPktORJDM#v=onepage&q&f=false>
- Cordaux R, Michel-Salzat A, Frelon-Raimond M, Rigaud T, Bouchon D. 2004. Evidence for a new feminizing *Wolbachia* strain in the isopod *Armadillidium vulgare*: evolutionary implications. *Heredity.* 93(1):78–84. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800482>
- Covacin C, Barker SC. 2007. Supergroup F *Wolbachia* bacteria parasitise lice (Insecta: Phthiraptera). *Parasitol Res.* 100(3):479–485. <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0309-6>
- Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT. 2015. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev.* 39(2):155–170. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuu004>
- Cui Y, Grant DG, Lin J, Yu X, Franz AWE. 2019. Zika Virus Dissemination from the Midgut of *Aedes aegypti* is Facilitated by Bloodmeal-Mediated Structural Modification of the Midgut Basal Lamina. *Viruses.* 11(11):1056. <https://doi.org/10.3390/v11111056>
- da Cunha M, Keller DG, Filho ICB, de Magalhães JAS, Gomes VM, de Souza W, Moura JIL, Bezerra JL, Miguens FC. 2010. Fine structure of phloematic trypanosomatid–coconut tree interaction. *J Gen Plant Pathol.* 76(1):74–83. <https://doi.org/10.1007/s10327-009-0212-y>
- Dambach P. 2020. The use of aquatic predators for larval control of mosquito disease vectors: Opportunities and limitations. *Biol Control.* 150:104357. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2020.104357>

- Darriet F, editor. 2007. 1. Modes d'action des principaux insecticides dans la lutte contre les moustiques. In: Moustiquaires Imprégnées Résistance Moustiques Aux Insectic [Internet]. Marseille: IRD Éditions; [accessed 2024 Jan 30]; p. 27–36. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.9959>
- Daszak P, Cunningham AA, Hyatt AD. 2001. Anthropogenic environmental change and the emergence of infectious diseases in wildlife. *Acta Trop.* 78(2):103–116. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(00\)00179-0](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(00)00179-0)
- Daudens-Vaysse E, Ledrans M, Gay N, Ardillon V, Cassadou S, Najioullah F, Leparç-Goffart I, Rousset D, Herrmann C, Cesaire R, et al. 2016. Zika emergence in the French Territories of America and description of first confirmed cases of Zika virus infection on Martinique, November 2015 to February 2016. *Eurosurveillance.* 21(28):30285. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.28.30285>
- Davidson AD. 2009. Chapter 2 New Insights into Flavivirus Nonstructural Protein 5. In: *Adv Virus Res* [Internet]. Vol. 74. [place unknown]: Academic Press; [accessed 2024 Apr 15]; p. 41–101. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(09\)74002-3](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(09)74002-3)
- Davies TGE, Field LM, Usherwood PNR, Williamson MS. 2007. DDT, pyrethrins, pyrethroids and insect sodium channels. *IUBMB Life.* 59(3):151–162. <https://doi.org/10.1080/15216540701352042>
- De Santis O, Pothin E, Bouscaren N, Irish SR, Jaffar-Bandjee M-C, Menudier L, Ramis J, Schultz C, Lamaurt F, Wisniak A, et al. 2023. Investigation of Dengue Infection in Asymptomatic Individuals during a Recent Outbreak in La Réunion. *Viruses.* 15(3):742. <https://doi.org/10.3390/v15030742>
- Dedeine F, Vavre F, Fleury F, Loppin B, Hochberg ME, Boulétreau M. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc Natl Acad Sci.* 98(11):6247–6252. <https://doi.org/10.1073/pnas.101304298>
- Dehecq J-S, Baville M, Margueron T, Mussard R, Filleul L. 2011. La réémergence du chikungunya à La Réunion en 2010: évolution des actions de lutte antivectorielle. *Bull Société Pathol Exot.* 104(2):153–160. <https://doi.org/10.1007/s13149-010-0121-5>
- Delatte H, Bagny L, Brengue C, Bouetard A, Paupy C, Fontenille D. 2011. The invaders: Phylogeography of dengue and chikungunya viruses *Aedes* vectors, on the South West islands of the Indian Ocean. *Infect Genet Evol.* 11(7):1769–1781. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.07.016>
- Delatte H, Dehecq JS, Thiria J, Domerg C, Paupy C, Fontenille D. 2008. Geographic Distribution and Developmental Sites of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) During a Chikungunya Epidemic Event. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 8(1):25–34. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0649>
- Delatte H, Desvars A, Bouétard A, Bord S, Gimonneau G, Vourc'h G, Fontenille D. 2010. Blood-Feeding Behavior of *Aedes albopictus*, a Vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 10(3):249–258. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0026>
- Delatte H, Gimonneau G, Triboire A, 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(1):33–41. <https://doi.org/10.1603/033.046.0105>
- Delatte H, Paupy C, Dehecq JS, Thiria J, Failloux AB, Fontenille D. 2008. *Aedes albopictus*, vecteur des virus du chikungunya et de la dengue à la Réunion: biologie et contrôle. *Parasite.* 15(1):3–13. <https://doi.org/10.1051/parasite/2008151003>
- Delaunay P, Hubiche T, Blanc V, Perrin Y, Marty P, Del Giudice P. 2012. *Aedes albopictus* en France métropolitaine. *Ann Dermatol Vénérologie.* 139(5):396–401. <https://doi.org/10.1016/j.annder.2011.12.005>
- Delisle E, Rousseau C, Broche B, Leparç-Goffart I, L'Ambert G, Cochet A, Prat C, Foulongne V, Ferre JB, Catelinois O, et al. 2015. Chikungunya outbreak in Montpellier, France, September to October 2014. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull.* 20(17):21108. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2015.20.17.21108>
- Dellagi K, Salez N, Maquart M, Larrieu S, Yssouf A, Silaï R, Leparç-Goffart I, Tortosa P, Lamballerie X de. 2016. Serological Evidence of Contrasted Exposure to Arboviral Infections between Islands of the Union of Comoros (Indian Ocean). *PLoS Negl Trop Dis.* 10(12):e0004840. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004840>
- Delrieu M, Martinet J-P, O'Connor O, Viennet E, Menkes C, Burtet-Sarramegna V, D. Frentiu F, Dupont-Rouzeyrol M. 2023. Temperature and transmission of chikungunya, dengue, and Zika viruses: A systematic review of experimental studies on *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Curr Res*

Parasitol Vector-Borne Dis. 4:100139. <https://doi.org/10.1016/j.crpvbd.2023.100139>

Deng S, Huang Q, Wei H, Zhou L, Yao L, Li D, Shuizhen W, Chen J, Peng H. 2019. *Beauveria bassiana* infection reduces the vectorial capacity of *Aedes albopictus* for the Zika virus. *J Pest Sci.* 92. <https://doi.org/10.1007/s10340-019-01081-0>

Deng S-Q, Yang X, Wei Y, Chen J-T, Wang X-J, Peng H-J. 2020. A Review on Dengue Vaccine Development. *Vaccines.* 8(1):63. <https://doi.org/10.3390/vaccines8010063>

Dennison NJ, BenMarzouk-Hidalgo OJ, Dimopoulos G. 2015. MicroRNA-regulation of *Anopheles gambiae* immunity to *Plasmodium falciparum* infection and midgut microbiota. *Dev Comp Immunol.* 49(1):170–178. <https://doi.org/10.1016/j.dci.2014.10.016>

Dennison NJ, Jupatanakul N, Dimopoulos G. 2014. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci.* 3:6–13. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.004>

Desquesnes M, Dia ML. 2004. Mechanical transmission of *Trypanosoma vivax* in cattle by the African tabanid *Atylotus fuscipes*. *Vet Parasitol.* 119(1):9–19. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.10.015>

Dev V, Dash AP. 2008. Insecticide-Treated Nets, the Key Element for Rolling Back Malaria in North-Eastern India: Policy and Practice. *Open Entomol J [Internet].* [accessed 2024 Apr 12] 2(1). <https://benthamopen.com/ABSTRACT/TOENTOJ-2-14>

Dick GWA, Kitchen SF, Haddow AJ. 1952. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* Volume 46(Issue 5):Pages 509-520. [https://doi.org/doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)

Dickson LB, Jiolle D, Minard G, Moltini-Conclois I, Volant S, Ghozlane A, Bouchier C, Ayala D, Paupy C, Moro CV, Lambrechts L. 2017. Carryover effects of larval exposure to different environmental bacteria drive adult trait variation in a mosquito vector. *Sci Adv.* 3(8):e1700585. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700585>

DiSera L, Sjödin H, Rocklöv J, Tozan Y, Súdre B, Zeller H, Muñoz ÁG. 2020. The Mosquito, the Virus, the Climate: An Unforeseen Réunion in 2018. *GeoHealth.* 4(8):e2020GH000253. <https://doi.org/10.1029/2020GH000253>

Dixon LK, Sun H, Roberts H. 2019. African swine fever. *Antiviral Res.* 165:34–41. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2019.02.018>

Domingo E, García-Crespo C, Perales C. 2021. Historical Perspective on the Discovery of the Quasispecies Concept. *Annu Rev Virol.* 8(1):51–72. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-091919-105900>

Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. 2009. Implication of the Mosquito Midgut Microbiota in the Defense against Malaria Parasites. *PLOS Pathog.* 5(5):e1000423. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000423>

Dong Y, Morton JC, Ramirez JL, Souza-Neto JA, Dimopoulos G. 2012. The entomopathogenic fungus *Beauveria bassiana* activate toll and JAK-STAT pathway-controlled effector genes and anti-dengue activity in *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 42(2):126–132. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2011.11.005>

Dorléans F, Hoen B, Najjioullah F, Herrmann-Storck C, Schepers KM, Abel S, Lamaury I, Fagour L, Césaire R, Guyomard S, et al. 2018. Outbreak of Chikungunya in the French Caribbean Islands of Martinique and Guadeloupe: Findings from a Hospital-Based Surveillance System (2013–2015). *Am J Trop Med Hyg.* 98(6):1819–1825. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0719>

D’Ortenzio E, Balleydier E, Bavielle M, Filleul L, Renault P. 2011. Dengue à la Réunion et dans les îles du sud-ouest de l’océan Indien. *Médecine Mal Infect.* 41(9):475–479. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2010.11.021>

Drake JW, Holland JJ. 1999. Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci [Internet].* [accessed 2024 Apr 16] Vol. 96(No. 24). <https://doi.org/10.1073/pnas.96.24.13910>

Duangkhae P, Erdos G, Ryman KD, Watkins SC, Falo LD, Marques ETA, Barratt-Boyes SM. 2018. Interplay between Keratinocytes and Myeloid Cells Drives Dengue Virus Spread in Human Skin. *J Invest Dermatol.* 138(3):618–626. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.10.018>

Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, et al. 2009. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 360(24):2536–2543. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>

- Duong V, Andries A-C, Ngan C, Sok T, Richner B, Asgari-Jirhandeh N, Bjorge S, Huy R, Ly S, Laurent D, et al. 2012. Reemergence of Chikungunya Virus in Cambodia. *Emerg Infect Dis.* 18(12):2066–2069. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120471>
- Duong V, Henn MR, Simmons C, Ngan C, Y B, Gavotte L, Viari A, Ong S, Huy R, Lennon NJ, et al. 2013. Complex dynamic of dengue virus serotypes 2 and 3 in Cambodia following series of climate disasters. *Infect Genet Evol.* 15:77–86. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.05.012>
- Duong V, Lambrechts L, Paul RE, Ly S, Lay RS, Long KC, Huy R, Tarantola A, Scott TW, Sakuntabhai A, Buchy P. 2015. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci.* 112(47):14688–14693. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508114112>
- Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D’Ortenzio E, Thiberge J-M, Baroux N, Gourinat A-C, Grandadam 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. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0937>
- Dutra HLC, Rocha MN, Dias FBS, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. 2016. Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe.* 19(6):771–774. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.04.021>
- ECDC (European Center for Disease prevention and Control). 2018. Local transmission of dengue fever in France and Spain - 2018 [Internet]. Stockholm: ECDC; [accessed 2022 May 23]. <https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/08-10-2018-RRA-Dengue-France.pdf>
- ECDC (European Center for Disease prevention and Control). 2019. Autochthonous cases of dengue in Spain and France, 1 October 2019.
- Edwards FW. 1920. Notes on the Mosquitos of Madagascar, Mauritius and Réunion. *Bull Entomol Res.* 11(2):133–138. <https://doi.org/10.1017/S0007485300044539>
- Eigen M. 1971. Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften.* 58(10):465–523. <https://doi.org/10.1007/BF00623322>
- Eigen M, Schuster P. 1978. The Hypercycle. *Naturwissenschaften.* 65(1):7–41. <https://doi.org/10.1007/BF00420631>
- van den Elsen K, Quek JP, Luo D. 2021. Molecular Insights into the Flavivirus Replication Complex. *Viruses.* 13(6):956. <https://doi.org/10.3390/v13060956>
- Enserink M. 2008. A Mosquito Goes Global.
- Erbel P, Schiering N, D’Arcy A, Renatus M, Kroemer M, Lim SP, Yin Z, Keller TH, Vasudevan SG, Hommel U. 2006. Structural basis for the activation of flaviviral NS3 proteases from dengue and West Nile virus. *Nat Struct Mol Biol.* 13(4):372–373. <https://doi.org/10.1038/nsmb1073>
- Etebari K, Hegde S, Saldaña MA, Widen SG, Wood TG, Asgari S, Hughes GL. 2017. Global Transcriptome Analysis of *Aedes aegypti* Mosquitoes in Response to Zika Virus Infection. *mSphere.* 2(6):10.1128/msphere.00456-17. <https://doi.org/10.1128/msphere.00456-17>
- Ezenwa VO, Archie EA, Craft ME, Hawley DM, Martin LB, Moore J, White L. 2016. Host behaviour–parasite feedback: an essential link between animal behaviour and disease ecology. *Proc R Soc B Biol Sci.* 283(1828):20153078. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.3078>
- Falgout B, Pethel M, Zhang YM, Lai CJ. 1991. Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins. *J Virol.* 65(5):2467–2475. <https://doi.org/10.1128/jvi.65.5.2467-2475.1991>
- Fansiri T, Fontaine A, Diancourt L, Caro V, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, Ponlawat A, Lambrechts L. 2013. Genetic Mapping of Specific Interactions between *Aedes aegypti* Mosquitoes and Dengue Viruses. *PLOS Genet.* 9(8):e1003621. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003621>
- Farnesi LC, Menna-Barreto RFS, Martins AJ, Valle D, Rezende GL. 2015. Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J Insect Physiol.* 83:43–52. <https://doi.org/10.1016/j.jinsphys.2015.10.006>
- Farnesi LC, Vargas HCM, Valle D, Rezende GL. 2017. Darker eggs of mosquitoes resist more to dry conditions: Melanin enhances serosal cuticle contribution in egg resistance to desiccation in *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* vectors. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(10):e0006063. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006063>
- Fast EM, Toomey ME, Panaram K, Desjardins D, Kolaczyk ED, Frydman HM. 2011. *Wolbachia* Enhance

- Drosophila* Stem Cell Proliferation and Target the Germline Stem Cell Niche. *Science*. 334(6058):990–992. <https://doi.org/10.1126/science.1209609>
- Fatima K, Syed NI. 2018. Dengvaxia controversy: impact on vaccine hesitancy. *J Glob Health*. 8(2):010312. <https://doi.org/10.7189/jogh.08-020312>
- Ferguson NM, Hue Kien DT, Clapham H, Aguas R, Trung VT, Bich Chau TN, Popovici J, Ryan PA, O’Neill SL, McGraw EA, et al. 2015. Modeling the impact on virus transmission of Wolbachia-mediated blocking of dengue virus infection of *Aedes aegypti*. *Sci Transl Med*. 7(279):279ra37-279ra37. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3010370>
- Ferreira QR, Lemos FFB, Moura MN, Nascimento JO de S, Novaes AF, Barcelos IS, Fernandes LA, Amaral LS de B, Barreto FK, Melo FF de. 2023. Role of the Microbiome in *Aedes* spp. Vector Competence: What Do We Know? *Viruses*. 15(3):779. <https://doi.org/10.3390/v15030779>
- Ferreira-de-Lima VH, Lima-Camara TN. 2018. Natural vertical transmission of dengue virus in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*: a systematic review. *Parasit Vectors*. 11(1):77. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2643-9>
- Flores HA, O’Neill SL. 2018. Controlling vector-borne disease by releasing modified mosquitoes. *Nat Rev Microbiol*. 16(8):508–518. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0025-0>
- da Fonseca NJ, Lima Afonso MQ, Pedersolli NG, de Oliveira LC, Andrade DS, Bleicher L. 2017. Sequence, structure and function relationships in flaviviruses as assessed by evolutive aspects of its conserved non-structural protein domains. *Biochem Biophys Res Commun*. 492(4):565–571. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2017.01.041>
- Foray V, Pérez-Jiménez MM, Fattouh N, Landmann F. 2018. Wolbachia Control Stem Cell Behavior and Stimulate Germline Proliferation in Filarial Nematodes. *Dev Cell*. 45(2):198-211.e3. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2018.03.017>
- Forshey BM, Stoddard ST, Morrison AC. 2016. Dengue Viruses and Lifelong Immunity: Reevaluating the Conventional Wisdom. *J Infect Dis*. 214(7):979–981. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw102>
- Foster J, Ganatra M, Kamal I, Ware J, Makarova K, Ivanova N, Bhattacharyya A, Kapatral V, Kumar S, Posfai J, et al. 2005. The Wolbachia Genome of *Brugia malayi*: Endosymbiont Evolution within a Human Pathogenic Nematode. *PLOS Biol*. 3(4):e121. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030121>
- Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. 2015. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*. 7(7):3741–3767. <https://doi.org/10.3390/v7072795>
- Franz AWE, Sanchez-Vargas I, Adelman ZN, Blair CD, Beaty BJ, James AA, Olson KE. 2006. Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(11):4198–4203. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600479103>
- Frentiu FD, Robinson J, Young PR, McGraw EA, O’Neill SL. 2010. Wolbachia-Mediated Resistance to Dengue Virus Infection and Death at the Cellular Level. Coffey LL, editor. *PLoS ONE*. 5(10):e13398. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013398>
- Frentiu FD, Zakir T, Walker T, Popovici J, Pyke AT, Hurk A van den, McGraw EA, O’Neill SL. 2014. Limited Dengue Virus Replication in Field-Collected *Aedes aegypti* Mosquitoes Infected with Wolbachia. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(2):e2688. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002688>
- Frolet C, Thoma M, Blandin S, Hoffmann JA, Leвшина EA. 2006. Boosting NF- κ B-Dependent Basal Immunity of *Anopheles gambiae* Aborts Development of *Plasmodium berghei*. *Immunity*. 25(4):677–685. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2006.08.019>
- Frydman HM, Li JM, Robson DN, Wieschaus E. 2006. Somatic stem cell niche tropism in Wolbachia. *Nature*. 441(7092):509–512. <https://doi.org/10.1038/nature04756>
- Fujii Y, Kubo T, Ishikawa H, Sasaki T. 2004. Isolation and characterization of the bacteriophage WO from Wolbachia, an arthropod endosymbiont. *Biochem Biophys Res Commun*. 317(4):1183–1188. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2004.03.164>
- Fukui T, Kawamoto M, Shoji K, Kiuchi T, Sugano S, Shimada T, Suzuki Y, Katsuma S. 2015. The Endosymbiotic Bacterium Wolbachia Selectively Kills Male Hosts by Targeting the Masculinizing Gene. *PLOS Pathog*. 11(7):e1005048. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005048>
- Fukuto TR. 1990. Mechanism of action of organophosphorus and carbamate insecticides. *Environ Health Perspect*. 87:245–254.
- Gainor EM, Harris E, LaBeaud AD. 2022. Uncovering the Burden of Dengue in Africa: Considerations on Magnitude, Misdiagnosis, and Ancestry. *Viruses*. 14(2):233. <https://doi.org/10.3390/v14020233>

- Gan SJ, Leong YQ, bin Barhanuddin MFH, Wong ST, Wong SF, Mak JW, Ahmad RB. 2021. Dengue fever and insecticide resistance in *Aedes* mosquitoes in Southeast Asia: a review. *Parasit Vectors*. 14(1):315. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04785-4>
- Gao H, Cui C, Wang L, Jacobs-Lorena M, Wang S. 2020. Mosquito Microbiota and Implications for Disease Control. *Trends Parasitol*. 36(2):98–111. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2019.12.001>
- Garcia-Rejon JE, Navarro J-C, Cigarroa-Toledo N, Baak-Baak CM. 2021. An Updated Review of the Invasive *Aedes albopictus* in the Americas; Geographical Distribution, Host Feeding Patterns, Arbovirus Infection, and the Potential for Vertical Transmission of Dengue Virus. *Insects*. 12(11):967. <https://doi.org/10.3390/insects12110967>
- Garcia--Van Smévoorde M, Piorkowski G, Emboulé L, Dos Santos G, Loraux C, Guyomard-Rabenirina S, Joannes M-O, Fagour L, Najioullah F, Cabié A, et al. 2023. Phylogenetic Investigations of Dengue 2019–2021 Outbreak in Guadeloupe and Martinique Caribbean Islands. *Pathogens*. 12(9):1182. <https://doi.org/10.3390/pathogens12091182>
- Garrett-Jones C. 1964. PROGNOSIS FOR INTERRUPTION OF MALARIA TRANSMISSION THROUGH ASSESSMENT OF THE MOSQUITO'S VECTORIAL CAPACITY. *Nature*. 204:1173–1175. <https://doi.org/10.1038/2041173a0>
- Garver LS, Bahia AC, Das S, Souza-Neto JA, Shiao J, Dong Y, Dimopoulos G. 2012. Anopheles Imd Pathway Factors and Effectors in Infection Intensity-Dependent Anti-Plasmodium Action. *PLOS Pathog*. 8(6):e1002737. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002737>
- Garver LS, Dong Y, Dimopoulos G. 2009. Caspar Controls Resistance to Plasmodium falciparum in Diverse Anopheline Species. *PLOS Pathog*. 5(3):e1000335. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000335>
- Gendrin M, Rodgers FH, Yerbanga RS, Ouédraogo JB, Basáñez M-G, Cohuet A, Christophides GK. 2015. Antibiotics in ingested human blood affect the mosquito microbiota and capacity to transmit malaria. *Nat Commun*. 6:5921. <https://doi.org/10.1038/ncomms6921>
- Geoghegan V, Stainton K, Rainey SM, Ant TH, Dowle AA, Larson T, Hester S, Charles PD, Thomas B, Sinkins SP. 2017. Perturbed cholesterol and vesicular trafficking associated with dengue blocking in Wolbachia-infected *Aedes aegypti* cells. *Nat Commun*. 8(1):526. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-00610-8>
- Gérardin P, Perrau J, Fianu A, Favier F. 2008. Déterminants de l'infection à virus chikungunya à la Réunion: Résultats de l'enquête Serochik de séroprévalence en population, août-octobre 2006. *Bull Épidémiologique Hebd.*:361–363.
- Ghosh A, Sukla S, Nath H, Saha R, De A, Biswas S. 2022. Non-structural protein 1 (NS1) variants from dengue virus clinical samples revealed mutations that influence NS1 production and secretion. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 41(5):803–814. <https://doi.org/10.1007/s10096-022-04441-4>
- GIEC G d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat, Masson-Delmotte V, Zhai P, Pörtner HO, Roberts D, Skea J, Shukla PR, Pirani A, Moufouma-Okia W, Péan C, et al. 2019. Résumé à l'intention des décideurs, Réchauffement planétaire de 1,5 °C [Internet]. Organisation météorologique mondiale, Genève, Suisse,; [accessed 2022 Sep 28]. https://www.ipcc.ch/site/assets/uploads/sites/2/2019/09/IPCC-Special-Report-1.5-SPM_fr.pdf
- Gillespie LK, Hoenen A, Morgan G, Mackenzie JM. 2010. The Endoplasmic Reticulum Provides the Membrane Platform for Biogenesis of the Flavivirus Replication Complex. *J Virol*. 84(20):10438–10447. <https://doi.org/10.1128/JVI.00986-10>
- Girod R. 2004. First record of *Aedes albopictus* in Mayotte Island, Comoros archipelago. *Parasite Paris Fr*. 11(1):74.
- Giron S, Franke F, Decoppet A, Cadiou B, Travaglini T, Thirion L, Durand G, Jeannin C, L'Ambert G, Gard G, et al. 2019. Vector-borne transmission of Zika virus in Europe, southern France, August 2019. *Eurosurveillance*. 24(45):1900655. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.45.1900655>
- Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobučar A, Pem-Novosel I, Kurečić-Filipović S, Komparak S, Martić R, Duričić S, et al. 2011. Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro Surveill Bull Eur Sur Mal Transm Eur Commun Dis Bull*. 16(9):19805.
- Glaser RL, Meola MA. 2010. The Native Wolbachia Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. Liu DX, editor. *PLoS ONE*. 5(8):e11977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011977>

- Gloria-Soria A, Ayala D, Bheecarry A, Calderon-Arguedas O, Chadee DD, Chiappero M, Coetzee M, Elahee KB, Fernandez-Salas I, Kamal HA, et al. 2016. Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Mol Ecol*. 25(21):5377–5395. <https://doi.org/10.1111/mec.13866>
- Gloria-Soria A, Payne AF, Bialosuknia SM, Stout J, Mathias N, Eastwood G, Ciota AT, Kramer LD, Armstrong PM. 2020. Vector Competence of *Aedes albopictus* Populations from the Northeastern United States for Chikungunya, Dengue, and Zika Viruses. *Am J Trop Med Hyg*. 104(3):1123–1130. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.20-0874>
- Gomard Y, Hafsia S, Lebon C, Rabarison P, Idaroussi A, Yssouf A, Boussès P, Mavingui P, Atyame C. 2024. Genetic diversity of endosymbiotic bacteria *Wolbachia* infecting two mosquito species of the genus *Eretmapodites* occurring in sympatry in the Comoros archipelago. *Front Microbiol* [Internet]. [accessed 2024 Mar 27] 15. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1343917>
- Gomard Y, Lebon C, Mavingui P, Atyame CM. 2020. Contrasted transmission efficiency of Zika virus strains by mosquito species *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Reunion Island. *Parasit Vectors*. 13(1):398. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04267-z>
- Gottlieb Y, Zchori-Fein E. 2001. Irreversible thelytokous reproduction in *Muscidifurax uniraptor*. *Entomol Exp Appl*. 100(3):271–278. <https://doi.org/10.1046/j.1570-7458.2001.00874.x>
- Gouagna LC, Damiens D, Oliva CF, Boyer S, Le Goff G, Brengues C, Dehecq J-S, Raude J, Simard F, Fontenille D. 2020. Strategic Approach, Advances, and Challenges in the Development and Application of the SIT for Area-Wide Control of *Aedes albopictus* Mosquitoes in Reunion Island. *Insects*. 11(11):770. <https://doi.org/10.3390/insects11110770>
- Goubert C, Henri H, Minard G, Valiente Moro C, Mavingui P, Vieira C, Boulesteix M. 2017. High-throughput sequencing of transposable element insertions suggests adaptive evolution of the invasive Asian tiger mosquito towards temperate environments. *Mol Ecol*. 26(15):3968–3981. <https://doi.org/10.1111/mec.14184>
- Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge J-M, Souarès Y, Failloux A-B, Tolou HJ, Budelot M, Cosserrat D, Leparç-Goffart I, Desprès P. 2011. Chikungunya Virus, Southeastern France. *Emerg Infect Dis*. 17(5):910–913. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101873>
- Gratz NG. 2004. Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol*. 18(3):215–227. <https://doi.org/10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x>
- Greenblatt RJ, Work TM, Balazs GH, Sutton CA, Casey RN, Casey JW. 2004. The *Ozobranchus* leech is a candidate mechanical vector for the fibropapilloma-associated turtle herpesvirus found latently infecting skin tumors on Hawaiian green turtles (*Chelonia mydas*). *Virology*. 321(1):101–110. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2003.12.026>
- Grunnill M, Boots M. 2016. How Important is Vertical Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes (Diptera: Culicidae)? *J Med Entomol*. 53(1):1–19. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv168>
- Grunwald N, Brown C, Ip HS, Chang JH. 2022. Chapter 2 Emerging Processes Facilitating Pathogen Emergence. In: *Tactical Sci Biosecurity Anim Plant Syst*. [place unknown]: IGI Global; p. 32–53.
- Gubler DJ. 2006. Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: History and Current Status. In: Bock G, Goode J, editors. *Novartis Found Symp* [Internet]. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd; [accessed 2021 May 19]; p. 3–22. <https://doi.org/10.1002/0470058005.ch2>
- Guégan M, Zouache K, Démichel C, Minard G, Tran Van V, Potier P, Mavingui P, Valiente Moro C. 2018. The mosquito holobiont: fresh insight into mosquito-microbiota interactions. *Microbiome*. 6(1):49. <https://doi.org/10.1186/s40168-018-0435-2>
- Guo C, Zhou Z, Wen Z, Liu Y, Zeng C, Xiao D, Ou M, Han Y, Huang S, Liu D, et al. 2017. Global Epidemiology of Dengue Outbreaks in 1990–2015: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Cell Infect Microbiol*. 7:317. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00317>
- Guo X-X, Zhu X-J, Li C-X, Dong Y-D, Zhang Y-M, Xing D, Xue R-D, Qin C-F, Zhao T-Y. 2013. Vector competence of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for DEN2-43 and New Guinea C virus strains of dengue 2 virus. *Acta Trop*. 128(3):566–570. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.08.006>
- Gupta L, Molina-Cruz A, Kumar S, Rodrigues J, Dixit R, Zamora RE, Barillas-Mury C. 2009. The STAT Pathway Mediates Late-Phase Immunity against *Plasmodium* in the Mosquito *Anopheles gambiae*. *Cell Host Microbe*. 5(5):498–507. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.04.003>
- Gupta RC, Miller Mukherjee IR, Malik JK, Doss RB, Dettbarn W-D, Milatovic D. 2019. Chapter 26 -

Insecticides. In: Gupta RC, editor. *Biomark Toxicol Second Ed* [Internet]. [place unknown]: Academic Press; [accessed 2024 Jan 31]; p. 455–475. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814655-2.00026-8>

Guzman MG, Alvarez M, Halstead SB. 2013. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Arch Virol.* 158(7):1445–1459. <https://doi.org/10.1007/s00705-013-1645-3>

Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB, Weaver SC. 2012. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(2):e1477. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001477>

Hadfield KA, Smit NJ. 2019. Parasitic Crustacea as Vectors. In: Smit NJ, Bruce NL, Hadfield KA, editors. *Parasit Crustac* [Internet]. Vol. 3. Cham: Springer International Publishing; [accessed 2022 Dec 21]; p. 331–342. https://doi.org/10.1007/978-3-030-17385-2_7

Hafsia S, Barbar T, Wilkinson DA, Atyame C, Biscornet L, Bibi J, Louange M, Gedeon J, De Santis O, Flahault A, et al. 2023. Genetic characterization of dengue virus serotype 1 circulating in Reunion Island, 2019–2021, and the Seychelles, 2015–2016. *BMC Infect Dis.* 23(1):294. <https://doi.org/10.1186/s12879-023-08125-y>

Hafsia S, Haramboure M, Wilkinson DA, Baldet T, Yemadje-Menudier L, Vincent M, Tran A, Atyame C, Mavingui P. 2022. Overview of dengue outbreaks in the southwestern Indian Ocean and analysis of factors involved in the shift toward endemicity in Reunion Island: A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 16(7):e0010547. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010547>

Halstead SB. 1974. Etiologies of the Experimental Dengues of Siler and Simmons. *Am J Trop Med Hyg.* 23(5):974–982. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1974.23.974>

Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, et al. 2015. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol.* 89(17):8880–8896. <https://doi.org/10.1128/JVI.00354-15>

Hammon WMcD, Rudnick A, Sather GE. 1960. Viruses Associated with Epidemic Hemorrhagic Fevers of the Philippines and Thailand. *Science.* 131(3407):1102–1103. <https://doi.org/10.1126/science.131.3407.1102>

Hardy JL, Houk EJ, Kramer LD, Reeves WC. 1983. Intrinsic Factors Affecting Vector Competence of Mosquitoes for Arboviruses. *Annu Rev Entomol.* 28(1):229–262. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.28.010183.001305>

HAS (Haute Autorité de Santé). 2021. DENGIVAXIA (vaccin contre la dengue quadrivalent (vivant, atténué)) [Internet]. [place unknown]; [accessed 2024 Apr 23]. https://www.has-sante.fr/jcms/p_3302593/fr/dengvaxia-vaccin-contre-la-dengue-quadrivalent-vivant-attenué

Hawaria D, Demissew A, Kibret S, Lee M-C, Yewhalaw D, Yan G. 2020. Effects of environmental modification on the diversity and positivity of anopheline mosquito aquatic habitats at Arjo-Dedessa irrigation development site, Southwest Ethiopia. *Infect Dis Poverty.* 9(1):9. <https://doi.org/10.1186/s40249-019-0620-y>

Hegde S, Khanipov K, Albayrak L, Golovko G, Pimenova M, Saldaña MA, Rojas MM, Hornett EA, Motl GC, Fredregill CL, et al. 2018. Microbiome Interaction Networks and Community Structure From Laboratory-Reared and Field-Collected *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Culex quinquefasciatus* Mosquito Vectors. *Front Microbiol* [Internet]. [accessed 2023 Oct 6] 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2018.02160>

Herath JMMK, De Silva WAPP, Weeraratne TC, Karunaratne SHPP. 2024. Efficacy of the insect growth regulator novaluron in the control of dengue vector mosquitoes *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Sci Rep.* 14(1):1988. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-52384-x>

Hertig E. 2019. Distribution of Anopheles vectors and potential malaria transmission stability in Europe and the Mediterranean area under future climate change. *Parasit Vectors.* 12(1):18. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3278-6>

Hertig M, Wolbach SB. 1924. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *J Med Res.* 44(3):329-374.7.

Hery L, Boullis A, Vega-Rúa A. 2021. Les propriétés biotiques et abiotiques des gîtes larvaires d'*Aedes aegypti* et leur influence sur les traits de vie des adultes (synthèse bibliographique). *BASE* [Internet].

[accessed 2024 Jan 13]. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.18886>

Hess AM, Prasad AN, Ptitsyn A, Ebel GD, Olson KE, Barbacioru C, Monighetti C, Campbell CL. 2011. Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. *BMC Microbiol.* 11(1):45. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-45>

Hillyer JF, Schmidt SL, Christensen BM. 2003. RAPID PHAGOCYTOSIS AND MELANIZATION OF BACTERIA AND PLASMODIUM SPOOROZOITES BY HEMOCYTES OF THE MOSQUITO Aedes Aegypti. *J Parasitol.* 89(1):62–69. [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2003\)089\[0062:RPAMOB\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2003)089[0062:RPAMOB]2.0.CO;2)

Ho L-J, Wang J-J, Shiao M-F, Kao C-L, Chang D-M, Han S-W, Lai J-H. 2001. Infection of Human Dendritic Cells by Dengue Virus Causes Cell Maturation and Cytokine Production. *J Immunol.* 166(3):1499–1506. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.3.1499>

Hoffmann AA. 1988. Partial cytoplasmic incompatibility between two Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Entomol Exp Appl.* 48(1):61–67. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1988.tb02299.x>

Hoffmann AA, Clancy DJ, Merton E. 1994. Cytoplasmic incompatibility in Australian populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics* [Internet]. [accessed 2022 Oct 13] 136(3). <https://doi.org/10.1093/genetics/136.3.993>

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, Greenfield M, Durkan M, Leong YS, Dong Y, et al. 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature.* 476(7361):454–457. <https://doi.org/10.1038/nature10356>

Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ. 2012. Interactions between the microbiota and the immune system. *Science.* 336(6086):1268–1273. <https://doi.org/10.1126/science.1223490>

Horstick O, Tozan Y, Wilder-Smith A. 2015. Reviewing Dengue: Still a Neglected Tropical Disease? *PLoS Negl Trop Dis.* 9(4):e0003632. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003632>

Hotta S. 1952. Experimental Studies on Dengue: I. Isolation, Identification and Modification of the Virus. *J Infect Dis.* 90(1):1–9.

Huang Y-JS, Lyons AC, Hsu W-W, Park SL, Higgs S, Vanlandingham DL. 2017. Differential outcomes of Zika virus infection in *Aedes aegypti* orally challenged with infectious blood meals and infectious protein meals. *PloS One.* 12(8):e0182386. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0182386>

Huber M, Cabib E, Miller LH. 1991. Malaria parasite chitinase and penetration of the mosquito peritrophic membrane. *Proc Natl Acad Sci.* 88(7):2807–2810. <https://doi.org/10.1073/pnas.88.7.2807>

Hughes GL, Koga R, Xue P, Fukatsu T, Rasgon JL. 2011. *Wolbachia* Infections Are Virulent and Inhibit the Human Malaria Parasite *Plasmodium Falciparum* in *Anopheles Gambiae*. Schneider DS, editor. *PLoS Pathog.* 7(5):e1002043. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002043>

van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT, Frentiu FD, McElroy K, Day A, Higgs S, O'Neill SL. 2012. Impact of *Wolbachia* on Infection with Chikungunya and Yellow Fever Viruses in the Mosquito Vector *Aedes aegypti*. Turell MJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(11):e1892. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001892>

Hurst GDD, Majerus MEN. 1993. Why do maternally inherited microorganisms kill males? *Heredity.* 71(1):81–95. <https://doi.org/10.1038/hdy.1993.110>

Hussain M, Frentiu FD, Moreira LA, O'Neill SL, Asgari S. 2011. *Wolbachia* uses host microRNAs to manipulate host gene expression and facilitate colonization of the dengue vector *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci.* 108(22):9250–9255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105469108>

Hussain M, Lu G, Torres S, Edmonds JH, Kay BH, Khromykh AA, Asgari S. 2013. Effect of *Wolbachia* on Replication of West Nile Virus in a Mosquito Cell Line and Adult Mosquitoes. *J Virol.* 87(2):851–858. <https://doi.org/10.1128/JVI.01837-12>

InterPro. DEAD box, Flavivirus (IPR011492) - InterPro entry - InterPro [Internet]. [accessed 2023 Feb 21]. <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR011492/>

Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O'Neill SL. 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep.* 12(6):508–518. <https://doi.org/10.1038/embor.2011.84>

Jana-Kara BR, Jihullah WA, Shahi B, Dev V, Curtis CF, Sharma VP. 1995. Deltamethrin impregnated bednets against *Anopheles minimus* transmitted malaria in Assam, India. *J Trop Med Hyg.* 98(2):73–83.

Jefferies D, Livesey JL, Molyneux DH. 1986. Fluid mechanics of bloodmeal uptake by *Leishmania*-infected sandflies. *Acta Trop.* 43(1):43–53.

- Jia N, Jiang Y, Jian X, Cai T, Liu Q, Liu Y, Xing D, Dong Y, Guo X, Zhao T. 2023. Transcriptome Analysis of Response to Zika Virus Infection in Two *Aedes albopictus* Strains with Different Vector Competence. *Int J Mol Sci.* 24(5):4257. <https://doi.org/10.3390/ijms24054257>
- Joanne S, Vythilingam I, Teoh B-T, Leong C-S, Tan K-K, Wong M-L, Yugavathy N, AbuBakar S. 2017. Vector competence of Malaysian *Aedes albopictus* with and without *Wolbachia* to four dengue virus serotypes. *Trop Med Int Health.* 22(9):1154–1165. <https://doi.org/10.1111/tmi.12918>
- Joanne S, Vythilingam I, Yugavathy N, Leong C-S, Wong M-L, AbuBakar S. 2015. Distribution and dynamics of *Wolbachia* infection in Malaysian *Aedes albopictus*. *Acta Trop.* 148:38–45. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.04.003>
- Johnson RM, Cozens DW, Ferdous Z, Armstrong PM, Brackney DE. 2023. Increased blood meal size and feeding frequency compromise *Aedes aegypti* midgut integrity and enhance dengue virus dissemination. *PLoS Negl Trop Dis.* 17(11):e0011703. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011703>
- Joyce JD, Nogueira JR, Bales AA, Pittman KE, Anderson JR. 2011. Interactions Between La Crosse Virus and Bacteria Isolated From the Digestive Tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 48(2):389–394. <https://doi.org/10.1603/ME09268>
- Juliano SA, O’Meara GF, Morrill JR, Cutwa MM. 2002. Desiccation and thermal tolerance of eggs and the coexistence of competing mosquitoes. *Oecologia.* 130(3):458–469. <https://doi.org/10.1007/s004420100811>
- Jupatanakul N, Sim S, Angleró-Rodríguez YI, Souza-Neto J, Das S, Poti KE, Rossi SL, Bergren N, Vasilakis N, Dimopoulos G. 2017. Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus. Olson KE, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 11(1):e0005187. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005187>
- Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G. 2014. The Insect Microbiome Modulates Vector Competence for Arboviruses. *Viruses.* 6(11):4294–4313. <https://doi.org/10.3390/v6114294>
- Kambhampati S, Rai KS, Burgun SJ. 1993. Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility in the Mosquito, *Aedes albopictus*. *Evolution.* 47(2):673–677. <https://doi.org/10.2307/2410079>
- Kambris Z, Cook PE, Phuc HK, Sinkins SP. 2009. Immune Activation by Life-Shortening *Wolbachia* and Reduced Filarial Competence in Mosquitoes. *Science.* 326(5949):134–136. <https://doi.org/10.1126/science.1177531>
- Kamyszek F. 1968. Investigations on the role of flies in the passive transmission of experimental mycosis in guinea pigs. *Med Weter.* 24(3):146–148.
- Kanakaratne N, Wahala WMPB, Messer WB, Tissera HA, Shahani A, Abeysinghe N, de Silva AM, Gunasekera M. 2009. Severe Dengue Epidemics in Sri Lanka, 2003–2006. *Emerg Infect Dis.* 15(2):192–199. <https://doi.org/10.3201/eid1502.080926>
- Kantor AM, Grant DG, Balaraman V, White TA, Franz AWE. 2018. Ultrastructural Analysis of Chikungunya Virus Dissemination from the Midgut of the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Viruses.* 10(10):571. <https://doi.org/10.3390/v10100571>
- Kariuki Njenga M, Nderitu L, Ledermann JP, Ndirangu A, Logue CH, Kelly CHL, Sang R, Serگون K, Breiman R, Powers AM. 2008. Tracking epidemic Chikungunya virus into the Indian Ocean from East Africa. *J Gen Virol.* 89(Pt 11):2754–2760. <https://doi.org/10.1099/vir.0.2008/005413-0>
- Katzelnick LC, Fonville JM, Gromowski GD, Arriaga JB, Green A, James SL, Lau L, Montoya M, Wang C, VanBlargan LA, et al. 2015. Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. :7.
- Katzelnick LC, Gresh L, Halloran ME, Mercado JC, Kuan G, Gordon A, Balmaseda A, Harris E. 2017. Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science.* 358(6365):929–932. <https://doi.org/10.1126/science.aan6836>
- Kauffman EB, Kramer LD. 2017. Zika Virus Mosquito Vectors: Competence, Biology, and Vector Control. *J Infect Dis.* 216(suppl_10):S976–S990. <https://doi.org/10.1093/infdis/jix405>
- Kaur R, Shropshire JD, Cross KL, Leigh B, Mansueto AJ, Stewart V, Bordenstein Sarah R., Bordenstein Seth R. 2021. Living in the endosymbiotic world of *Wolbachia*: A centennial review. *Cell Host Microbe.* 29(6):879–893. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2021.03.006>
- Kean J, Rainey SM, McFarlane M, Donald CL, Schnettler E, Kohl A, Pondeville E. 2015. Fighting Arbovirus Transmission: Natural and Engineered Control of Vector Competence in *Aedes* Mosquitoes. *Insects.* 6(1):236–278. <https://doi.org/10.3390/insects6010236>
- Keene KM, Foy BD, Sanchez-Vargas I, Beaty BJ, Blair CD, Olson KE. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.0406983101>

Kendie FA. 2020. Potential biological control agents against mosquito vector in the case of larvae stage: a review. *World News Nat Sci* [Internet]. [accessed 2024 Jan 31] 28. <http://yadda.icm.edu.pl/yadda/element/bwmeta1.element.agro-9c6ed6a3-03e3-444d-840f-3324c427d702>

Kenney JL, Brault AC. 2014. The Role of Environmental, Virological and Vector Interactions in Dictating Biological Transmission of Arthropod-Borne Viruses by Mosquitoes. In: *Adv Virus Res* [Internet]. Vol. 89. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2024 Jan 12]; p. 39–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800172-1.00002-1>

Khoo CC, Piper J, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Franz AW. 2010. The RNA Research article interference pathway affects midgut infection- and escape barriers for Sindbis virus in.

Kilpatrick AM, Seidl CM, Ipsaro IJ, Garrison CE, Fabbri G, Howell PI, McGowan AG, White BJ, Mitchell SN. 2024. Transinfection of *Wolbachia* wAlbB into *Culex quinquefasciatus* mosquitoes does not alter vector competence for Hawaiian avian malaria (*Plasmodium relictum* GRW4) [Internet]. [accessed 2024 Apr 28]:2024.02.16.580617. <https://doi.org/10.1101/2024.02.16.580617>

Kimura R, Hotta S. 1944. Studies on dengue fever (VI). On the inoculation of dengue virus into mice (in Japanese). *Nippon Igaku*.(No. 3379):629–633.

Kles V, Michault A, Rodhain F, Mevel F, Chastel C. 1994. [A serological survey regarding Flaviviridae infections on the island of Réunion (1971–1989). *Bull Soc Pathol Exot* 1990. 87(2):71–76.

Knipling EF. 1955. Possibilities of Insect Control or Eradication Through the Use of Sexually Sterile Males. *J Econ Entomol*. 48(4):459–462. <https://doi.org/10.1093/jee/48.4.459>

Knipling EF. 1959. Sterile-male method of population control. *Science*. 130(3380):902–904. <https://doi.org/10.1126/science.130.3380.902>

Kobayashi D, Murota K, Fujita R, Itokawa K, Kotaki A, Moi ML, Ejiri H, Maekawa Y, Ogawa K, Tsuda Y, et al. 2018. Dengue Virus Infection in *Aedes albopictus* during the 2014 Autochthonous Dengue Outbreak in Tokyo Metropolis, Japan. *Am J Trop Med Hyg*. 98(5):1460–1468. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0954>

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. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.1.4>

Kotsakiozi P, Gloria-Soria A, Schaffner F, Robert V, Powell JR. 2018. *Aedes aegypti* in the Black Sea: recent introduction or ancient remnant? *Parasit Vectors*. 11(1):396. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-2933-2>

Kraemer MUG, Reiner RC, Brady OJ, Messina JP, Gilbert M, Pigott DM, Yi D, Johnson K, Earl L, Marczak LB, et al. 2019. Past and future spread of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Nat Microbiol*. 4(5):854–863. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0376-y>

Kraemer MUG, Sinka ME, Duda KA, Mylne A, Shearer FM, Brady OJ, Messina JP, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, et al. 2015. The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Sci Data*. 2(1):150035. <https://doi.org/10.1038/sdata.2015.35>

Kramer LD, Ciota AT. 2015. Dissecting vectorial capacity for mosquito-borne viruses. *Curr Opin Virol*. 15:112–118. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.003>

Kremer N, Voronin D, Charif D, Mavingui P, Mollereau B, Vavre F. 2009. *Wolbachia* Interferes with Ferritin Expression and Iron Metabolism in Insects. Schneider DS, editor. *PLoS Pathog*. 5(10):e1000630. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000630>

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, et al. 2002. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell*. 108(5):717–725.

Kumar A, Srivastava P, Sirisena P, Dubey SK, Kumar R, Shrinet J, Sunil S. 2018. Mosquito Innate Immunity. *Insects*. 9(3):95. <https://doi.org/10.3390/insects9030095>

Kumar NP, Joseph R, Kamaraj T, Jambulingam P. 2008. A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. *J Gen Virol*. 89(8):1945–1948. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83628-0>

Kurosu T. 2011. Quasispecies of dengue virus. *Trop Med Health*. 39(4SUPPLEMENT):S29–S36.

<https://doi.org/10.2149/tmh.2011-S02>

- Lainhart W, Bickersmith SA, Moreno M, Rios CT, Vinetz JM, Conn JE. 2015. Changes in Genetic Diversity from Field to Laboratory during Colonization of *Anopheles darlingi* Root (Diptera: Culicidae). *Am J Trop Med Hyg.* 93(5):998–1001. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.15-0336>
- de Lamballerie X, Leroy E, Charrel RN, Ttsetsarkin K, Higgs S, Gould EA. 2008. Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virology* 5(1):33. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-5-33>
- Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, Scott TW. 2009. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol.* 9:160. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-9-160>
- Lanciotti RS, Lambert AJ, Holodniy M, Saavedra S, Signor L del CC. 2016. Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015. *Emerg Infect Dis.* 22(5):933–935. <https://doi.org/10.3201/eid2205.160065>
- Landmann F. 2019. The Wolbachia Endosymbionts. *Microbiol Spectr.* 7(2):7.2.25. <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.BAI-0018-2019>
- Landmann F, Orsi GA, Loppin B, Sullivan W. 2009. Wolbachia-Mediated Cytoplasmic Incompatibility Is Associated with Impaired Histone Deposition in the Male Pronucleus. *PLOS Pathog.* 5(3):e1000343. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000343>
- Landmann F, Voronin D, Sullivan W, Taylor MJ. 2011. Anti-filarial Activity of Antibiotic Therapy Is Due to Extensive Apoptosis after Wolbachia Depletion from Filarial Nematodes. *PLOS Pathog.* 7(11):e1002351. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002351>
- LaPointe DA, Atkinson CT, Samuel MD. 2012. Ecology and conservation biology of avian malaria. *Ann N Y Acad Sci.* 1249(1):211–226. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06431.x>
- Latreille AC, Milesi P, Magalon H, Mavingui P, Atyame CM. 2019. High genetic diversity but no geographical structure of *Aedes albopictus* populations in Réunion Island. *Parasit Vectors.* 12(1):597. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3840-x>
- Lauring AS, Andino R. 2010. Quasispecies Theory and the Behavior of RNA Viruses. *PLOS Pathog.* 6(7):e1001005. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001005>
- Lazear HM, Diamond MS. 2016. Zika Virus: New Clinical Syndromes and Its Emergence in the Western Hemisphere. *J Virol.* 90(10):4864–4875. <https://doi.org/10.1128/JVI.00252-16>
- L’Azou M, Taurel A-F, Flamand C, Quénel P. 2014. Recent Epidemiological Trends of Dengue in the French Territories of the Americas (2000–2012): A Systematic Literature Review. Horstick O, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(11):e3235. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003235>
- Lazzarini L, Barzon L, Foglia F, Manfrin V, Pacenti M, Pavan G, Rasmu M, Capelli G, Montarsi F, Martini S, et al. 2020. First autochthonous dengue outbreak in Italy, August 2020. *Eurosurveillance.* 25(36):2001606. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2020.25.36.2001606>
- Le Goff G, Boussès P, Julienne S, Brengues C, Rahola N, Rocamora G, Robert V. 2012. The mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Seychelles: taxonomy, ecology, vectorial importance, and identification keys. *Parasit Vectors.* 5:207. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-207>
- Le Goff G, Damiens D, Payet L, Ruttee A-H, Jean F, Lebon C, Dehecq J-S, Gouagna L-C. 2016. Enhancement of the BG-sentinel trap with varying number of mice for field sampling of male and female *Aedes albopictus* mosquitoes. *Parasit Vectors.* 9(1):514. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1801-1>
- Le Goff G, Goodman SM, Elguero E, Robert V. 2014. Survey of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Mayotte. *PLoS One.* 9(7):e100696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100696>
- Le Guyader H, Lecointre G. 2016. Classification phylogénétique du vivant [Internet]. 4e ed. [place unknown]: Belin; [accessed 2024 Apr 26]. <https://www.belin-editeur.com/classification-phylogenetique-du-vivant-tome-1-4e-edition>
- Leake CJ. 1992. Arbovirus-mosquito interactions and vector specificity. *Parasitol Today.* 8(4):123–128. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(92\)90279-B](https://doi.org/10.1016/0169-4758(92)90279-B)
- Lebeau G, Lagrave A, Ogire E, Grondin L, Seriacaroupin S, Moutoussamy C, Mavingui P, Hoarau J-J, Roche M, Krejbich-Trotot P, et al. 2021. Viral Toxin NS1 Implication in Dengue Pathogenesis Making It a Pivotal Target in Development of Efficient Vaccine. *Vaccines.* 9(9):946. <https://doi.org/10.3390/vaccines9090946>

- Lee CM, Xie X, Zou J, Li S-H, Lee MYQ, Dong H, Qin C-F, Kang C, Shi P-Y. 2015. Determinants of Dengue Virus NS4A Protein Oligomerization. *J Virol.* 89(12):6171–6183. <https://doi.org/10.1128/JVI.00546-15>
- Lee K-S, Lai Y-L, Lo S, Barkham T, Aw P, Ooi P-L, Tai J-C, Hibberd M, Johansson P, Khoo S-P, Ng L-C. 2010. Dengue Virus Surveillance for Early Warning, Singapore. *Emerg Infect Dis.* 16(5):847–849. <https://doi.org/10.3201/eid1605.091006>
- Léger P, Lara E, Jagla B, Sismeiro O, Mansuroglu Z, Coppée JY, Bonnefoy E, Bouloy M. 2013. Dicer-2- and Piwi-Mediated RNA Interference in Rift Valley Fever Virus-Infected Mosquito Cells. *J Virol.* 87(3):1631–1648. <https://doi.org/10.1128/jvi.02795-12>
- LePage DP, Metcalf JA, Bordenstein Sarah R., On J, Perlmutter JI, Shropshire JD, Layton EM, Funkhouser-Jones LJ, Beckmann JF, Bordenstein Seth R. 2017. Prophage WO genes recapitulate and enhance *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility. *Nature.* 543(7644):243–247. <https://doi.org/10.1038/nature21391>
- Lequime S, Fontaine A, Ar Gouilh M, Moltini-Conclois I, Lambrechts L. 2016. Genetic Drift, Purifying Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. Malik HS, editor. *PLOS Genet.* 12(6):e1006111. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006111>
- Leroy EM, Nkoghe D, Ollomo B, Nze-Nkogue C, Becquart P, Grard G, Pourrut X, Charrel R, Moureau G, Ndjoyi-Mbiguino A, De Lamballerie X. 2009. Concurrent Chikungunya and Dengue Virus Infections during Simultaneous Outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg Infect Dis.* 15(4):591–593. <https://doi.org/10.3201/eid1504.080664>
- Lésel J. 2016. Optimisation de la consommation énergétique d’une ligne de métro automatique prenant en compte les aléas de trafic à l’aide d’outils d’intelligence artificielle. [place unknown]: ParisTech Institut des Sciences et Technologies _ Arts et Métiers ParisTech.
- Letizia AG, Pratt CB, Wiley MR, Fox AT, Mosore M, Agbodzi B, Yeboah C, Kumordjie S, Di Paola N, Assana KC, et al. 2022. Retrospective Genomic Characterization of a 2017 Dengue Virus Outbreak, Burkina Faso. *Emerg Infect Dis.* 28(6):1198–1210. <https://doi.org/10.3201/eid2806.212491>
- Lewis J, Gallichotte EN, Randall J, Glass A, Foy BD, Ebel GD, Kading RC. 2023. Intrinsic factors driving mosquito vector competence and viral evolution: a review. *Front Cell Infect Microbiol* [Internet]. [accessed 2024 May 16] 13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2023.1330600>
- Li C, Gao Y, Zhao Z, Ma D, Zhou R, Wang J, Zhang Q, Liu Q. 2021. Potential geographical distribution of *Anopheles gambiae* worldwide under climate change. *J Biosaf Biosecurity.* 3(2):125–130. <https://doi.org/10.1016/j.jobb.2021.08.004>
- Li K, Phoo WW, Luo D. 2014. Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors. *Viol Sin.* 29(2):74–85. <https://doi.org/10.1007/s12250-014-3438-6>
- Li L, Lok S-M, Yu I-M, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG. 2008. The Flavivirus Precursor Membrane-Envelope Protein Complex: Structure and Maturation. *Science.* 319(5871):1830–1834. <https://doi.org/10.1126/science.1153263>
- Lindberg ALE. 2003. Bovine viral Diarrhoea virus infections and its control. A review. *Vet Q.* 25(1):1–16. <https://doi.org/10.1080/01652176.2003.9695140>
- Linenberg I, Christophides GK, Gendrin M. 2016. Larval diet affects mosquito development and permissiveness to Plasmodium infection. *Sci Rep.* 6(1):38230. <https://doi.org/10.1038/srep38230>
- Liu L, Dong H, Chen H, Zhang J, Ling H, Li Z, Shi P-Y, Li H. 2010. Flavivirus RNA cap methyltransferase: structure, function, and inhibition. *Front Biol.* 5(4):286–303. <https://doi.org/10.1007/s11515-010-0660-y>
- Liu Y, Liu J, Cheng G. 2016. Vaccines and immunization strategies for dengue prevention. *Emerg Microbes Infect.* 5(1):1–6. <https://doi.org/10.1038/emi.2016.74>
- Liu Z, Zhang Z, Lai Z, Zhou T, Jia Z, Gu J, Wu K, Chen X-G. 2017. Temperature Increase Enhances *Aedes albopictus* Competence to Transmit Dengue Virus. *Front Microbiol.* 8:2337. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02337>
- Lo Presti A, Ciccozzi M, Cella E, Lai A, Simonetti FR, Galli M, Zehender G, Rezza G. 2012. Origin, evolution, and phylogeography of recent epidemic CHIKV strains. *Infect Genet Evol.* 12(2):392–398. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2011.12.015>
- Lo Presti A, Lai A, Cella E, Zehender G, Ciccozzi M. 2014. Chikungunya virus, epidemiology, clinics and phylogenesis: A review. *Asian Pac J Trop Med.* 7(12):925–932. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60164-4](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60164-4)

- Lu P, Bian G, Pan X, Xi Z. 2012. *Wolbachia* Induces Density-Dependent Inhibition to Dengue Virus in Mosquito Cells. O'Neill SL, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(7):e1754. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001754>
- Lu P, Sun Q, Fu P, Li K, Liang X, Xi Z. 2020. *Wolbachia* Inhibits Binding of Dengue and Zika Viruses to Mosquito Cells. *Front Microbiol*. 11:1750. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01750>
- Luplertlop N, Surasombatpattana P, Patramool S, Dumas E, Wasinpiyamongkol L, Saune L, Hamel R, Bernard E, Sereno D, Thomas F, et al. 2011. Induction of a Peptide with Activity against a Broad Spectrum of Pathogens in the *Aedes aegypti* Salivary Gland, following Infection with Dengue Virus. Diamond MS, editor. *PLoS Pathog*. 7(1):e1001252. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001252>
- Ma L, Jones CT, Groesch TD, Kuhn RJ, Post CB. 2004. Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101(10):3414–3419. <https://doi.org/10.1073/pnas.0305892101>
- Macdonald G. 1956. Epidemiological basis of malaria control. *Bull World Health Organ*. 15(3–5):613–626.
- Mala AO, Irungu LW, Mitaki EK, Shililu JI, Njagi JK, Githure JI. 2014. Gonotrophic cycle duration, fecundity and parity of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes during an extended period of dry weather in a semi arid area in Baringo County, Kenya. 1(2):7.
- Malekifard F, Tavassoli M, Yakhchali M, Darvishzadeh R. 2014. Detection of *Theileria equi* and *Babesia caballi* using microscopic and molecular methods in horses in suburb of Urmia, Iran. *Vet Res Forum Int Q J*. 5(2):129–133.
- Manni M, Guglielmino CR, Scolari F, Vega-Rúa A, Failloux A-B, Somboon P, Lisa A, Savini G, Bonizzoni M, Gomulski LM, et al. 2017. Genetic evidence for a worldwide chaotic dispersion pattern of the arbovirus vector, *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(1):e0005332. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005332>
- Manning JE, Morens DM, Kamhawi S, Valenzuela JG, Memoli M. 2018. Mosquito Saliva: The Hope for a Universal Arbovirus Vaccine? *J Infect Dis*. 218(1):7–15. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiy179>
- Manoj RRS, Latrofa MS, Epis S, Otranto D. 2021. *Wolbachia*: endosymbiont of onchocercid nematodes and their vectors. *Parasit Vectors*. 14(1):245. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04742-1>
- Manokaran G, Flores HA, Dickson CT, Narayana VK, Kanojia K, Dayalan S, Tull D, McConville MJ, Mackenzie JM, Simmons CP. 2020. Modulation of acyl-carnitines, the broad mechanism behind *Wolbachia*-mediated inhibition of medically important flaviviruses in *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci*. 117(39):24475–24483. <https://doi.org/10.1073/pnas.1914814117>
- Maroli M, Pennisi MG, Di Muccio T, Khoury C, Gradoni L, Gramiccia M. 2007. Infection of sandflies by a cat naturally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol*. 145(3):357–360. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.11.009>
- Martin BD, Schwab E. 2012. Current Usage of Symbiosis and Associated Terminology. *Int J Biol*. 5(1):p32. <https://doi.org/10.5539/ijb.v5n1p32>
- Martins MM, Prata-Barbosa A, Cunha AJLA da. 2020. Arboviral diseases in pediatrics. *J Pediatr (Rio J)*. 96:2–11. <https://doi.org/10.1016/j.jped.2019.08.005>
- Martín-Vega D, Garbout A, Ahmed F, Wicklein M, Goater CP, Colwell DD, Hall MJR. 2018. 3D virtual histology at the host/parasite interface: visualisation of the master manipulator, *Dicrocoelium dendriticum*, in the brain of its ant host. *Sci Rep*. 8(1):8587. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26977-2>
- Masui S, Kuroiwa H, Sasaki T, Inui M, Kuroiwa T, Ishikawa H. 2001. Bacteriophage WO and Virus-like Particles in *Wolbachia*, an Endosymbiont of Arthropods. *Biochem Biophys Res Commun*. 283(5):1099–1104. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.4906>
- Maynard AJ, Ambrose L, Cooper RD, Chow WK, Davis JB, Muzari MO, Hurk AF van den, Hall-Mendelin S, Hasty JM, Burkot TR, et al. 2017. Tiger on the prowl: Invasion history and spatio-temporal genetic structure of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse 1894) in the Indo-Pacific. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(4):e0005546. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005546>
- McCarthy, Brent. 1943. An Account of an Outbreak of Dengue Fever in Dzaoudzi, Comoro Islands, January, 1943. [Internet]. [accessed 2022 Feb 8]. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19441000332>

McGraw EA, Merritt DJ, Droller JN, O'Neill SL. 2002. Wolbachia density and virulence attenuation after transfer into a novel host. *Proc Natl Acad Sci.* 99(5):2918–2923. <https://doi.org/10.1073/pnas.052466499>

McKenzie BA, Wilson AE, Zohdy S. 2019. *Aedes albopictus* is a competent vector of Zika virus: A meta-analysis. *PLOS ONE.* 14(5):e0216794. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216794>

McSherry JA. 1982. Some Medical Aspects of the Darien Scheme: Was it Dengue? *Scott Med J.* 27(2):183–184. <https://doi.org/10.1177/003693308202700215>

Meissner HE, Cook G, Neeley AD, Portacci K, Miller RS, Hallman C, Derda S. 2022. Chapter 3 Risk Analysis for Human-Mediated Movement of Pests and Pathogens. In: *Tactical Sci Biosecurity Anim Plant Syst.* [place unknown]: IGI Global; p. 54–75.

Meister S, Kanzok SM, Zheng X, Luna C, Li T-R, Hoa NT, Clayton JR, White KP, Kafatos FC, Christophides GK, Zheng L. 2005. Immune signaling pathways regulating bacterial and malaria parasite infection of the mosquito *Anopheles gambiae*. *Proc Natl Acad Sci.* 102(32):11420–11425. <https://doi.org/10.1073/pnas.0504950102>

Mercier A, Obadia T, Carraretto D, Velo E, Gabiane G, Bino S, Vazeille M, Gasperi G, Dauga C, Malacrida AR, et al. 2022. Impact of temperature on dengue and chikungunya transmission by the mosquito *Aedes albopictus*. *Sci Rep.* 12(1):6973. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-10977-4>

Merle H, Donnio A, Jean-Charles A, Guyomarch J, Hage R, Najjioullah F, Césaire R, Cabié A. 2018. Ocular manifestations of emerging arboviruses: Dengue fever, Chikungunya, Zika virus, West Nile virus, and yellow fever. *J Fr Ophtalmol.* 41(6):e235–e243. <https://doi.org/10.1016/j.jfo.2018.05.002>

Merritt R, Dadd R, Walker E. 1992. Feeding behavior, natural food, and nutritional relationships of larval mosquitoes. *Annu Rev Entomol.* 37:349–76. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.37.010192.002025>

Messina JP, Brady OJ, Golding N, Kraemer MUG, Wint GRW, Ray SE, Pigott DM, Shearer FM, Johnson K, Earl L, et al. 2019. The current and future global distribution and population at risk of dengue. *Nat Microbiol.* 4(9):1508–1515. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0476-8>

Messina JP, Brady OJ, Scott TW, Zou C, Pigott DM, Duda KA, Bhatt S, Katzelnick L, Howes RE, Battle KE, et al. 2014. Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol.* 22(3):138–146. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2013.12.011>

Metselaar D, Grainger CR, Oei KG, Reynolds DG, Pudney M, Leake CJ, Tukei PM, D'Offay RM, Simpson DIH. 1980. An outbreak of type 2 dengue fever in the Seychelles, probably transmitted by *Aedes albopictus* (Skuse). *Bull World Health Organ.* 58(6):937–943.

Michon B. 2016. Les « aires portuaires » françaises au XVIIIe siècle : approche comparative. *Nuevo Mundo Mundos Nuevos Nouv Mondes Mondes Nouv - Novo Mundo Mundos Novos - New World New Worlds* [Internet]. [accessed 2022 May 2]. <https://doi.org/10.4000/nuevomundo.69935>

Miller WJ, Ehrman L, Schneider D. 2010. Infectious Speciation Revisited: Impact of Symbiont-Depletion on Female Fitness and Mating Behavior of *Drosophila paulistorum*. *PLOS Pathog.* 6(12):e1001214. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001214>

Min K-T, Benzer S. 1997. Wolbachia, normally a symbiont of *Drosophila*, can be virulent, causing degeneration and early death. *Proc Natl Acad Sci.* 94(20):10792–10796. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.20.10792>

Minard G, TRAN F-H, tran-van van, Goubert C, Bellet C, Lambert G, Khanh HKL, Huynh T, Mavingui P, Valiente Moro C. 2015. French invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to Vietnamese autochthonous relatives. *Front Microbiol* [Internet]. [accessed 2022 Sep 3] 6. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2015.00970>

Minard G, Tran F-H, Van VT, Fournier C, Potier P, Roiz D, Mavingui P, Moro CV. 2018. Shared larval rearing environment, sex, female size and genetic diversity shape *Ae. albopictus* bacterial microbiota. *PLOS ONE.* 13(4):e0194521. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194521>

Minard G, Tran Van V, Tran FH, Melaun C, Klimpel S, Koch LK, Ly Huynh Kim K, Huynh Thi Thuy T, Tran Ngoc H, Potier P, et al. 2017. Identification of sympatric cryptic species of *Aedes albopictus* subgroup in Vietnam: new perspectives in phyllosymbiosis of insect vector. *Parasit Vectors.* 10(1):276. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2202-9>

Ministère du travail, de la santé et des solidarités. 2023. Cartes de présence du moustique tigre (*Aedes albopictus*) en France métropolitaine. *Ministère Trav Santé Solidar* [Internet]. [accessed 2024

- Mar 27]. <https://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>
- Minwuyelet A, Petronio GP, Yewhalaw D, Sciarretta A, Magnifico I, Nicolosi D, Di Marco R, Atenafu G. 2023. Symbiotic *Wolbachia* in mosquitoes and its role in reducing the transmission of mosquito-borne diseases: updates and prospects. *Front Microbiol* [Internet]. [accessed 2024 Apr 29] 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1267832>
- Mitchell CJ. 1995. The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. *Parassitologia*. 37(2–3):109–113.
- Molloy J, Sinkins S. 2015. *Wolbachia* Do Not Induce Reactive Oxygen Species-Dependent Immune Pathway Activation in *Aedes albopictus*. *Viruses*. 7(8):4624–4639. <https://doi.org/10.3390/v7082836>
- Molloy JC, Sommer U, Viant MR, Sinkins SP. 2016. *Wolbachia* Modulates Lipid Metabolism in *Aedes albopictus* Mosquito Cells. Schloss PD, editor. *Appl Environ Microbiol*. 82(10):3109–3120. <https://doi.org/10.1128/AEM.00275-16>
- Moltini-Conclois I, Stalinski R, Tetreau G, Després L, Lambrechts L. 2018. Larval Exposure to the Bacterial Insecticide Bti Enhances Dengue Virus Susceptibility of Adult *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Insects*. 9(4):193. <https://doi.org/10.3390/insects9040193>
- Moncayo AC, Fernandez Z, Ortiz D, Diallo M, Sall A, Hartman S, Davis CT, Coffey L, Mathiot CC, Tesh RB, Weaver SC. 2004. Dengue Emergence and Adaptation to Peridomestic Mosquitoes. *Emerg Infect Dis*. 10(10):1790–1796. <https://doi.org/10.3201/eid1010.030846>
- Mondotte JA, Lozach P-Y, Amara A, Gamarnik AV. 2007. Essential Role of Dengue Virus Envelope Protein N Glycosylation at Asparagine-67 during Viral Propagation. *J Virol*. 81(13):7136–7148. <https://doi.org/10.1128/jvi.00116-07>
- Montell C, Zwiebel LJ. 2016. Mosquito Sensory Systems. In: *Adv Insect Physiol* [Internet]. Vol. 51. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2022 Sep 28]; p. 293–328. <https://doi.org/10.1016/bs.aiep.2016.04.007>
- Morazzani EM, Wiley MR, Murreddu MG, Adelman ZN, Myles KM. 2012. Production of Virus-Derived Ping-Pong-Dependent piRNA-like Small RNAs in the Mosquito Soma. *PLOS Pathog*. 8(1):e1002470. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002470>
- Mordecai EA, Cohen JM, Evans MV, Gudapati P, Johnson LR, Lippi CA, Miazgowiec K, Murdock CC, Rohr JR, Ryan SJ, et al. 2017. Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(4):e0005568. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005568>
- Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, et al. 2009. A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*. 139(7):1268–1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
- Mossa A-TH, Mohafrash SMM, Chandrasekaran N. 2018. Safety of Natural Insecticides: Toxic Effects on Experimental Animals. *BioMed Res Int*. 2018:e4308054. <https://doi.org/10.1155/2018/4308054>
- Mourya DT, Gokhale MD, Pidiyar V, Barde PV, Patole M, Mishra AC, Shouche Y. 2002. Study of the effect of the midgut bacterial flora of *Culex quinquefasciatus* on the susceptibility of mosquitoes to Japanese encephalitis virus. *Acta Virol*. 46(4):257–260.
- Mousson L, Dauga C, Garrigues T, Schaffner F, Vazeille M, Failloux A-B. 2005. Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet Res*. 86(1):1–11. <https://doi.org/10.1017/S0016672305007627>
- 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*. O’Neill SL, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(12):e1989. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001989>
- Moyes CL, Vontas J, Martins AJ, Ng LC, Koou SY, Dusfour I, Raghavendra K, Pinto J, Corbel V, David J-P, Weetman D. 2017. Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis*. 11(7):e0005625. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005625>
- Muller DA, Young PR. 2013. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res*. 98(2):192–208.

<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008>

Muñoz-Jordan JL, Sánchez-Burgos GG, Laurent-Rolle M, García-Sastre A. 2003. Inhibition of interferon signaling by dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(24):14333–14338. <https://doi.org/10.1073/pnas.2335168100>

Murugesan A, Manoharan M. 2020. Chapter 16 - Dengue Virus. In: Ennaji MM, editor. *Emerg Reemerging Viral Pathog* [Internet]. [place unknown]: Academic Press; [accessed 2024 Apr 16]; p. 281–359. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819400-3.00016-8>

Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau V-M. 2014. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect*. 20(10):O595–O596. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12707>

Muturi EJ, Alto BW. 2011. Larval Environmental Temperature and Insecticide Exposure Alter *Aedes aegypti* Competence for Arboviruses. *Vector-Borne Zoonotic Dis*. 11(8):1157–1163. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0209>

Nasar F, Erasmus JH, Haddow AD, Tesh RB, Weaver SC. 2015. Eilat virus induces both homologous and heterologous interference. *Virology*. 484:51–58. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.05.009>

Negm-Eldin MM, Davies RW. 1999. Simultaneous transmission of *Trypanosoma mukasai*, *Babesiosoma mariae* and *Cyrtia nili* to fish by the leech *Batracobdelloides tricarinata*. *DTW Dtsch Tierarztl Wochenschr*. 106(12):526–527.

Neto Z, Martinez PA, Hill SC, Jandondo D, Thézé J, Mirandela M, Aguiar RS, Xavier J, Sebastião C dos S, Cândido ALM, et al. 2022. Molecular and genomic investigation of an urban outbreak of dengue virus serotype 2 in Angola, 2017–2019. *PLoS Negl Trop Dis*. 16(5):e0010255. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010255>

Nguyen NM, Thi Hue Kien D, Tuan TV, Quyen NTH, Tran CNB, Vo Thi L, Thi DL, Nguyen HL, Farrar JJ, Holmes EC, et al. 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. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303395110>

Norazharuddin H, Lai NS. 2018. Roles and Prospects of Dengue Virus Non-structural Proteins as Antiviral Targets: An Easy Digest. *Malays J Med Sci MJMS*. 25(5):6–15. <https://doi.org/10.21315/mjms2018.25.5.2>

Obadia T, Gutierrez-Bugallo G, Duong V, Nuñez AI, Fernandes RS, Kamgang B, Hery L, Gomard Y, Abbo SR, Jiolle D, et al. 2022. Zika vector competence data reveals risks of outbreaks: the contribution of the European ZIKAlliance project. *Nat Commun*. 13(1):4490. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-32234-y>

O'Connor O, Calvez E, Inizan C, Pocquet N, Richard V, Dupont-Rouzeyrol M. 2020. Vector competence of *Aedes aegypti* from New Caledonia for the four recent circulating dengue virus serotypes. *PLoS Negl Trop Dis*. 14(5):e0008303. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008303>

Ogden NH, Wilson JR, Richardson DM, Hui C, Davies SJ, Kumschick S, Le Roux JJ, Measey J, Saul W-C, Pulliam JRC. 2019. Emerging infectious diseases and biological invasions: a call for a One Health collaboration in science and management. *R Soc Open Sci*. 6(3):181577. <https://doi.org/10.1098/rsos.181577>

Ogunlade ST, Adekunle AI, Meehan MT, McBryde ES. 2023. Quantifying the impact of *Wolbachia* releases on dengue infection in Townsville, Australia. *Sci Rep*. 13(1):14932. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-42336-2>

OhAinle M, Balmaseda A, Macalalad AR, Tellez Y, Zody MC, Saborío S, Nuñez A, Lennon NJ, Birren BW, Gordon A, et al. 2011. Dynamics of dengue disease severity determined by the interplay between viral genetics and serotype-specific immunity. *Sci Transl Med*. 3(114):114ra128. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3003084>

Öhlund P, Lundén H, Blomström A-L. 2019. Insect-specific virus evolution and potential effects on vector competence. *Virus Genes*. 55(2):127–137. <https://doi.org/10.1007/s11262-018-01629-9>

Okech BA, Gouagna LC, Yan G, Githure JI, Beier JC. 2007. Larval habitats of *Anopheles gambiae* s.s. (Diptera: Culicidae) influences vector competence to *Plasmodium falciparum* parasites. *Malar J*. 6(1):50. <https://doi.org/10.1186/1475-2875-6-50>

Olivier CY, Séguin-Swartz G, Galka B, Olfert OO. 2011. Aster Yellows in Leafhoppers and Field Crops in Saskatchewan, Canada, 2001–2008. *Am J Plant Sci Biotechnol*. 5(2).

Olson KE, Blair CD. 2015. Arbovirus–mosquito interactions: RNAi pathway. *Curr Opin Virol*.

15:119–126. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.10.001>

O'Neill SL, Ryan PA, Turley AP, Wilson G, Retzki K, Iturbe-Ormaetxe I, Dong Y, Kenny N, Paton CJ, Ritchie SA, et al. 2019. Scaled deployment of *Wolbachia* to protect the community from dengue and other *Aedes* transmitted arboviruses. *Gates Open Res.* 2:36. <https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12844.3>

Ooi E-E, Goh K-T, Gubler DJ. 2006. Dengue Prevention and 35 Years of Vector Control in Singapore. *Emerg Infect Dis.* 12(6):887–893. <https://doi.org/10.3201/10.3201/eid1206.051210>

Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM. 2012. Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol Ecol.* 21(20):5138–5150. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2012.05759.x>

Osorio JE, Brewoo JN, Silengo SJ, Arguello J, Moldovan IR, Tary-Lehmann M, Powell TD, Livengood JA, Kinney RM, Huang CY-H, Stinchcomb DT. 2011. Efficacy of a tetravalent chimeric dengue vaccine (DENVax) in *Cynomolgus* macaques. *Am J Trop Med Hyg.* 84(6):978–987. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0592>

Osorio JE, Partidos CD, Wallace D, Stinchcomb DT. 2015. Development of a recombinant, chimeric tetravalent dengue vaccine candidate. *Vaccine.* 33(50):7112–7120. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2015.11.022>

Otranto D, Dantas-Torres F, Mallia E, DiGeronimo PM, Brianti E, Testini G, Traversa D, Lia RP. 2009. *Thelazia callipaeda* (Spirurida, Thelaziidae) in wild animals: Report of new host species and ecological implications. *Vet Parasitol.* 166(3):262–267. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2009.08.027>

Otranto D, Traversa D. 2003. Dicrocoeliosis of ruminants: a little known fluke disease. *Trends Parasitol.* 19(1):12–15. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(02\)00009-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(02)00009-0)

Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, 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.* 109(1):E23–E31. <https://doi.org/10.1073/pnas.1116932108>

Pannebakker BA, Pijnacker LP, Zwaan BJ, Beukeboom LW. 2004. Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae). *Genome.* 47(2):299–303. <https://doi.org/10.1139/g03-137>

Parola P, de Lamballerie X, Jourdan J, Roveery C, Vaillant V, Minodier P, Brouqui P, Flahault A, Raoult D, Charrel RN. 2006. Novel Chikungunya Virus Variant in Travelers Returning from Indian Ocean Islands. *Emerg Infect Dis.* 12(10):1493–1499. <https://doi.org/10.3201/eid1210.060610>

Pascalis H, Biscornet L, Toty C, Hafsia S, Roche M, Desprès P, Nten CA, Bibi J, Louange M, Gedeon J, Mavingui P. 2020. Complete Genome Sequences of Dengue Virus Type 2 Epidemic Strains from Reunion Island and the Seychelles. *Microbiol Resour Announc* [Internet]. [accessed 2022 Jan 28]. <https://doi.org/10.1128/MRA.01443-19>

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. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>

Paupy C, Girod R, Salvan M, Rodhain F, Failloux A-B. 2001. Population structure of *Aedes albopictus* from La Reunion Island (Indian Ocean) with respect to susceptibility to a dengue virus. *Heredity.* 87:273–283.

Pereira-dos-Santos T, Roiz D, Lourenço-de-Oliveira R, Paupy C. 2020. A Systematic Review: Is *Aedes albopictus* an Efficient Bridge Vector for Zoonotic Arboviruses? *Pathogens.* 9(4):266. <https://doi.org/10.3390/pathogens9040266>

Perera R, Riley C, Isaac G, Hopf-Jannasch AS, Moore RJ, Weitz KW, Pasa-Tolic L, Metz TO, Adamec J, Kuhn RJ. 2012. Dengue Virus Infection Perturbs Lipid Homeostasis in Infected Mosquito Cells. Heise MT, editor. *PLoS Pathog.* 8(3):e1002584. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002584>

Perlmutter JI, Bordenstein Sarah R., Unckless RL, LePage DP, Metcalf JA, Hill T, Martinez J, Jiggins FM, Bordenstein Seth R. 2019. The phage gene *wmk* is a candidate for male killing by a bacterial endosymbiont. Schneider DS, editor. *PLOS Pathog.* 15(9):e1007936. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007936>

Perlmutter JI, Meyers JE, Bordenstein SR. 2020. Transgenic Testing Does Not Support a Role for Additional Candidate Genes in *Wolbachia* Male Killing or Cytoplasmic Incompatibility. *mSystems.* 5(1):e00658-19. <https://doi.org/10.1128/mSystems.00658-19>

Pialoux G, Gaüzère B-A, Strobel M. 2006. Infection à virus Chikungunya : revue générale par temps d'épidémie. *Médecine Mal Infect.* 36(5):253–263. <https://doi.org/10.1016/j.medmal.2006.04.002>

Pierre V, Thiria J, Rachou E, Sissoko D, Lassale C, Renault P. 2005. Epidémie de dengue 1 à la Réunion en 2004 [Internet]. https://web.archive.org/web/20180514020730id_/http://invs.santepubliquefrance.fr/publications/2005/jvs_2005/poster_13.pdf

Pietri JE, DeBruhl H, Sullivan W. 2016. The rich somatic life of *Wolbachia*. *MicrobiologyOpen.* 5(6):923–936. <https://doi.org/10.1002/mbo3.390>

Pingen M, Bryden SR, Pondeville E, Schnettler E, Kohl A, Merits A, Fazakerley JK, Graham GJ, McKimmie CS. 2016. Host Inflammatory Response to Mosquito Bites Enhances the Severity of Arbovirus Infection. *Immunity.* 44(6):1455–1469. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.06.002>

Płaszczycza A, Scaturro P, Neufeldt CJ, Cortese M, Cerikan B, Ferla S, Brancale A, Pichlmair A, Bartenschlager R. 2019. A novel interaction between dengue virus nonstructural protein 1 and the NS4A-2K-4B precursor is required for viral RNA replication but not for formation of the membranous replication organelle. *PLOS Pathog.* 15(5):e1007736. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1007736>

Poinsot D, Charlat S, Merçot H. 2003. On the mechanism of *Wolbachia* -induced cytoplasmic incompatibility: Confronting the models with the facts. *BioEssays.* 25(3):259–265. <https://doi.org/10.1002/bies.10234>

Poole-Smith BK, Hemme RR, Delorey M, Felix G, Gonzalez AL, Amador M, Hunsperger EA, Barrera R. 2015. Comparison of Vector Competence of *Aedes mediovittatus* and *Aedes aegypti* for Dengue Virus: Implications for Dengue Control in the Caribbean. *PLoS Negl Trop Dis.* 9(2):e0003462. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003462>

Powell JR. 2018. Mosquito-Borne Human Viral Diseases: Why *Aedes aegypti*? *Am J Trop Med Hyg.* 98(6):1563–1565. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0866>

Powers AM, Brault AC, Tesh RB, Weaver SC. 2000. Re-emergence of chikungunya and o'nyong-nyong viruses: evidence for distinct geographical lineages and distant evolutionary relationships. *Microbiology.* 81(2):471–479. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-81-2-471>

Powers AM, Logue CHY 2007. 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol.* 88(9):2363–2377. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82858-0>

Puerta-Guardo H, Glasner DR, Harris E. 2016. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLOS Pathog.* 12(7):e1005738. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005738>

Putz FE, Holbrook NM. 1986. NOTES ON THE NATURAL HISTORY OF HEMIEPIPHYTES. *Selbyana.* 9(1):61–69.

Quintero-Gil DC, Uribe-Yepes A, Ospina M, Díaz FJ, Martínez-Gutierrez M. 2018. Differences in the replicative capacities of clinical isolates of dengue virus in C6/36 cells and in urban populations of *Aedes aegypti* from Colombia, South America. *Braz J Infect Dis.* 22(4):257–272. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.07.010>

Qureshi MH. 2020. Economic and political aspects of Dengue virus disease. In: *Dengue Virus Dis* [Internet]. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2020 Sep 11]; p. 151–158. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818270-3.00009-6>

Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, Dimopoulos G. 2012. Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. O'Neill SL, editor. *PLoS Negl Trop Dis.* 6(3):e1561. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001561>

Rancès E, Ye YH, Woolfit M, McGraw EA, O'Neill SL. 2012. The Relative Importance of Innate Immune Priming in *Wolbachia*-Mediated Dengue Interference. Schneider DS, editor. *PLoS Pathog.* 8(2):e1002548. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002548>

Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK. 2009. Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.* 9(1):96. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-96>

Raquin V. 2012. Innate Immunity and Multi-infections in the Mosquito (Diptera:Culicidae): Functional Study of the Interactions *Wolbachia*-arbovirus–*Aedes albopictus*. France: University of Lyon.

Raquin V, Valiente Moro C, Saucereau Y, Tran F-H, Potier P, Mavingui P. 2015. Native Wolbachia from *Aedes albopictus* Blocks Chikungunya Virus Infection In Cellulo. Bourtzis K, editor. PLOS ONE. 10(4):e0125066. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125066>

Redoni M, Yacoub S, Rivino L, Giacobbe DR, Luzzati R, Di Bella S. 2020. Dengue: Status of current and under-development vaccines. Rev Med Virol. 30(4):e2101. <https://doi.org/10.1002/rmv.2101>

Reed W, CARROLL JAS, Agramonte A. 1901. THE ETIOLOGY OF YELLOW FEVER.: AN ADDITIONAL NOTE. J Am Med Assoc. XXXVI(7):431–440. <https://doi.org/10.1001/jama.1901.52470070017001f>

Reich NG, Shrestha S, King AA, Rohani P, Lessler J, Kalayanarooj S, Yoon I-K, Gibbons RV, Burke DS, Cummings DAT. 2013. Interactions between serotypes of dengue highlight epidemiological impact of cross-immunity. J R Soc Interface. 10(86):20130414. <https://doi.org/10.1098/rsif.2013.0414>

Reiter P. 2007. Oviposition, Dispersal, and Survival in *Aedes aegypti*: Implications for the Efficacy of Control Strategies. Vector-Borne Zoonotic Dis. 7(2):261–273. <https://doi.org/10.1089/vbz.2006.0630>

Reiter P, Sprenger D. 1987. THE USED TIRE TRADE: A MECHANISM FOR THE WORLDWIDE DISPERSAL OF CONTAINER BREEDING MOSQUITOES.

Reveillaud J, Bordenstein Sarah R., Cruaud C, Shaiber A, Esen ÖC, Weill M, Makoundou P, Lolans K, Watson AR, Rakotoarivony I, et al. 2019. Author Correction: The Wolbachia mobilome in *Culex pipiens* includes a putative plasmid. Nat Commun. 10(1):3153. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11234-5>

Rezza G. 2012. *Aedes albopictus* and the reemergence of Dengue. BMC Public Health. 12(1):72. <https://doi.org/10.1186/1471-2458-12-72>

Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli A, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, et al. 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. The Lancet. 370(9602):1840–1846. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6)

Ribeiro JM, Arcà B, Lombardo F, Calvo E, Van My Phan, Chandra PK, Wikel SK. 2007. An annotated catalogue of salivary gland transcripts in the adult female mosquito, *Aedes aegypti**. BMC Genomics. 8(1):6. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-6>

Ribeiro JMC. 1987. Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods. Annu Rev Entomol. 32(1):463–478. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.32.010187.002335>

Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau V-M. 2016. Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. PLoS Negl Trop Dis. 10(9):e0005024. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005024>

Richards SL, Anderson SL, Alto BW. 2012. Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) for Dengue Virus in the Florida Keys. J Med Entomol. 49(4):942–946. <https://doi.org/10.1603/ME11293>

Rigaud T, Juchault P. 1995. Success and Failure of Horizontal Transfers of Feminizing Wolbachia Endosymbionts in Woodlice. J Evol Biol. 8:249–255. <https://doi.org/10.1046/j.1420-9101.1995.8020249.x>

Rigaud T, Souty-Grosset C, Raimond R, Mocquard J-P, Juchault P. 1991. Feminizing endocytobiosis in the terrestrial crustacean *Armadillidium vulgare* Latr. (Isopoda): Recent acquisitions. Endocytobiosis Cell Res. 7:259–273.

Rodriguez-Roche R, Alvarez M, Gritsun T, Halstead S, Kouri G, Gould EA, Guzman MG. 2005. Virus evolution during a severe dengue epidemic in Cuba, 1997. Virology. 334(2):154–159. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2005.01.037>

Rodriguez-Roche R, Blanc H, Bordería AV, Díaz G, Henningsson R, Gonzalez D, Santana E, Alvarez M, Castro O, Fontes M, et al. 2016. Increasing Clinical Severity during a Dengue Virus Type 3 Cuban Epidemic: Deep Sequencing of Evolving Viral Populations. J Virol. 90(9):4320–4333. <https://doi.org/10.1128/JVI.02647-15>

Rodriguez-Roche R, Sanchez L, Burgher Y, Rosario D, Alvarez M, Kouri G, Halstead SB, Gould EA, Guzman MG. 2011. Virus Role During Intraepidemic Increase in Dengue Disease Severity. Vector-Borne Zoonotic Dis. 11(6). <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0177>

Romo H, Kenney JL, Blitvich BJ, Brault AC. 2018. Restriction of Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti* mediated by an insect-specific flavivirus. Emerg Microbes Infect. 7(1):1–13. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0180-4>

Ross PA, Endersby-Harshman NM, Hoffmann AA. 2019. A comprehensive assessment of inbreeding and laboratory adaptation in *Aedes aegypti* mosquitoes. Evol Appl. 12(3):572–586.

<https://doi.org/10.1111/eva.12740>

Ross RW. 1956. The Newala epidemic: III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. *Epidemiol Infect.* 54(2):177–191. <https://doi.org/10.1017/S0022172400044442>

Ruche GL, Souarès Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, Desprès P, Lenglet A, Jourdain F, Leparac-Goffart I, Charlet F, et al. 2010. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Eurosurveillance.* 15(39):19676. <https://doi.org/10.2807/ese.15.39.19676-en>

Ruiz-L A, Madrid-V J. 1992. Studies on the biology of the parasitic isopod *Cymothoa exigua* Schioedte and Meinert, 1884 and its relationship with the snapper *Lutjanus peru* (Pisces: Lutjanidae) Nichols and Murphy, 1922, from commercial catch in Michoacan. *Cienc Mar.* 18(1):19–34. <https://doi.org/10.7773/cm.v18i1.885>

Sabin AB. 1952. Research on Dengue during World War II. *Am J Trop Med Hyg.* 1(1):30–50.

Sabin AB, Schlesinger RW. 1945. Production of Immunity to Dengue with Virus Modified by Propagation in Mice. *Science.* 101(2634):640–642. <https://doi.org/10.1126/science.101.2634.640>

Saeed O, Asif A. 2020. Dengue virus disease; the origins. In: *Dengue Virus Dis* [Internet]. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2020 Sep 11]; p. 9–16. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-818270-3.00002-3>

Salazar MI, Richardson JH, Sánchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ. 2007. Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol.* 7:9. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-7-9>

Salvan M, Mouchet J. 1994. *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti* à l'île de La Réunion. *Ann Soc Belg Med Trop.* 74:323–326.

Sanaei E, Charlat S, Engelstädter J. 2021. *Wolbachia* host shifts: routes, mechanisms, constraints and evolutionary consequences. *Biol Rev.* 96(2):433–453. <https://doi.org/10.1111/brv.12663>

Sánchez-Vargas I, Olson KE, Black WC. 2021. The Genetic Basis for Salivary Gland Barriers to Arboviral Transmission. *Insects.* 12(1):73. <https://doi.org/10.3390/insects12010073>

Sánchez-Vargas I, Scott JC, Poole-Smith BK, Franz AWE, Barbosa-Solomieu V, Wilusz J, Olson KE, Blair CD. 2009. Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog.* 5(2):e1000299. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000299>

Sanders HR, Foy BD, Evans AM, Ross LS, Beaty BJ, Olson KE, Gill SS. 2005. Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol.* 35(11):1293–1307. <https://doi.org/10.1016/j.ibmb.2005.07.006>

Sandron F. 2007. Dynamique de la population réunionnaise (1663-2030). In: *Popul Réun Anal Démographique* [Internet]. Marseille: IRD Éditions; [accessed 2024 Apr 8]; p. 27–41. <https://doi.org/10.4000/books.irdeditions.123>

Sang RC, Ahmed O, Faye O, Kelly CLH, Yahaya AA, Mmadi I, Toilibou A, Sergon K, Brown J, Agata N, et al. 2008. Entomologic Investigations of a Chikungunya Virus Epidemic in the Union of the Comoros, 2005. *Am J Trop Med Hyg.* 78(1):77–82. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2008.78.77>

Santé Publique France. 2021. Syndromes dengue-like à Mayotte : Etiologies, détection, alerte et surveillance épidémiologique. Cellule Mayotte de Santé publique France.

Santé Publique France. 2024a. Points Épidémiologiques - Dengue - Océan Indien [Internet]. [accessed 2021 Sep 8]. <https://www.santepubliquefrance.fr/recherche/#search=dengue&themes=dengue®ions=Oc%C3%A9an%20Indien>

Santé Publique France. 2024b. Chikungunya, dengue et zika - Données de la surveillance renforcée en France métropolitaine en 2023 [Internet]. [place unknown]. <https://www.santepubliquefrance.fr/maladies-et-traumatismes/maladies-a-transmission-vectorielle/chikungunya/articles/donnees-en-france-metropolitaine/chikungunya-dengue-et-zika-donnees-de-la-surveillance-renforcee-en-france-metropolitaine-en-2023>

Saraiva RG, Fang J, Kang S, Angleró-Rodríguez YI, Dong Y, Dimopoulos G. 2018. Aminopeptidase secreted by *Chromobacterium* sp. Panama inhibits dengue virus infection by degrading the E protein. *PLoS Negl Trop Dis.* 12(4):e0006443. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006443>

Sasaki T, Moi ML, Saito K, Isawa H, Takasaki T, Sawabe K. 2022. *Aedes albopictus* Strain and Dengue

Virus Serotype in the Dengue Fever Outbreaks in Japan: Implications of Wolbachia Infection. *Jpn J Infect Dis.* 75(2):140–143. <https://doi.org/10.7883/yoken.JJID.2021.376>

Sato Y, Tagawa J, Hidaka T. 1986. Effects of the gregarious parasitoids, *Apanteles ruficrus* and *A. Kariyai*, on host growth and development. *J Insect Physiol.* 32(4):281–286. [https://doi.org/10.1016/0022-1910\(86\)90040-5](https://doi.org/10.1016/0022-1910(86)90040-5)

Saucereau Y, Valiente Moro C, Dieryckx C, Dupuy J-W, Tran F-H, Girard V, Potier P, Mavingui P. 2017. Comprehensive proteome profiling in *Aedes albopictus* to decipher Wolbachia-arbovirus interference phenomenon. *BMC Genomics.* 18(1):635. <https://doi.org/10.1186/s12864-017-3985-y>

Scaturro P, Cortese M, Chatel-Chaix L, Fischl W, Bartenschlager R. 2015. Dengue Virus Non-structural Protein 1 Modulates Infectious Particle Production via Interaction with the Structural Proteins. *PLOS Pathog.* 11(11):e1005277. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005277>

Schaeffer E, Flacher V, Papageorgiou V, Decossas M, Fauny J-D, Krämer M, Mueller CG. 2015. Dermal CD14+ Dendritic Cell and Macrophage Infection by Dengue Virus Is Stimulated by Interleukin-4. *J Invest Dermatol.* 135(7):1743–1751. <https://doi.org/10.1038/jid.2014.525>

Schmid MA, Glasner DR, Shah S, Michlmayr D, Kramer LD, Harris E. 2016. Mosquito Saliva Increases Endothelial Permeability in the Skin, Immune Cell Migration, and Dengue Pathogenesis during Antibody-Dependent Enhancement. *PLOS Pathog.* 12(6):e1005676. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005676>

Schnettler E, Donald CL, Human S, Watson M, Siu RWC, McFarlane M, Fazakerley JK, Kohl A, 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. <https://doi.org/10.1099/vir.0.053850-0>

Scholte E-J, Schaffner F. 2007. 14. Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. In: Vol. 1. [place unknown]; p. 241–260. https://doi.org/10.3920/9789086866267_016

Schuffenecker I, Iteaman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney M-C, Lavenir R, Pardigon N, Reynes J-M, Pettinelli F, et al. 2006. Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLoS Med.* 3(7):e263. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>

Schultz MJ, Frydman HM, Connor JH. 2018. Dual Insect specific virus infection limits Arbovirus replication in *Aedes* mosquito cells. *Virology.* 518:406–413. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.022>

Schultz MJ, Isern S, Michael SF, Corley RB, Connor JH, Frydman HM. 2017. Variable Inhibition of Zika Virus Replication by Different Wolbachia Strains in Mosquito Cell Cultures. *J Virol.* 91(14):10.1128/jvi.00339-17. <https://doi.org/10.1128/jvi.00339-17>

Schulze-Hagen K, Stokke BG, Birkhead TR. 2009. Reproductive biology of the European Cuckoo *Cuculus canorus*: early insights, persistent errors and the acquisition of knowledge. *J Ornithol.* 150(1):1–16. <https://doi.org/10.1007/s10336-008-0340-8>

Schwartz A, Koella JC. 2001. Trade-offs, conflicts of interest and manipulation in Plasmodium–mosquito interactions. *Trends Parasitol.* 17(4):189–194. [https://doi.org/10.1016/S1471-4922\(00\)01945-0](https://doi.org/10.1016/S1471-4922(00)01945-0)

Scolari F, Casiraghi M, Bonizzoni M. 2019. *Aedes* spp. and Their Microbiota: A Review. *Front Microbiol* [Internet]. [accessed 2023 Dec 14] 10. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.02036>

Scott TW, Takken W. 2012. Feeding strategies of anthropophilic mosquitoes result in increased risk of pathogen transmission. *Trends Parasitol.* 28(3):114–121. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.01.001>

Seabourn P, Spafford H, Yoneishi N, Medeiros M. 2020. The *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) microbiome varies spatially and with Ascogregarine infection. *PLoS Negl Trop Dis.* 14(8):e0008615. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008615>

Sekhwal MK, Li P, Lam I, Wang X, Cloutier S, You FM. 2015. Disease Resistance Gene Analogs (RGAs) in Plants. *Int J Mol Sci.* 16(8):19248–19290. <https://doi.org/10.3390/ijms160819248>

Selck FW, Adalja AA, Boddie CR. 2014. An Estimate of the Global Health Care and Lost Productivity Costs of Dengue. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 14(11):824–826. <https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1528>

Sergon K, Yahaya AA, Brown J, Bedja SA, Mlindasse M, Agata N, Allaranger Y, Ball MD, Powers AM, Ofula V, et al. 2007. SEROPREVALENCE OF CHIKUNGUNYA VIRUS INFECTION ON GRANDE COMORE ISLAND, UNION OF THE COMOROS, 2005. *Am J Trop Med Hyg.* 76(6):1189–1193.

<https://doi.org/10.4269/ajtmh.2007.76.1189>

Service MW. 1970. Ecological notes on species A and B of the *Anopheles gambiae* complex in the Kisumu area of Kenya. Bull Entomol Res. 60(1):105–108. <https://doi.org/10.1017/S0007485300034192>

Service MW. 1993. Mosquitoes (Culicidae). In: Lane RP, Crosskey RW, editors. Med Insects Arachn [Internet]. Dordrecht: Springer Netherlands; [accessed 2022 Sep 28]; p. 120–240. https://doi.org/10.1007/978-94-011-1554-4_5

Sessions OM, Barrows NJ, Souza-Neto JA, Robinson TJ, Hershey CL, Rodgers MA, Ramirez JL, Dimopoulos G, Yang PL, Pearson JL, Garcia-Blanco MA. 2009. Discovery of insect and human dengue virus host factors. Nature. 458(7241):1047–1050. <https://doi.org/10.1038/nature07967>

Sharma A, Lal SK. 2017. Zika Virus: Transmission, Detection, Control, and Prevention. Front Microbiol [Internet]. [accessed 2024 Apr 30] 8. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00110>

Sharma VP. 2014. Water, Mosquitoes and Malaria. In: Singh PP, Sharma V, editors. Water Health [Internet]. New Delhi: Springer India; [accessed 2024 Jan 30]; p. 155–168. https://doi.org/10.1007/978-81-322-1029-0_10

Shen X, Song S, Li C, Zhang J. 2022. Synonymous mutations in representative yeast genes are mostly strongly non-neutral. Nature. 606(7915):725–731. <https://doi.org/10.1038/s41586-022-04823-w>

Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Stanaway JD. 2016. The global economic burden of dengue: a systematic analysis. Lancet Infect Dis. 16(8):935–941. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00146-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00146-8)

Sherpa S, Rioux D, Pougnet-Lagarde C, Després L. 2018. Genetic diversity and distribution differ between long-established and recently introduced populations in the invasive mosquito *Aedes albopictus*. Infect Genet Evol. 58:145–156. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2017.12.018>

Shin SW, Kokoza V, Bian G, Cheon H-M, Kim YJ, Raikhel AS. 2005. REL1, a Homologue of *Drosophila* Dorsal, Regulates Toll Antifungal Immune Pathway in the Female Mosquito *Aedes aegypti**. J Biol Chem. 280(16):16499–16507. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500711200>

Shropshire JD, On J, Layton EM, Zhou H, Bordenstein SR. 2018. One prophage WO gene rescues cytoplasmic incompatibility in *Drosophila melanogaster*. Proc Natl Acad Sci. 115(19):4987–4991. <https://doi.org/10.1073/pnas.1800650115>

Sicard M, Bonneau M, Weill M. 2019. Wolbachia prevalence, diversity, and ability to induce cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. Curr Opin Insect Sci. 34:12–20. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2019.02.005>

Sicard M, Dittmer J, Grève P, Bouchon D, Braquart-Varnier C. 2014. A host as an ecosystem: Wolbachia coping with environmental constraints. Environ Microbiol. 16(12):3583–3607. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.12573>

Siler JF, Hall MW, Hitchens AP. 1926. Dengue: Its History, Epidemiology, Mechanism of Transmission, Etiology, Clinical Manifestations, Immunity, and Prevention. Philipp J Sci [Internet]. [accessed 2020 Jun 25] 29(1–2). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19261000360>

Sim C, Hong YS, Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, Higgs S, Collins FH. 2007. *Anopheles gambiae* heat shock protein cognate 70B impedes o'nyong-nyong virus replication. BMC Genomics. 8:231. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-8-231>

Simmons JS, St. John JH, Reynolds FHK. 1931. Experimental Studies of Dengue. Philipp J Sci [Internet]. [accessed 2020 Jun 25] 44(1–2). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19312901387>

Singh RK, Dhama K, Malik YS, Ramakrishnan MA, Karthik K, Tiwari R, Saurabh S, Sachan S, Joshi SK. 2016. Zika virus – emergence, evolution, pathology, diagnosis, and control: current global scenario and future perspectives – a comprehensive review. Vet Q. 36(3):150–175. <https://doi.org/10.1080/01652176.2016.1188333>

Sinka ME, Bangs MJ, Manguin S, Rubio-Palis Y, Chareonviriyaphap T, Coetzee M, Mbogo CM, Hemingway J, Patil AP, Temperley WH, et al. 2012. A global map of dominant malaria vectors. Parasit Vectors. 5(1):69. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-69>

Sinkins SP, Braig HR, O'Neill SL. 1995. Wolbachia superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. Proc R Soc Lond B Biol Sci [Internet]. [accessed 2022 Oct 11]. <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0154>

Sissoko D, Delmas G, Giry C, Petinelli F, Saidali R, Gabriele P, Abaine A, Paquet C, Pierre V. 2007.

Épidémie massive de fièvre chikungunya à Mayotte, France en 2005-2006 : description à partir des résultats de deux enquêtes épidémiologiques. *Bull Epidémiologique Hebd* 2007 N° 48-49.:405–407.

Smartt CT, Stenn TMS, Chen T-Y, Teixeira MG, Queiroz EP, Souza Dos Santos L, Queiroz GAN, Ribeiro Souza K, Kalabric Silva L, Shin D, Tabachnick WJ. 2017. Evidence of Zika Virus RNA Fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Field-Collected Eggs From Camaçari, Bahia, Brazil. *J Med Entomol.* 54(4):1085–1087. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx058>

Smith CEG. 1956. The History of Dengue in Tropical Asia and its Probable Relationship to the Mosquito *Aedes aegypti*. *J Trop Med Hyg.* 59(10):243–51.

Smith DR, Sprague TR, Hollidge BS, Valdez SM, Padilla SL, Bellanca SA, Golden JW, Coyne SR, Kulesh DA, Miller LJ, et al. 2018. African and Asian Zika Virus Isolates Display Phenotypic Differences Both In Vitro and In Vivo. *Am J Trop Med Hyg.* 98(2):432–444. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0685>

Snijders EP, Schuffner W, Dinger JE. 1931. On the Transmission of Dengue in Sumatra. *Am J Trop Med.* 11(3):171–197.

Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. 2019. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect Genet Evol.* 67:191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009>

Stanaway JD, Shepard DS, Undurraga EA, Halasa YA, Coffeng LE, Brady OJ, Hay SI, Bedi N, Bensenor IM, Castañeda-Orjuela CA, et al. 2016. The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis.* 16(6):712–723. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(16\)00026-8](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(16)00026-8)

Steel A, Gubler DJ, Bennett SN. 2010. Natural attenuation of Dengue Virus Type-2 after a series of island outbreaks: a re-trospective phylogenetic study of events in the South Pacific three decades ago. *Virology.* 405(2):505–512. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2010.05.033>

Stiasny K, Fritz R, Pangerl K, Heinz FX. 2011. Molecular mechanisms of flavivirus membrane fusion. *Amino Acids.* 41(5):1159–1163. <https://doi.org/10.1007/s00726-009-0370-4>

Stica CJ, Barrero RA, Murray RZ, Devine GJ, Phillips MJ, Frentiu FD. 2022. Global Evolutionary History and Dynamics of Dengue Viruses Inferred from Whole Genome Sequences. *Viruses.* 14(4):703. <https://doi.org/10.3390/v14040703>

Stouthamer R, Breeuwer J a. J, Hurst GDD. 1999. *Wolbachia Pipientis*: Microbial Manipulator of Arthropod Reproduction. *Annu Rev Microbiol.* 53(Volume 53, 1999):71–102. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.71>

Stouthamer R, Kazmer DJ. 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity.* 73(3):317–327. <https://doi.org/10.1038/hdy.1994.139>

Stouthamer R, Luck RF. 1993. Influence of microbe-associated parthenogenesis on the fecundity of *Trichogramma deion* and *T. pretiosum*. *Entomol Exp Appl.* 67(2):183–192. <https://doi.org/10.1111/j.1570-7458.1993.tb01667.x>

Stouthamer R, Luck RF, Hamilton WD. 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc Natl Acad Sci.* 87(7):2424–2427. <https://doi.org/10.1073/pnas.87.7.2424>

Succo T, Leparac-Goffart I, Ferré J-B, Roiz D, Broche B, Maquart M, Noel H, Catelinois O, Entezam F, Caire D, et al. 2016. Autochthonous dengue outbreak in Nîmes, South of France, July to September 2015. *Euro Surveill* [Internet]. [accessed 2021 Sep 14] 21(21). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.21.30240>

Sung C, Wei Y, Watanabe S, Lee HS, Khoo YM, Fan L, Rathore APS, Chan KW-K, Choy MM, Kamaraj US, et al. 2016. Extended Evaluation of Virological, Immunological and Pharmacokinetic Endpoints of CELADEN: A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Celgosivir in Dengue Fever Patients. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(8):e0004851. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004851>

Sussman M, Loya Y, Fine M, Rosenberg E. 2003. The marine fireworm *Hermodice carunculata* is a winter reservoir and spring-summer vector for the coral-bleaching pathogen *Vibrio shiloi*. *Environ Microbiol.* 5(4):250–255. <https://doi.org/10.1046/j.1462-2920.2003.00424.x>

Swan T, Russell TL, Staunton KM, Field MA, Ritchie SA, Burkot TR. 2022. A literature review of dispersal pathways of *Aedes albopictus* across different spatial scales: implications for vector surveillance. *Parasit Vectors.* 15:303. <https://doi.org/10.1186/s13071-022-05413-5>

Talapko J, Škrlec I, Alebić T, Jukić M, Včev A. 2019. Malaria: The Past and the Present.

Microorganisms. 7(6):179. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7060179>

Talyuli OAC, Bottino-Rojas V, Polycarpo CR, Oliveira PL, Paiva-Silva GO. 2021. Non-immune Traits Triggered by Blood Intake Impact Vectorial Competence. *Front Physiol* [Internet]. [accessed 2024 Mar 13] 12. <https://doi.org/10.3389/fphys.2021.638033>

Taylor CE, Raski DJ. 1964. On the Transmission of Grape Fanleaf By Xiphinema Index. *Nematologica*. 10(3):489–495. <https://doi.org/10.1163/187529264X00510>

Tchen J, Ouledi A, Lepère JF, Ferrandiz D, Yvin JL. 2006. [Epidemiology and prevention of malaria in the southwestern islands of the Indian Ocean]. *Med Trop (Mars)*. 66(3):295–301.

Tchioffo MT, Boissière A, Churcher TS, Abate L, Gimonneau G, Nsango SE, Awono-Ambéné PH, Christen R, Berry A, Morlais I. 2013. Modulation of Malaria Infection in *Anopheles gambiae* Mosquitoes Exposed to Natural Midgut Bacteria. *PLOS ONE*. 8(12):e81663. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0081663>

Teixeira MG, João Bosco Siqueira J, Ferreira GLC, Bricks L, Joint G. 2013. Epidemiological Trends of Dengue Disease in Brazil (2000–2010): A Systematic Literature Search and Analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(12):e2520. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002520>

Tempelis CH, Reeves WC, Nelson RL. 1976. Species identification of blood meals from *Culex tarsalis* that had fed on passeriform birds. *Am J Trop Med Hyg*. 25(5):744–746. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1976.25.744>

Teo CSH, Chu JJH. 2014. Cellular Vimentin Regulates Construction of Dengue Virus Replication Complexes through Interaction with NS4A Protein. *J Virol*. 88(4):1897–1913. <https://doi.org/10.1128/jvi.01249-13>

Thomas DD, Donnelly CA, Wood RJ, Alphey LS. 2000. Insect population control using a dominant, repressible, lethal genetic system. *Science*. 287(5462):2474–2476. <https://doi.org/10.1126/science.287.5462.2474>

Thomas SJ, Yoon I-K. 2019. A review of Dengvaxia®: development to deployment. *Hum Vaccines Immunother*. 15(10):2295–2314. <https://doi.org/10.1080/21645515.2019.1658503>

Tikhomirova VA. 1970. On the lifecycle of *Skrjabillanus scardinii* Molnar, 1965. *Dokl Akad Nauk SSSR* [Internet]. [accessed 2022 Dec 20] 195(2). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19710802977>

de la Torre JC, Holland JJ. 1990. RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J Virol*. 64(12):6278–6281.

Tortosa P, Pascalis H, Guernier V, Cardinale E, Le Corre M, Goodman SM, Dellagi K. 2012. Deciphering arboviral emergence within insular ecosystems. *Infect Genet Evol*. 12(6):1333–1339. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2012.03.024>

Tram U, Fredrick K, Werren JH, Sullivan W. 2006. Paternal chromosome segregation during the first mitotic division determines Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility phenotype. *J Cell Sci*. 119(17):3655–3663. <https://doi.org/10.1242/jcs.03095>

Troost B, Smit JM. 2020. Recent advances in antiviral drug development towards dengue virus. *Curr Opin Virol*. 43:9–21. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2020.07.009>

Troupin A, Shirley D, Londono-Renteria B, Watson AM, McHale C, Hall A, Hartstone-Rose A, Klimstra WB, Gomez G, Colpitts TM. 2016. A Role for Human Skin Mast Cells in Dengue Virus Infection and Systemic Spread. *J Immunol*. 197(11):4382–4391. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1600846>

Tsai C-H, Chen T-H, Lin C, Shu P-Y, Su C-L, Teng H-J. 2017. The impact of temperature and Wolbachia infection on vector competence of potential dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the transmission of dengue virus serotype 1 in southern Taiwan. *Parasit Vectors*. 10(1):551. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2493-x>

Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. 2007. A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential. *PLOS Pathog*. 3(12):e201. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>

Tuanudom R, Yurayart N, Rodkhum C, Tiawsirisup S. 2021. Diversity of midgut microbiota in laboratory-colonized and field-collected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): A preliminary study. *Heliyon*. 7(10):e08259. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e08259>

Umareddy I, Chao A, Sampath A, Gu F, Vasudevan SG. 2006. Dengue virus NS4B interacts with NS3 and dissociates it from single-stranded RNA. *J Gen Virol*. 87(9):2605–2614.

<https://doi.org/10.1099/vir.0.81844-0>

United Nations. 2018. Population facts 2018/1: The speed of urbanization around the world [Internet]. [place unknown]: United Nations, Department of Economic and Social Affairs, Population Division; [accessed 2022 May 9].

https://population.un.org/wup/Publications/Files/WUP2018-PopFacts_2018-1.pdf

Vachon V, Laprade R, Schwartz J-L. 2012. Current models of the mode of action of *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins: A critical review. *J Invertebr Pathol.* 111(1):1–12. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.001>

Vaidyanathan R, Scott TW. 2006. Apoptosis in mosquito midgut epithelia associated with West Nile virus infection | Apoptosis. *Apoptosis.* 11:1643–1651. <https://doi.org/doi.org/10.1007/s10495-006-8783-y>

Van den Eynde C, Sohler C, Matthijs S, De Regge N. 2022. Japanese Encephalitis Virus Interaction with Mosquitoes: A Review of Vector Competence, Vector Capacity and Mosquito Immunity. *Pathogens.* 11(3):317. <https://doi.org/10.3390/pathogens11030317>

Vanlandingham DL, Higgs S, Huang Y-JS. 2016. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and Mosquito-Borne Viruses in the United States. *J Med Entomol.* 53(5):1024–1028. <https://doi.org/10.1093/jme/tjw025>

Vantaux A, Ouattara I, Lefèvre T, Dabiré KR. 2016. Effects of larvicidal and larval nutritional stresses on *Anopheles gambiae* development, survival and competence for *Plasmodium falciparum*. *Parasit Vectors.* 9(1):226. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1514-5>

Varjak M, Maringer K, Watson M, Sreenu VB, Fredericks AC, Pondeville E, Donald CL, Sterk J, Kean J, Vazeille M, et al. 2017. *Aedes aegypti* Piwi4 Is a Noncanonical PIWI Protein Involved in Antiviral Responses. *mSphere.* 2(3):10.1128/msphere.00144-17. <https://doi.org/10.1128/msphere.00144-17>

Vasilakis N, Deardorff ER, Kenney JL, Rossi SL, Hanley KA, Weaver SC. 2009. Mosquitoes Put the Brake on Arbovirus Evolution: Experimental Evolution Reveals Slower Mutation Accumulation in Mosquito Than Vertebrate Cells. Andino R, editor. *PLoS Pathog.* 5(6):e1000467. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000467>

Vasilakis N, Weaver SC. 2008. Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence. In: *Adv Virus Res* [Internet]. Vol. 72. [place unknown]: Elsevier; [accessed 2019 Sep 2]; p. 1–76. [https://doi.org/10.1016/S0065-3527\(08\)00401-6](https://doi.org/10.1016/S0065-3527(08)00401-6)

Vavassori L, Saddler A, Müller P. 2019. Active dispersal of *Aedes albopictus*: a mark-release-recapture study using self-marking units. *Parasit Vectors.* 12(1):583. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3837-5>

Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux A-B. 2010. Orally Co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, Can Deliver Both Dengue and Chikungunya Infectious Viral Particles in Their Saliva. *PLoS Negl Trop Dis.* 4(6):e706. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000706>

Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq J-S, Fontenille D, Schuffenecker I, et al. 2007. Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes albopictus*. *PLOS ONE.* 2(11):e1168. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001168>

Vega-Rúa A, Marconcini M, Madec Y, Manni M, Carraretto D, Gomulski LM, Gasperi G, Failloux A-B, Malacrida AR. 2020. Vector competence of *Aedes albopictus* populations for chikungunya virus is shaped by their demographic history. *Commun Biol.* 3(1):326. <https://doi.org/10.1038/s42003-020-1046-6>

Venturi G, Di Luca M, Fortuna C, Remoli ME, Riccardo F, Severini F, Toma L, Manso M, Benedetti E, Caporali MG, et al. 2017. Detection of a chikungunya outbreak in Central Italy, August to September 2017. *Eurosurveillance.* 22. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.39.17-00646>

Veronesi E, Paslaru A, Ettlin J, Ravasi D, Flacio E, Tanadini M, Guidi V. 2023. Estimating the Impact of Consecutive Blood Meals on Vector Competence of *Aedes albopictus* for Chikungunya Virus. *Pathogens.* 12(6):849. <https://doi.org/10.3390/pathogens12060849>

Vial T, Marti G, Missé D, Pompon J. 2021. Lipid Interactions Between Flaviviruses and Mosquito Vectors. *Front Physiol* [Internet]. [accessed 2022 Apr 25] 12. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fphys.2021.763195>

Vincent M, Larrieu S, Vilain P, Etienne A, Solet J-L, François C, Roquebert B, Bandjee M-CJ, Filleul L,

Menudier L. 2019. From the threat to the large outbreak: dengue on Reunion Island, 2015 to 2018. *Eurosurveillance*. 24(47):1900346. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2019.24.47.1900346>

Vodovar N, Bronkhorst AW, Cleef KWR van, Miesen P, Blanc H, Rij RP van, Saleh M-C. 2012. Arbovirus-Derived piRNAs Exhibit a Ping-Pong Signature in Mosquito Cells. *PLOS ONE*. 7(1):e30861. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030861>

Vogels CBF, Fros JJ, Göertz GP, Pijlman GP, Koenraadt CJM. 2016. Vector competence of northern European *Culex pipiens* biotypes and hybrids for West Nile virus is differentially affected by temperature. *Parasit Vectors*. 9(1):393. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1677-0>

Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, Nasar F, Schuh AJ, Holmes EC, Higgs S, et al. 2010. Genome-Scale Phylogenetic Analyses of Chikungunya Virus Reveal Independent Emergences of Recent Epidemics and Various Evolutionary Rates. *J Virol*. 84(13):6497–6504. <https://doi.org/10.1128/JVI.01603-09>

Vontas J, Kioulos E, Pavlidi N, Morou E, della Torre A, Ranson H. 2012. Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic Biochem Physiol*. 104(2):126–131. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2012.05.008>

Wagar ZL, Tree MO, Mpoy MC, Conway MJ. 2017. Low density lipopolyprotein inhibits flavivirus acquisition in *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*. 26(6):734–742. <https://doi.org/10.1111/imb.12334>

Waggoner JJ, Balmaseda A, Gresh L, Sahoo MK, Montoya M, Wang C, Abeynayake J, Kuan G, Pinsky BA, Harris E. 2016. Homotypic Dengue Virus Reinfections in Nicaraguan Children. *J Infect Dis*. 214(7):986–993. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw099>

Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, Leong YS, Dong Y, Axford J, Kriesner P, et al. 2011. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*. 476(7361):450–453. <https://doi.org/10.1038/nature10355>

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). 2020. *Aedes aegypti* species page. Walter Reed Biosystematics Unit Website [Internet]. <http://wrbu.si.edu/vectorspecies/mosquitoes/aegypti>

Walter Reed Biosystematics Unit (WRBU). 2021. *Aedes albopictus* species page. Walter Reed Biosystematics Unit Website [Internet]. [accessed 2024 Apr 18]. <https://www.wrbu.si.edu/vectorspecies/mosquitoes/albopictus>

Wang C-C, Huang Z-S, Chiang P-L, Chen C-T, Wu H-N. 2009. Analysis of the nucleoside triphosphatase, RNA triphosphatase, and unwinding activities of the helicase domain of dengue virus NS3 protein. *FEBS Lett*. 583(4):691–696. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.01.008>

Wang E, Ni H, Xu R, Barrett ADT, Watowich SJ, Gubler DJ, Weaver SC. 2000. Evolutionary Relationships of Endemic/Epidemic and Sylvatic Dengue Viruses. *J Virol*. 74(7):3227–3234. <https://doi.org/10.1128/jvi.74.7.3227-3234.2000>

Wang H, Gort T, Boyle DL, Clem RJ. 2012. Effects of Manipulating Apoptosis on Sindbis Virus Infection of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *J Virol*. 86(12):6546–6554. <https://doi.org/10.1128/jvi.00125-12>

Watts DM, Burke DS, Harrison BA, Whitmire RE, 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. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1987.36.143>

Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, Shi P-Y, Vasilakis N. 2016. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Res*. 130:69–80. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>

Weaver SC, Vasilakis N. 2009. Molecular evolution of dengue viruses: Contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 9(4):523–540. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003>

Weeks AR, Breeuwer JA. 2001. *Wolbachia*-induced parthenogenesis in a genus of phytophagous mites. *Proc R Soc B Biol Sci*. 268(1482):2245–2251. <https://doi.org/10.1098/rspb.2001.1797>

Weeks AR, Turelli M, Harcombe WR, Reynolds KT, Hoffmann AA. 2007. From Parasite to Mutualist: Rapid Evolution of *Wolbachia* in Natural Populations of *Drosophila*. *PLOS Biol*. 5(5):e114. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0050114>

Wei Xiang BW, Saron WAA, Stewart JC, Hain A, Walvekar V, Missé D, Thomas F, Kini RM, Roche B, Claridge-Chang A, et al. 2022. Dengue virus infection modifies mosquito blood-feeding behavior to increase transmission to the host. *Proc Natl Acad Sci*. 119(3):e2117589119. <https://doi.org/10.1073/pnas.2117589119>

- Wei Y, Wang J, Wei Y-H, Song Z, Hu K, Chen Y, Zhou G, Zhong D, Zheng X. 2021. Vector Competence for DENV-2 Among *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Populations in China. *Front Cell Infect Microbiol.* 11:649975. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.649975>
- Weinert LA, Araujo-Jnr EV, Ahmed MZ, Welch JJ. 2015. The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proc R Soc B Biol Sci.* 282(1807):20150249. <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.0249>
- Welsch S, Miller S, Romero-Brey I, Merz A, Bleck CKE, Walther P, Fuller SD, Antony C, Krijnse-Locker J, Bartenschlager R. 2009. Composition and Three-Dimensional Architecture of the Dengue Virus Replication and Assembly Sites. *Cell Host Microbe.* 5(4):365–375. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2009.03.007>
- Werren JH. 1997. Biology of Wolbachia. *Annu Rev Entomol.* 42:587–609. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.42.1.587>
- Werren JH, Baldo L, Clark ME. 2008. Wolbachia: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol.* 6(10):741–751. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- Werren JH, Zhang W, Rong Guo L. 1995. Evolution and phylogeny of Wolbachia: reproductive parasites of arthropods. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* [Internet]. [accessed 2022 Oct 11]. <https://doi.org/10.1098/rspb.1995.0117>
- Whitehorn J, Kien DTH, Nguyen NM, Nguyen HL, Kyrylos PP, Carrington LB, Tran CNB, Quyen NTH, Thi LV, Le Thi D, et al. 2015. Comparative Susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to Dengue Virus Infection After Feeding on Blood of Viremic Humans: Implications for Public Health. *J Infect Dis.* 212(8):1182–1190. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiv173>
- WHO (World Health Organization), editor. 1997. Dengue haemorrhagic fever: diagnosis, treatment, prevention, and control. 2nd ed. Geneva: World Health Organization.
- WHO (World Health Organization). 2009. Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control. WHO and TDR. WHO, TDR, editors. Geneva.
- WHO (World Health Organization). 2018a. Zika virus [Internet]. [accessed 2022 Sep 28]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>
- WHO (World Health Organization). 2018b. Vaccines and immunization: Dengue [Internet]. [accessed 2022 May 26]. <https://www.who.int/news-room/questions-and-answers/item/dengue-vaccines>
- WHO (World Health Organization). 2018c. Prioritizing diseases for research and development in emergency contexts [Internet]. [place unknown]; [accessed 2022 Oct 3]. <https://www.who.int/activities/prioritizing-diseases-for-research-and-development-in-emergency-contexts>
- WHO (World Health Organization). 2019a. Yellow fever [Internet]. [accessed 2022 Sep 28]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>
- WHO (World Health Organization). 2019b. Japanese encephalitis [Internet]. [accessed 2022 Sep 28]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/japanese-encephalitis>
- WHO (World Health Organization). 2020a. Maladies à transmission vectorielle [Internet]. [accessed 2022 Sep 24]. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- WHO (World Health Organization). 2020b. Chikungunya fact sheet [Internet]. [accessed 2022 Sep 28]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chikungunya>
- WHO (World Health Organization). 2020c. Vector-borne diseases [Internet]. [accessed 2022 Sep 28]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- WHO (World Health Organization). 2021. Dengue and severe dengue. World Health Organ [Internet]. [accessed 2021 Jul 8]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- WHO (World Health Organization). 2022. Filariose lymphatique [Internet]. [accessed 2022 Sep 28]. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis>
- WHO (World Health Organization). 2023. Dengue and severe dengue [Internet]. [accessed 2023 Oct 2]. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- Wilder-Smith A. 2020. Dengue vaccine development: status and future. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz.* 63(1):40–44. <https://doi.org/10.1007/s00103-019-03060-3>
- Winter F, Edaye S, Hüttenhofer A, Brunel C. 2007. *Anopheles gambiae* miRNAs as actors of defence

reaction against Plasmodium invasion. *Nucleic Acids Res.* 35(20):6953–6962. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm686>

Wirkner CS, Tögel M, Pass G. 2013. The Arthropod Circulatory System. In: Minelli A, Boxshall G, Fusco G, editors. *Arthropod Biol Evol Mol Dev Morphol* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer; [accessed 2022 Sep 28]; p. 343–391. https://doi.org/10.1007/978-3-642-36160-9_14

Woolhouse MEJ. 2006. Where Do Emerging Pathogens Come from? *Microbe Mag.* 1(11):511–515. <https://doi.org/10.1128/microbe.1.511.1>

World Mosquito Program (WMP). 2023. Our story. World Mosq Program [Internet]. [accessed 2024 Jan 31]. <https://www.worldmosquitoprogram.org/en/about-us/our-story>

Wu S-JL, Grouard-Vogel G, Sun W, Mascola JR, Brachtel E, Putvatana R, Louder MK, Filgueira L, Marovich MA, Wong HK, et al. 2000. Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection. *Nat Med.* 6(7):816–820. <https://doi.org/10.1038/77553>

Wu X, Lindsey ARI, Chatterjee P, Werren JH, Stouthamer R, Yi SV. 2020. Distinct epigenomic and transcriptomic modifications associated with Wolbachia-mediated asexuality. *PLOS Pathog.* 16(3):e1008397. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008397>

Xi Z, Khoo CCH, Dobson SL. 2005. Wolbachia establishment and invasion in an *Aedes aegypti* laboratory population. *Science.* 310(5746):326–328. <https://doi.org/10.1126/science.1117607>

Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. 2008. The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. Schneider DS, editor. *PLoS Pathog.* 4(7):e1000098. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000098>

Xiao F-Z, Zhang Y, Deng Y-Q, He S, Xie H-G, Zhou X-N, Yan Y-S. 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(11):3053–3057. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2051-1>

Xie X, Gayen S, Kang C, Yuan Z, Shi P-Y. 2013. Membrane Topology and Function of Dengue Virus NS2A Protein. *J Virol.* 87(8):4609–4622. <https://doi.org/10.1128/jvi.02424-12>

Xie X, Zou J, Puttikhunt C, Yuan Z, Shi P-Y. 2015. Two Distinct Sets of NS2A Molecules Are Responsible for Dengue Virus RNA Synthesis and Virion Assembly. *J Virol.* 89(2):1298–1313. <https://doi.org/10.1128/JVI.02882-14>

Yan H, Zhou Y, Liu Y, Deng Y, Puthiyakunnon S, Chen X. 2014. miR-252 of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* regulates dengue virus replication by suppressing the expression of the dengue virus envelope protein. *J Med Virol.* 86(8):1428–1436. <https://doi.org/10.1002/jmv.23815>

Ye YH, Carrasco AM, Frentiu FD, Chenoweth SF, Beebe NW, Hurk AF van den, Simmons CP, O’Neill SL, McGraw EA. 2015. Wolbachia Reduces the Transmission Potential of Dengue-Infected *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 9(6):e0003894. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003894>

Ye YH, Chenoweth SF, Carrasco AM, Allen SL, Frentiu FD, Van Den Hurk AF, Beebe NW, McGraw EA. 2016. Evolutionary potential of the extrinsic incubation period of dengue virus in *Aedes aegypti*: EVOLUTIONARY POTENTIAL OF VIRUS TRANSMISSIBILITY. *Evolution.* 70(11):2459–2469. <https://doi.org/10.1111/evo.13039>

Yen JH, Barr AR. 1971. New hypothesis of the cause of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature.* 232(5313):657–658. <https://doi.org/10.1038/232657a0>

Yusof R, Clum S, Wetzel M, Murthy HMK, Padmanabhan R. 2000. Purified NS2B/NS3 Serine Protease of Dengue Virus Type 2 Exhibits Cofactor NS2B Dependence for Cleavage of Substrates with Dibasic Amino Acids in Vitro*. *J Biol Chem.* 275(14):9963–9969. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.14.9963>

Zabalou S, Apostolaki A, Pattas S, Veneti Z, Paraskevopoulos C, Livadaras I, Markakis G, Brissac T, Merçot H, Bourtzis K. 2008. Multiple Rescue Factors Within a Wolbachia Strain. *Genetics.* 178(4):2145–2160. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.086488>

Zélé F, Nicot A, Berthomieu A, Weill M, Duron O, Rivero A. 2014. Wolbachia increases susceptibility to Plasmodium infection in a natural system. *Proc R Soc B Biol Sci.* 281(1779):20132837. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2837>

Zhang C, Mammen MP, Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, Nimmannitya S, Kalayanaroj S, Holmes EC. 2005. Clade Replacements in Dengue Virus Serotypes 1 and 3 Are Associated with Changing Serotype Prevalence. *J Virol.* 79(24):15123–15130. <https://doi.org/10.1128/JVI.79.24.15123-15130.2005>

Zhang D, Wang Y, He K, Yang Q, Gong M, Ji M, Chen L. 2020. Wolbachia limits pathogen infections

through induction of host innate immune responses. PLOS ONE. 15(2):e0226736. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0226736>

Zhang G, Hussain M, O'Neill SL, Asgari S. 2013. Wolbachia uses a host microRNA to regulate transcripts of a methyltransferase, contributing to dengue virus inhibition in *Aedes aegypti*. Proc Natl Acad Sci. 110(25):10276–10281. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303603110>

Zhang H, Zhu Y, Liu Z, Peng Y, Peng W, Tong L, Wang J, Liu Q, Wang P, Cheng G. 2022. A volatile from the skin microbiota of flavivirus-infected hosts promotes mosquito attractiveness. Cell. 185(14):2510-2522.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.05.016>

Zhang W, Chipman PR, Corver J, Johnson PR, Zhang Y, Mukhopadhyay S, Baker TS, Strauss JH, Rossmann MG, Kuhn RJ. 2003. Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. Nat Struct Biol. 10(11):907–912. <https://doi.org/10.1038/nsb990>

Zhao R, Wang M, Cao Jing, Shen J, Zhou X, Wang D, Cao Jimin. 2021. Flavivirus: From Structure to Therapeutics Development. Life. 11(7):615. <https://doi.org/10.3390/life11070615>

Zhou J, Zhang J, Sun D, Ma Q, Chen H, Ma L, Ding Y, Liu Y. 2013. The Distribution of Synonymous Codon Choice in the Translation Initiation Region of Dengue Virus. PLOS ONE. 8(10):e77239. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077239>

Zhou Z, Dang Y, Zhou M, Li L, Yu C, Fu J, Chen S, Liu Y. 2016. Codon usage is an important determinant of gene expression levels largely through its effects on transcription. Proc Natl Acad Sci. 113(41):E6117–E6125. <https://doi.org/10.1073/pnas.1606724113>

Zug R, Hammerstein P. 2012. Still a Host of Hosts for Wolbachia: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. Cordaux R, editor. PLoS ONE. 7(6):e38544. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038544>

Annexes

1. Publication 6 : “Investigation of Dengue Infection in Asymptomatic Individuals during a Recent Outbreak in La Réunion.”



Article

Investigation of Dengue Infection in Asymptomatic Individuals during a Recent Outbreak in La Réunion

Olga De Santis ^{1,2,*}, Emilie Pothin ^{3,4}, Nicolas Bouscaren ¹, Seth R. Irish ^{3,4}, Marie-Christine Jaffar-Bandjee ⁵, Luce Menudier ⁶, Julie Ramis ⁷, Cédric Schultz ¹, Florence Lamaurt ^{1,8}, Ania Wisniak ², Antoine Bertolotti ^{1,9}, Sarah Hafsia ⁷, Philippe Dussart ¹⁰, Laurence Baril ¹¹, Patrick Mavingui ⁷ and Antoine Flahault ²

¹ Inserm CIC1410, CHU de La Réunion, 97410 Saint Pierre, France

² Global Health Institute, University of Geneva, 1209 Geneva, Switzerland

³ Swiss Tropical and Public Health Institute, 4002 Basel, Switzerland

⁴ Department of Public Health, Faculty of Medicine, University of Basel, 4051 Basel, Switzerland

⁵ Centre National de Référence Arbovirus Associé Réunion, CHU de La Réunion, 97400 Saint Denis, France

⁶ Santé Publique France, 97400 Saint Denis, France

⁷ UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire et Tropical, Cyroi, 97400 Saint Denis, France

⁸ Institut de santé publique, d'épidémiologie et de développement (ISPED), Université de Bordeaux, 33000 Bordeaux, France

⁹ Service des Maladies Infectieuses—Dermatologie, CHU de La Réunion, 97410 Saint Pierre, France

¹⁰ Unité de Virologie, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo 101, Madagascar

¹¹ Unité d'épidémiologie, Institut Pasteur de Madagascar, Antananarivo 101, Madagascar

* Correspondence: olga.de-santis@chu-reunion.fr



Citation: De Santis, O.; Pothin, E.; Bouscaren, N.; Irish, S.R.; Jaffar-Bandjee, M.-C.; Menudier, L.; Ramis, J.; Schultz, C.; Lamaurt, F.; Wisniak, A., et al. Investigation of Dengue Infection in Asymptomatic Individuals during a Recent Outbreak in La Réunion. *Viruses* **2023**, *15*, 742. <https://doi.org/10.3390/v15030742>

Academic Editor: Erich Mackow

Received: 12 December 2022

Revised: 15 February 2023

Accepted: 10 March 2023

Published: 14 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: The number of dengue cases has increased dramatically over the past 20 years and is an important concern, particularly as the trends toward urbanization continue. While the majority of dengue cases are thought to be asymptomatic, it is unknown to what extent these contribute to transmission. A better understanding of their importance would help to guide control efforts. In 2019, a dengue outbreak in La Réunion resulted in more than 18,000 confirmed cases. Between October 2019 and August 2020, 19 clusters were investigated in the south, west, and east of the island, enabling the recruitment of 605 participants from 368 households within a 200 m radius of the home of the index cases (ICs). No active asymptomatic infections confirmed by RT-PCR were detected. Only 15% were possible asymptomatic dengue infections detected by the presence of anti-dengue IgM antibodies. Only 5.3% of the participants had a recent dengue infection confirmed by RT-PCR. Although the resurgence of dengue in La Réunion is very recent (2016), the rate of anti-dengue IgG positivity, a marker of past infections, was already high at 43% in this study. Dengue transmission was focal in time and space, as most cases were detected within a 100-m radius of the ICs, and within a time interval of less than 7 days between infections detected in a same cluster. No particular demographic or socio-cultural characteristics were associated with dengue infections. On the other hand, environmental risk factors such as type of housing or presence of rubbish in the streets were associated with dengue infections.

Keywords: dengue; asymptomatic infections; La Réunion; cluster study; dengue outbreak

1. Introduction

Dengue is the most common arboviral disease in the world [1]. Half the world's population lives in areas at risk of dengue virus (DENV) infection [2]. The burden is increasing due to climate change and increases in urbanization, population, and air traffic [3–5]. Globally, there are an estimated 100 million new infections per year, including 500,000 hospitalizations for severe cases and 10,000 to 15,000 deaths (2021 estimate) [1,6,7]. The epidemiological situation of dengue in Africa and the Indian Ocean region is poorly understood [8]. Seroprevalence studies of febrile travelers returning to Europe have estimated a lower prevalence of dengue in travelers from Africa than from Asia or the Americas [9,10]. However, it has been estimated

that 15.7 (10.5–22.5) million symptomatic dengue infections occurred in Africa (including Madagascar and La Réunion), making Africa the second most affected continent after Asia [6].

La Réunion is a French overseas department of 2503 km² with nearly 860,000 inhabitants [11]. It is located in the southwest Indian Ocean, near the east coast of Madagascar. A tropical environment and a high-income industrial development characterize this island. Dengue is transmitted by the bite of a mosquito and has no animal reservoir in La Réunion. *Aedes albopictus* is the main mosquito vector of dengue found in La Reunion [12]. Four serotypes for dengue (DENV1–DENV4) have been identified worldwide. The infection with one serotype confers lifelong immunity for it and only some cross-immunity for the other during the first months after infection. The island faced a major chikungunya epidemic in 2005–2006 with an attack rate of 38% [5]. In 1977–1978, a massive DENV2 epidemic occurred on the island with an attack rate of 30% [13–15]. Thereafter, only sporadic dengue cases or small outbreaks of approximately 200 cases had been detected on the island. In 2017, the surveillance system noted an unusual persistence of dengue cases during the austral winter (June to September) likely due to warmer temperatures [16] and then an intensification of the circulation of the virus that has continued until the 2021. Most dengue cases have been detected in April and May [17]. Three serotypes have been detected, DENV1, DENV2, DENV3. The most affected sectors were the south and west of the island [17]. Table 1 provides the number of estimated and confirmed dengue cases and deaths from 2018 to 2021 in La Réunion. The mortality rate reached 0.11% in 2021 [17].

Table 1. Morbidity and mortality data due to dengue from 2018 to 2021 in La Réunion [17].

Date	Estimated Cases	Confirmed Cases	Death
2018	15,460	6770	6
2019	42,420	18,217	14
2020	30,580	16,414	22
2021	59,230	29,577	33

In La Réunion, following the chikungunya epidemic in 2006, a surveillance system was created in order to rapidly identify the first cases of arbovirus infections [18]. Santé Publique France is directly informed of any laboratory-confirmed case of arbovirus infections. Vector control measures are provided by the Agence Régionale de Santé (ARS) to limit the spread of the virus by spraying with insecticide and eliminating breeding sites within a defined perimeter around the residence of the identified case.

Despite very suitable access to care, a sustained surveillance system as well as dengue prevention and control policies that have been in place for more than 10 years, the dengue epidemic in La Réunion continues to be rampant. One hypothesis that could explain the persistence of the epidemic is that part of the transmission is due to asymptomatic forms of the disease thus not detected by the surveillance system. The estimated percentage of asymptomatic cases during DENV outbreaks varies between 50% and 90% [19–23]. Studies collecting data on the presence of DENV infections considering all disease patterns including asymptomatic people have been performed in Latin America and Southeast Asia [19,24–26] but not in the Indian Ocean region. Asymptomatic individuals could act as a reservoir of the virus. Knowing their prevalence is necessary for establishing public health policies for blood donor screenings, for conducting dengue vaccine clinical trials and has implications for vector control strategies.

This study aimed to assess the proportion of asymptomatic dengue infections by an active search around identified dengue index cases, households, and neighborhoods and to identify the main risk factors related to recent and past dengue infections.

2. Materials and Methods

2.1. Study Design

This cross-sectional observational study included a household-based survey covering the whole island of La Réunion. The strategy to detect dengue infections, according to a

geographical cluster recruitment study design, consisted in an active search in a group of participants selected within a fixed radius of the home or workplace of an index case (IC).

2.2. Clinical Definitions and Laboratory Diagnosis

Dengue-like syndrome is defined as an acute fever associated with two or more of the following signs or symptoms: nausea, vomiting, rash, headache, retro-orbital pain, myalgia, arthralgia, and bleeding [27]. No standard definitions exist for “pauci-symptomatic” and “asymptomatic”. In the present study, “asymptomatic” infections are defined as the complete absence of symptoms after a follow-up period of 14 days and the “pauci-symptomatic” include the symptomatic infections that do not meet the criteria for a dengue-like syndrome.

2.3. Laboratory Diagnosis

The World Health Organization (WHO) recommendations for the diagnosis of dengue include enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)-based detection of dengue-specific IgM antibodies or a ≥ 4 -fold increase in the titer of total antibodies to DENV in paired acute and convalescent sera; or detection of DENV by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) in plasma, serum, or whole blood [28]. According to the kinetics of DENV infection markers in the blood, anti-dengue IgM antibodies are detectable in the blood approximately three months after the infection, and anti-dengue IgG antibodies are lifelong markers [29]. Molecular detection of the virus through RT-PCR is possible during the first five days of the disease. The plaque reduction neutralization test (PRNT) is a serological test, more sensitive and specific than the ELISA method for dengue diagnosis. Moreover, PRNT can be used to identify the infecting serotype in primary infection. Furthermore, this technic was too expensive and labor consuming to be retained for our needs [30]. In the present study, the three markers (IgM, IgG (ELISA), and RT-PCR) were measured in the blood to detect recent or past dengue infections among people living in the neighborhood of dengue cases.

2.4. Identification of Index Cases

The ICs were recruited among patients who consulted the emergency rooms of the North or South University Hospital or their general practitioners with dengue-like symptoms and in whom dengue was confirmed by biological examination in hospital or city laboratories. The selection criteria for ICs were individuals ≥ 12 months old, with a positive dengue RT-PCR or a positive IgM, and with a dengue-like syndrome. An IC could not be located within 400 m of an already included IC to avoid overlap. IC was notified to the principal investigator of the study in the 14 days following their lab-confirmed infection and then included in the study by the field team as soon as possible according to the team capacity. The rationale for this time interval was to try to be close to the infection day of the IC while being constrained by logistical considerations of field recruitment. The date of inclusion of the IC was the date of commencement of screening and inclusion of study participants in the IC household and neighborhood forming a cluster. The duration for including participants in a cluster was of two weeks after the date of inclusion of the IC.

2.5. Sample Size

The sample size was targeted according to the capacity of the study team and laboratory and estimated a population density of approximately 100 people within a 100-m radius of the household of the IC. Estimating that 40% of individuals would be absent at the time of the survey and that 20% of individuals would refuse, a target of 40 participants enrolled per cluster seemed realistic. Considering an estimated prevalence of dengue in La Reunion of 3% and that in similar studies using a geographical cluster design around ICs, between 4% and 27% of the participants screened had asymptomatic dengue infection [26,31]. A sample size of 600 participants would likely provide enough power (with a confidence level of 1.96 (95%) and an error of 5%), i.e., a minimum of 15 ICs were required.

2.6. Cluster Definitions and Data Collection

The residence of an IC represented the center of a geographic cluster. The participants were recruited from households that were within 100 m of the house of an index case. The rationale behind this 100 m was that *Ae. albopictus* mosquitoes have been shown to have limited flight ranges in Reunion [32]. This radius could be increased to 200 m if the targeted sample size was not achieved due to absences or refusal. All houses in the cluster were identified with *Google Earth* and *OpenStreetMaps* and visited for inclusion in the study. Data collection started with the household of the IC and then continued in the neighboring houses. In each household, all consenting individuals were eligible to participate, with the intent to include approximately 40 participants in each cluster. The exclusion criteria were age under one year old and any contraindication to proceeding to blood sampling.

A complete medical history including a collection of signs and symptoms by organic system was conducted.

Blood samples were collected in dry and with anticoagulant (EDTA) tubes: 1 dry tube of 4 mL for anti-DENV IgM/IgG serology (*Panbio™ Dengue IgG, IgM Capture ELISA*); 1 EDTA tube of 4 mL for DENV RT-PCR (in-house technique [33]). Urine samples were also collected and frozen for further search of the excretion of dengue virus by RT-PCR. All analyses were conducted at the laboratory of the North University Hospital. Serotypes were determined with a second RT-PCR (in-house technique of the *Centre National de Référence (CNR) Arbovirus de Marseille*). Participants reporting a dengue diagnosis in the weeks preceding the study were asked to provide their lab analysis report to confirm RT-PCR positivity for DENV. If they did not have the report, the study team requested it directly from the laboratory or from the general practitioner. Due to the lack of specificity of anti-dengue IgM for asymptomatic cases, a follow-up visit was held 15 to 21 days after the first home visit for participants with positive IgM to provide paired serology and look for IgG seroconversion or an increase in total antibody titers. At this visit, blood was only collected for anti-DENV IgM/IgG serology.

By going in the field and recruiting participants who lived in the neighborhood of identified dengue cases, the study team had the opportunity to collect, in addition to clinical data, data on socio-demographic characteristics of households as well as environmental potential risk factors present in the neighborhoods and to evaluate their possible impact on the transmission of dengue.

2.7. Statistical Methods

The proportions of the sampled population with DENV infections confirmed by RT-PCR and with IgG DENV-positive results were selected respectively as primary and secondary outcomes. Signs and symptoms were recorded in DENV RT-PCR-positive participants and ICs; proportions were computed and cases were classified accordingly as symptomatic (presence of fever only or with one or more other symptoms), pauci-symptomatic (absence of fever but presence of one or more other symptoms) or asymptomatic (absence of symptoms) infections. The comparison between groups of categorical variables were made using the chi-square or Fisher exact test according to the sample size. The association between explanatory variables and outcomes (positive DENV RT-PCR, positive anti-dengue IgG) was estimated using bivariate analyses and multivariate logistic regression models. The multivariate logistic regression models were constructed with the variables that showed significant association in the bivariate analysis and the best models were selected following a backward stepwise procedure of selection of variables. All analyses were performed with R Statistical Software (v.4.2.2 R Core Team 2022).

2.8. Ethics and Confidentiality

This study was carried out in accordance with the law n 2012-300 of 5 March 2012 relating to research involving the human person, as well as in accordance with the Good Clinical Practices [34] and the Helsinki declaration, and the participants or the parents of minors participating in the study provided written informed consent before inclusion. The

study was accepted by the Comité de Protection des Personnes of the University Hospital of Saint-Etienne (CPP SUD-EST I), France (n ID RCB:2018-A02357-48).

3. Results

The study was conducted between October 2019 and August 2020. A total of 17 dengue index cases (IC) were identified, and 605 participants were recruited from 368 households within a 100 to 200 m radius of the IC’s homes (Figure 1).



Figure 1. Flowchart describing the included study population and the dengue RT-PCR and anti-dengue IgM results.

3.1. Cluster Investigation

Seventeen ICs formed the basis for 17 clusters. Additionally, the place of work of one IC was used to create an additional cluster, and one cluster was formed for an IC who did not return the consent form, so while the data of the IC were not used, the cluster was kept. This resulted in 19 clusters. The clusters, distributed throughout the whole island, are described in Table 2, with the prevalence of dengue infections detected by RT-PCR per cluster and the seroprevalence of IgM and IgG. The clusters are mapped in Figure 2.

Table 2. Locations of the clusters and number of participants included with DENV RT-PCR and anti-dengue IgM- and IgG-positive results (results of IC are not included). In clusters where no DENV RT-PCR-positive participants were detected, the serotype of the IC is displayed.

Cluster	Season [Month]	Location	Number of Participants	DENV RT-PCR+	IgM +	IgG +	Serotype
				n (%)	n (%)	n (%)	
1	Winter [10]	South	17	0	0	2 (12%)	DEN-2
2	Summer [11]	South	33	0	5 (15%)	14 (42%)	DEN-2
3	Summer [11]	South	43	0	2 (5%)	21 (49%)	DEN-1
4	Summer [02]	South	39	3 (8%)	6 (15%)	19 (49%)	DEN-1
5	Summer [02]	South	39	1 (3%)	1 (3%)	11 (28%)	DEN-2
6	Summer [02]	South	46	0	3 (7%)	19 (41%)	DEN-1
7	Summer [03]	East	33	6 (18%)	5 (15%)	15 (45%)	DEN-3
8	Summer [03]	East	27	0	3 (11%)	7 (26%)	NA

Table 2. Cont.

Cluster	Season [Month]	Location	Number of Participants	DENV RT-PCR+	IgM +	IgG +	Serotype
				n (%)	n (%)	n (%)	
9	Summer [04]	South	3	0	0	1 (33%)	DEN-1
10	Winter [05]	South	31	2 (6%)	3 (10%)	5 (16%)	DEN-1
11	Winter [06]	South	45	5 (11%)	14 (31%)	32 (71%)	NA
12	Winter [06]	West	16	2 (12%)	7 (44%)	8 (50%)	DEN-1
13	Winter [06]	West	13	0	0	2 (15%)	DEN-1
14	Winter [07]	West	12	2 (17%)	3 (25%)	6 (50%)	NA
15	Winter [07]	West	49	1 (2%)	4 (8%)	28 (57%)	NA
16	Winter [07]	West	56	7 (13%)	6 (11%)	29 (52%)	DEN-1
17	Winter [08]	West	28	0	1 (4%)	6 (21%)	DEN-1
18	Winter [08]	West	12	0	2 (17%)	6 (50%)	NA
19	Winter [08]	West	63	3 (5%)	1 (2%)	27 (43%)	NA
Total			605	32 (5.3%)	66 (11%)	258 (43%)	

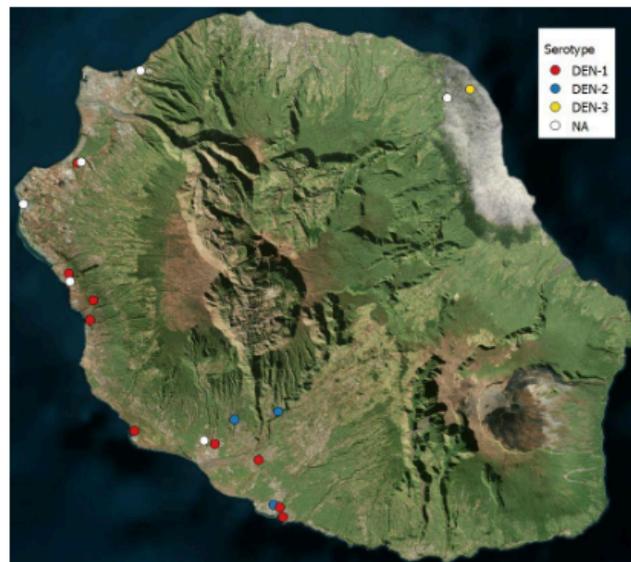


Figure 2. Map of the 19 clusters throughout the island. The dots represent the locations of clusters. The colors represent the serotype found in the cluster, as listed in Table 2.

3.2. Demographic Characteristics

Table 3 shows the demographic and health characteristics of all the study subjects. Eighty-six percent were adults, and the mean age was 46 years old. Thirty percent were more than 60 years old. Fifty-seven percent were female.

Table 3. Demographic characteristics.

Demographic Characteristics	Index Cases N = 17	Participants N = 605
Sex		
Female	11 (65%)	346 (57%)
Male	6 (35%)	259 (43%)
Age mean (SD); median [IQR]	36 (21); 36 [25]	46 (20); 48 [30]
Age categories (years)		
<5	1 (6%)	5 (1%)
5–11	3 (18%)	36 (6%)
12–17	0	39 (6%)
18–59	11 (65%)	340 (56%)
≥60	2 (12%)	185 (31%)
Activity		
Housewife/husband or unemployed	1 (6%)	135 (22%)
Retired/Disabled	1 (6%)	160 (26%)
Student/in training	4 (24%)	93 (15%)
Worker	11 (65%)	205 (34%)
NA	0	12 (2%)

SD: standard deviation; IQR: interquartile range; NA: not available.

3.3. Detection of Dengue Virus by RT-PCR

No active asymptomatic infections confirmed by RT-PCR were detected. Out of the 605 participants recruited around the index cases, only 5.3% (32/605) presented a recent or active dengue infection confirmed by RT-PCR: only 3 were detected during the field survey, and the other 29 corresponded to confirmed recent infections reported by the participants and for which the study team could retrieve the lab results. These recent infections occurred in the 3 months preceding the survey, corresponding to the duration of IgM persistence in blood after infection. Participants with recent dengue infections were found in 10 of the 19 clusters investigated. The active dengue infections were found in only two clusters (in the south in February and in the East in March). The prevalence of recent dengue infections confirmed by molecular analysis (RT-PCR) in each cluster varied from 0% to 18% (Table 2).

3.4. Dengue-Positive RT-PCR in Households

The 622 study subjects (IC and participants) were distributed in 368 households. The 17 ICs and the 32 RT-PCR-positive participants were distributed across 44 households. In 17/44 households, only one study subject was included in the study, and in 27/44 households, multiple study subjects were included per house (range 2 to 5). Among these 27 households, only 2 contained more than one detected dengue infection.

3.5. Time Interval between Dengue Infections within Clusters

Figure 3 shows the timelines of dengue infection onset and the inclusion study periods for each cluster where dengue cases were detected. Dengue recent infections are clustered close in time and generally just after the onset of IC infection. The study team's inclusion

period occurred after the clustered dengue cases. Table 4 shows the time intervals between the date of laboratory confirmation of dengue infection and the date of the study team visit to include the IC and screen and include the participants in the neighborhood. For clusters 14, 16, and 19, the time interval for inclusion of the IC was not respected due to inaccurate information received at the time of screening. These data were not excluded as the deviation did not prevent from interpreting them. In clusters 4, 7, and 9, active dengue infections were detected during the field visit to recruit participants. This explains the time interval of '0' days. For all the other clusters, participants with recent dengue infections, already diagnosed by general practitioners before our field visit, were included. The date of these infections could precede the infection of the ICs. These findings suggest that, for most of the clusters, the dengue virus circulated before the infection of the IC. Moreover, the infections detected in a cluster occurred in a limited period of time. Looking at the dates of these recent dengue infections, it resulted that, in the majority of the clusters, for each infection, another occurred within 7 days.

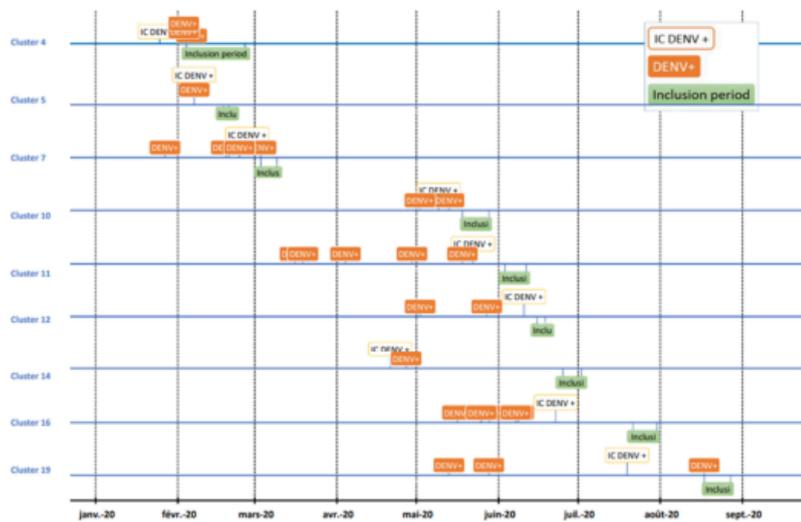


Figure 3. Timelines displaying the occurrence of dengue-detected infections in clusters and the inclusion period.

Table 4. Time interval in days between the date of laboratory confirmation of dengue infections and the date of the study team field visits to screen and include ICs and participants.

Cluster no	Time Interval between the Date of Dengue Infection Confirmation and the Date of Inclusion in the Study [days]		Minimum Time Interval between Dengue Infections Dates in Each Cluster [days]
	IC	Participants	
Cluster 01	4	-	-
Cluster 02	8	-	-
Cluster 03	7	-	-
Cluster 04	10	0, 7, 9	0–9
Cluster 05	12	13	0
Cluster 06	11	-	-
Cluster 07	13 *	0, 12, 0, 10, 13, 36	0–23

Table 4. Cont.

Cluster no	Time Interval between the Date of Dengue Infection Confirmation and the Date of Inclusion in the Study [days]		Minimum Time Interval between Dengue Infections Dates in Each Cluster [days]
	IC	Participants	
Cluster 08	14	-	-
Cluster 09	0 [§]	-	-
Cluster 10	9	8, 25	4–7
Cluster 11	13	22, 86, 84, 43, 68	3–19
Cluster 12	5	22, 46	14–25
Cluster 13	12	-	-
Cluster 14	71	65	6
Cluster 15	NA [¶]	36	-
Cluster 16	31	57, 54, 54, 44, 45, 73, 64	1–14
Cluster 17	13	-	-
Cluster 18	NA [#]	-	-
Cluster 19	30	81, 105, 9	15–29

[§] all diagnostics were confirmed by RT-PCR except for the IC of cluster 07, which was confirmed by the presence of IgM. [¶] the dengue confirmation by RT-PCR was made by the study team on the day of inclusion, [¶] the IC could not be included in the study because the signed informed consent was not returned. [#] there is no IC for cluster 18, the center of the cluster was the working place of IC 17.

3.6. Dengue Serotypes

For the three active dengue infections detected within the study, serotyping was performed and resulted in one DEN-1 in cluster 4 (south) and two DEN-3 in cluster 7 (east). For ICs and participants with recent infections detected prior to the recruitment team's visit, serotyping results were not always available. Some could be performed on residual blood samples held by the diagnosing laboratories, and for seven cases, dengue virus could be detected in a urine sample, and serotyping was performed. In the end, serotypes were available for 16/48 dengue infections. As presented in the last column of Table 2, DEN-1, DEN-2, and DEN-3 were detected, with a strong majority of DEN-1. DEN-3 was only detected in the eastern region, and DEN-2 was only found in the south. In clusters 4, 7, and 12, several serotype results were available, but only one serotype was present per cluster. Unfortunately, serotype results from the two households with multiple dengue infections were not available.

3.7. Clinical Presentation of Dengue RT-PCR Confirmed Infections

By gathering the 16 ICs diagnosed with RT-PCR (excluding one case detected with serology), the 27 recent dengue infections included in the study, and the 3 active dengue infections, the total number of dengue infections confirmed by RT-PCR was 48. Among these, 30 (83%) presented a dengue-like syndrome, and 8 (17%) were pauci-symptomatic, which means that symptoms were declared but not meeting the definition of a dengue-like syndrome (described in the method). Overall, the pauci-symptomatic participants did not present fever but other symptoms. Of the three cases detected by the study team, all had typical dengue presentations, and one was pre-symptomatic at the time of recruitment, reporting only intense fatigue but declared a fever the day after.

The symptoms of the 48 dengue infections are summarized in Table S1 of the supplementary material. The accuracy of these results may suffer from some memory bias as the infections of some included participants could go back 3 months. The main symptoms of dengue infections were a severe fever and severe and prolonged fatigue. The other most frequent symptoms were anorexia, headache, myalgia, and arthralgia. All these symptoms, except for anorexia, are part of the dengue-like syndrome definition. Less than 10% of

dengue-confirmed study subjects complained of bleeding signs. The other pathognomonic symptoms of dengue, which are rash and retro-orbital pain, were present in 42% and 33% of study subjects, respectively. Besides fatigue, which had a mean duration of 11 days, all other symptoms had mean durations of 3 to 5 days.

3.8. Detection of Anti-Dengue IgM and IgG Antibodies in Blood Samples

As shown in Figure 1, anti-dengue IgM was detected in 8% (51/573) of participants with negative dengue RT-PCR results. Among these, 42 (81%) also had anti-dengue IgG antibodies. Additionally, 24 of them (47%) presented dengue-like symptoms, half of which (15/24) did not seek dengue laboratory confirmation (likely to be undiagnosed dengue infections). Ten of those with IgM (19%) were pauci-symptomatic, and 15 (29%) did not report any symptoms in the 3 months preceding the blood collection. Among the symptomatic cases, all were IgG-positive either at the first visit (37) or had seroconverted by the second visit 15 days later (2). Among the 15 cases that did not present any symptoms, 6 of them had no IgG at the first visit. Among these, three participated in a second visit: one was seroconverted, and two remained IgG negative, implying that the presence of IgM at the first visit might not be due to dengue infection. The proportion of possible asymptomatic dengue infections detected by IgM (15) accounts for 15% of all the 100 possible dengue infections (including ICs (17), recent infections (29), active infections (3), and IgM-positive participants (51)). However, this result is overestimated as it is likely that not all of the asymptomatic participants with positive IgM results were true dengue cases, as there is some lack of specificity in the dengue IgM assay performed with the ELISA technique [30]. Moreover, considering that IgM could persist for more than 3 months in some individuals, these results are difficult to interpret [35].

A total of 43% of participants had the presence of anti-dengue IgG, 42% (109/258) of which were not associated with a history of dengue, which means that 18% (109/605) of the study population had IgG with no history of dengue.

As shown in Table 1, the proportion of the population with IgG anti-dengue antibodies varies greatly between clusters, ranging between 12% and 71% of participants investigated with positive anti-dengue IgG in a cluster. The clusters with the highest prevalence of IgG-positive participants were located in the west part of the island, in the municipality of Saint-Paul, and in the south, in the municipality of Saint-Louis.

3.9. IgG Anti-Dengue Antibodies in Households

In 165/368 households, more than one study subject was tested (range 2 to 7). In 106/165 (64%), at least one subject had positive IgG anti-dengue antibodies. In 45/106 (42%) households, more than 50% of the study subjects living in the household were IgG-positive. In 35/106 (33%), all study subjects included were IgG-positive.

3.10. Risk Factors for Dengue Infection Confirmed by RT-PCR and Parameters Associated with Past Dengue Infection Detected by the Presence of Anti-Dengue IgG

Table 5 lists the explanatory variables that were first cross-analyzed with two outcomes: RT-PCR DENV-positive and IgG anti-dengue-positive. "History of dengue", "smoking", "earthen courtyard floor", "presence of windows with glasses", "presence of rubbish in the surrounding area", and "farm in the surrounding area" showed a significant association with a positive RT-PCR DENV result. The variable "History of dengue" was not introduced in the multivariable model as the significance was due to a recruitment bias since most RT-PCR dengue-positive study subjects knew their diagnosis at the time of their study inclusion. The multivariate logistic regression model identified three explanatory variables significantly associated with the outcome of RT-PCR dengue-positive, which are listed in Table 6 with their adjusted odds ratios. Several variables were associated with the outcome of IgG anti-dengue-positive in the bivariate cross-analysis (Table 5). However, many of them were linked to the "age" of the study subjects. Indeed, when adjusting them in the multivariate logistic regression model, only three variables remained significantly

associated with the outcome (Table 6). The bivariate analysis and the multivariate logistic regression models did not show any socio-demographic criteria (neither activity, nor level of education, nor comorbidity) as risk factors for dengue infections. Only environmental factors, such as the type of housing and the presence of waste in the environment, were risk factors associated with dengue infection.

Table 5. List of explanatory variables cross-analyzed with the outcomes RT-PCR DENV-positive and IgG-positive and the associated *p*-value (Wilcoxon rank sum test; Fisher’s exact test; Pearson’s chi-squared test).

Explanatory Variables	Outcome					
	RT-PCR DENV-Positive			IgG-Positive		
	OR #	95%CI	<i>p</i> -Value	OR #	95%CI	<i>p</i> -Value
Age categories			0.3			>0.9
Sex			>0.9			0.7
Body mass index (BMI) categories			0.3			0.3
Duration of stay home ≥ 20 h a day			0.5	2.78	1.7–4.7	<0.001
Activity: student/in training			0.2	0.3	0.2–0.5	<0.001
History of dengue	28	8.8–144	<0.001	7.5	5–11.5	<0.001
History of chikungunya			0.8	3.7	2.6–5.5	<0.001
Level of education						
Never attended school			0.5	5.2	1.5–23.9	0.015
Primary school			>0.9	2	1.2–3.4	0.005
Secondary school			0.5	1.6	1.1–2.5	0.031
High school			0.13	0.8		0.2
Yellow fever vaccination			0.6			0.11
Smoking	0.09	0.002–0.6	0.001			0.8
Risky drinking [§]			0.6	1.2	0.4–4.2	0.017
Chronic disease			0.11	1.4	1–2	0.04
Chronic medication			0.7	1.5	1.1–2.1	0.017
Sense of severity			0.2			0.7
Sense of risk [¶]			0.5			0.2
Mosquito protection use [‡]			0.8			0.8
Mosquito bites ^α			0.4			0.11
Mosquito presence			0.2			0.074
Season			0.2			0.2
House with courtyard			0.2	4.6	2.4–9.9	<0.001
Type of courtyard			>0.9			0.2–0.9
Surface of courtyard						
100–500 square meters			0.5	1.8	1.2–2.6	0.004
>500 square meters			0.5	2	1.3–3	0.003
Earthen courtyard floor	2.1	1–4.4	0.032	1.8	1.2–2.9	0.009
Presence of grass			0.3	1.5	1–2.1	0.04
Presence of windows with glasses	0.5	0.2–1	0.032	0.5	0.3–0.9	0.007
Presence of air conditioning			0.6	0.6	0.5–1	0.032
Presence of swimming-pool			>0.9	0.3	0.1–0.8	0.007
Presence of stagnant water			0.7			0.6
Presence of animals			0.8	1.9	1–3.4	0.028
Presence of poultry			0.076	2	1.3–3.2	0.001
Presence of rubbish in the courtyard			>0.9			0.12
Presence of rubbish in the surrounding area	1.8	0.9–3.5	0.043	1.8	1.2–2.6	0.002
Orchard in the surrounding area			0.12			0.8

Table 5. Cont.

Explanatory Variables	Outcome					
	RT-PCR DENV-Positive			IgG-Positive		
	OR #	95%CI	p-Value	OR #	95%CI	p-Value
Banana plantation in the surrounding area			>0.9	0	0–0.4	0.002
Sugarcane plantation in the surrounding area			0.4			0.14
Other agriculture in the surrounding area			0.2			0.12
Farm in the surrounding area	5.6	1.5–17.9	0.006			0.051
Seaside			0.6			0.2
Industrial area			>0.9			0.4
Neighborhood of houses			0.8	1.7	1.2–2.6	0.003
Neighborhood of buildings			0.6	0.5	0.3–0.8	0.003

OR: odd ratios are displayed only for explanatory variables that presented a p-value < 0.05. ⁵ A risky drinking is defined as more than two drinks per day. ⁶ The question behind the “sense of risk” variable was the estimated probability (low, high, very high) of contracting the disease in the next five years. ⁷ Feeling like you are frequently bitten by mosquitoes. ⁸ Mosquito-repellent body lotion

Table 6. Significant (*p* < 0.05) adjusted ORs resulting from the multivariate logistic regression models associating the significant explanatory variables from the bivariate cross-analysis to the outcomes RT-PCR DENV-positive and IgG anti-dengue-positive.

Explanatory Variables	aOR	95%CI	p-Value
Outcome: RT-PCR DENV-positive			
Smoking	0.08	0.0–0.4	0.02
Earthen courtyard floor	2.1	1–4.3	0.046
Farm in the surrounding area	5.5	1.6–16.9	0.005
Presence of rubbish in the surrounding area	1.6	0.3–1.12	0.20
Presence of windows with glasses	0.5	0.8–3.1	0.09
Outcome: IgG anti-dengue-positive			
History of chikungunya	2.5	1.6–3.9	<0.001
Type of housing: house with courtyard	5.3	2.2–14	<0.001
Presence of rubbish in the surrounding area	1.6	1.1–2.6	0.04
Duration of stay home ≥ 20 h a day	1.7	0.9–3.3	0.15
Activity: student/in training	0.4	0.1–1.7	0.30
Level of education			0.07
Never attended school	2.2	0.5–15.9	
Primary school	1.6	0.7–3.6	
Secondary school	0.9	0.6–1.8	
High school	0.6	0.3–1.1	
Surface of courtyard			0.26
100–500 square meters	1.02	0.6–1.8	
>500 square meters	1.5	0.8–2.9	
Earthen courtyard floor	1.4	0.8–2.5	0.21
Presence of windows with glasses	1.04	0.6–1.9	0.89
Presence of swimming-pool	0.7	0.3–1.7	0.44
Presence of poultry	0.9	0.5–1.6	0.81
Neighborhood of houses	0.8	0.4–1.3	0.36

4. Discussion

In 2019, the dengue outbreak in La Réunion had more than 18,000 confirmed cases. Among these, 17 were included as index cases for the study, and the study team surveyed a perimeter of 100–200 m around their households or working places looking for identified, undiagnosed, or asymptomatic dengue infections. The findings suggest that a very small proportion of the population presented asymptomatic forms of dengue. Indeed, confirmed dengue cases (PCR or serology) were only detected in 5.3% of the study population during the survey or 3 months prior to the survey, and all were symptomatic cases. These results should be interpreted with caution because our study design allowed us to obtain only part of the picture. We were able to collect data over a short period of time for each cluster, and the inhabitants of the cluster area were only partially represented. Therefore, we may have missed some cases. The value of IgM testing is that it provides a broader picture of dengue circulation. The fact that we found only a maximum of 15% of possible asymptomatic recent dengue infections detected by the presence of anti-dengue IgM supports the idea that asymptomatic cases do not appear to be numerous. Although the re-emergence of dengue in La Réunion is very recent (2016), the rate of IgG anti-dengue positivity, markers of past infections, has already reached 43%. In the literature, the frequency of DENV infections detected around an IC using a geographic cluster design ranges from 4% to 27% [26,31]. With the 5.3% prevalence found in this study, La Réunion is located in the lower part of this range. The prevalence of anti-dengue IgG was high, and 42% of the IgG-positive participants could not recall a past dengue infection. Moreover, the multivariate analysis identified an association between a past infection of chikungunya and the presence of anti-dengue IgG. Some past dengue infections could have been classified as “chikungunya” cases as the latter was well known by the population after the important outbreak of 2005. On the one hand, 30% of participants with no history of dengue infection had IgG-positive results, and on the other hand, 24% of participants with a history of dengue infection did not have any IgG, which is a lifelong marker of past disease. These discordant results reflect the likely memory bias and that dengue clinical presentation is not specific and challenging to confirm without testing.

Because of the four serotypes of dengue, no herd immunity could be expected, mainly as only dengue 1 and dengue 2 have circulated in the whole island, whereas dengue 3 only circulated on the eastern coast, and no dengue 4 serotype was identified yet [17].

We detected only 15 (15%) undiagnosed probable dengue infections, defined as participants who presented a dengue-like syndrome in the 3 months preceding our visit and the presence of IgM but who did not seek health care. La Réunion is a high-income island with very suitable access to health. Universal health care is largely financed by government national health insurance, and people, therefore, easily seek care to obtain medicine or time off work. In fact, we found many confirmed dengue infections that occurred before our visit.

Within cities such as Saint-Pierre, for example, the proportion of IgG across clusters differed widely. This illustrates that the dengue virus seems to circulate most often in the same places and that the geographical range of transmission could be very limited (less than 200 m of radius).

To the best of our knowledge, the usual transmission rate in a household is not known. In our study, 20% of the households visited contained only one inhabitant, and in 44% of the households that contained more than one inhabitant, only one member agreed to be included in the study. Although we were not able to include all members of every household visited, we have data on 27 households containing dengue infections in which more than one participant was included. Only 2 households contained more than one infection, and in 25 households with multiple inclusions, only one household member had a recent dengue infection. These data suggest that the rate of transmission in households is probably not that high.

In the present study, we follow a geographic cluster recruitment design. We needed an initial case to allow us to identify in which neighborhoods it would be worthwhile to

include asymptomatic participants to look for infection. This first case was called an index case because it represented an approximation of dengue circulation in a neighborhood, but in reality, it did not mean that it was the index case of an epidemic. This is well illustrated in Figure 3, where the timeline highlighted that the IC for the study was not the first case in a neighborhood transmission outbreak. Interestingly, this timeline shows that the inclusion period of the study team occurred mostly after the occurrence of a few cases of clustered dengue. Moreover, the discovery of active infections during the inclusion period was rare; only three active infections were detected during the entire study period. This underscores the need for very reactive action to detect circulating cases.

Although none of the demographic nor socio-economic variables studied in our participants were found to be associated with dengue infection, environmental risk factors such as the type of housing or the presence of rubbish in the streets were associated with dengue infections. Considering that dengue is a vector-borne disease, thus transmitted by the bite of a mosquito, it seems reasonable that the environment has an impact on transmission, as observed in our results. As shown in Table 6, the presence of a courtyard, farm, or rubbish in the neighborhood is a predictor of dengue infections. This may be simply because these locations provide ample breeding opportunities for mosquitoes.

Our main result, the proportion of dengue infection found in the clusters, is consistent with previous studies. However, unlike most observational epidemiological studies on dengue, we did not find a large proportion of asymptomatic cases. We can put forward several hypotheses to try to explain this important difference between the proportion of asymptomatic cases generally described in the literature and our results. First, our recruitment method with a single inclusion visit with blood sampling (and a second visit only for IgM-positive cases) provided us only a limited view of the potential viremia of our participants; a design with repeated sampling to look for the presence of the virus would have been more likely to detect cases (but hardly acceptable to the participants). Furthermore, the serology provided a larger vision in time and could have signaled the presence of asymptomatic infections that occurred before our venue. Only 15% of possible recent asymptomatic dengue infections detected thanks to positive anti-dengue IgM were found, which is still far below the expected 50% to 90%. Second, we included only 7% of children, and according to the literature, the main victims of dengue in endemic areas are children. The data to establish a 50–90% asymptomatic rate come mainly from studies in children [36–42]. We can hypothesize here that asymptomatic forms are rarer in non-immune adults. Moreover, on Reunion Island, the re-emergence of dengue is relatively recent (2016), and only two serotypes have been widely circulating on the island. The level of immunity in the population, 43% IgG-positive, should be essentially monotypic. The role of immunity in the clinical presentation of the disease is widely discussed in the literature with no absolute consensus except for secondary infections that may be likely more severe [19]. Finally, the high rate of asymptomatic infections in the literature may rather correspond to undiagnosed infections as in endemic countries, people accustomed to the occurrence of dengue do not necessarily seek care. Moreover, most observational studies on dengue transmission were conducted in low- and middle-income countries where dengue was highly endemic. Our results are interesting as it is one of the first studies on dengue transmission in a high-income country where dengue is emergent. The external validity of our results should be evaluated in countries with similar characteristics of high income, suitable access to health care, and the emergence of the disease.

The implications of these results for public health are that, firstly, as the proportion of asymptomatic dengue infections and undiagnosed infections in La Réunion appears to be low, the data provided by the health authorities are likely a suitable estimation of reality. Second, the same neighborhoods seemed more affected both by a high prevalence of anti-dengue IgG and by active infections, suggesting that known areas of dengue transmission could benefit from targeted prevention actions ahead of the outbreak. Third, the focal nature of dengue in place and time, illustrated by the short time interval between detected infections within clusters, as already described in previous studies, reinforces

the need for very rapid and localized actions. Studied clusters in the same city showed different levels of IgG prevalence; therefore, prevention actions should be considered by neighborhood and not by city. Fourth, the analysis failed to demonstrate any association between dengue infection risk and education level or other demographic characteristics. Only environmental variables were significant, which shows the importance of cleaning work in the neighborhoods in addition to prevention messages. Moreover, the knowledge of the population about dengue is very suitable, as demonstrated in a previous qualitative study [43].

The design of recruitment had several limitations in detecting asymptomatic dengue infections. The proportion of houses within 200 m of the IC from which participants were included in the study was low, less than 50% across all the clusters. Many houses visited were empty during usual working hours. Indeed, the proportion of women and retired people is high in our study population. This reflects a high proportion of non-working women in La Réunion [11]. However, the proportion of workers on the island was 55% in 2019, according to INSEE data [44]. In the present study, the proportion of workers among the adult population reached 39% despite the constraint of recruitment during weekday working hours. In the houses where people were present at the time of our visit, the acceptability was globally suitable, and the local population showed great willingness to participate in the research. However, refusal was common for children as our study procedures included venipuncture. Despite the low proportion of houses included in the study, dengue cases confirmed with RT-PCR were detected in half of the clusters investigated.

According to the study protocol, the interval between the confirmation of the dengue infection and the study visit was meant to be within 15 days. However, due to challenges faced during the field recruitment work, this interval of 15 days was not respected for three index cases and ranged between 30 and 71 days. This increased delay may have reduced our capability to detect dengue infections.

Due to the COVID-19 pandemic that occurred during the recruitment period, we had to restrict the study procedures for safety reasons and were not able to proceed to all of the initially planned second visits for participants who had a positive anti-dengue IgM result. These IgM results had to be interpreted with caution as they could not be correlated to a clinical presentation nor to an IgG seroconversion.

Further research is needed as detecting active asymptomatic dengue infections is a real challenge given the likely short duration of viremia and the very focal duration of dengue outbreaks in neighborhoods. Testing would need to take place much more widely and repeatedly, which may not be acceptable to the participants, especially if they do not suffer from any symptoms. It could be interesting to consider urine testing to detect dengue infection by molecular analysis. This is a non-invasive test and, thus, more acceptable. We demonstrated the possibility of detecting the virus in urine a few days after infection [data not yet published]. Further research will be helpful to complete and refine these results to improve public health policies for dengue control in countries in the Indian Ocean region.

5. Conclusions

The proportions of asymptomatic and undiagnosed dengue infections are very low in La Réunion. Dengue transmission is focal in time and place, and environmental factors arising from human life are the principal risk factors. Public health prevention actions should be highly targeted.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/v15030742/s1>, Table S1: Description and frequency of symptoms declared by the 48 dengue RT-PCR confirmed subjects.

Author Contributions: Conceptualization, O.D.S., E.P., L.M., P.D., L.B., P.M. and A.F.; Data curation, O.D.S., M.-C.J.-B., J.R., C.S., F.L., A.W., S.H. and P.M.; Formal analysis, O.D.S., E.P. and M.-C.J.-B.; Funding acquisition, A.F.; Investigation, O.D.S., M.-C.J.-B., L.M., J.R., C.S., F.L., A.W., A.B.,

L.B., S.H. and P.M.; Methodology, O.D.S., E.P., N.B., M.-C.J.-B., L.M., J.R., P.D., L.B., P.M. and A.F.; Project administration, A.F.; Resources, O.D.S., M.-C.J.-B., L.M., A.B., P.M. and A.F.; Software, O.D.S.; Supervision, L.B. and A.F.; Validation, A.F.; Writing—original draft, O.D.S.; Writing—review and editing, E.P., S.R.I., M.-C.J.-B., F.L., A.W., A.B., P.D. and A.F. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded mainly by the Swiss National Foundation for Scientific Research, grant number 179532. The first author, Olga DE SANTIS, was also funded by the GlobalP3HS program for Global Ph.D. Fellowship in Public Health Sciences, funded by Marie Skłodowska-Curie Actions (Horizon 2020–COFUND). INSERM Reacting contributed to the funding of the research. Part of the blood analyses was funded by the European Regional Development Fund through RUNDENG project number RE0022937.

Institutional Review Board Statement: The study was conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics Committee of Comité de Protection des Personnes of the University Hospital of Saint-Etienne (ID-RCB: 2018-A02357-48, 28 March 2019) and by the Commission cantonale d'éthique de la recherche (CCER) of Geneva (n° 2018-01900, 3 January 2019).

Informed Consent Statement: Written informed consent was obtained from all subjects involved in the study.

Data Availability Statement: Data are available in the YARETA portal of the University of Geneva, <https://yareta.unige.ch/home> (accessed on 5 February 2023), organizational unit: DEMARE.

Acknowledgments: The authors warmly thank all the people who received us in their homes to participate in this research. The authors warmly thank the general medical practitioners of La Réunion for their help in identifying the index cases of dengue. The authors would like to thank the investigators and data managers of the Centre d'Investigation Clinique (CIC-EC 1410) as well as the project leaders, clinical research officers, and administrative staff of the Délégation à La Recherche Clinique et Innovation (DRCI) of the University Hospital of La Réunion, without whose support this study would not have been possible. Thanks also to Christian Lengeler (Swiss TPH, Basel) and Laetitia Huiart (CIC-EC 1410) for initial support and to Laurent Kaiser (Center for Emerging Viral Diseases, University Hospital of Geneva) for his valuable advice on dengue virus and diagnostic methods.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Dengue and Severe Dengue. Available online: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue> (accessed on 24 September 2022).
2. Brady, O.J.; Gething, P.W.; Bhatt, S.; Messina, J.P.; Brownstein, J.S.; Hoen, A.G.; Moyes, C.L.; Farlow, A.W.; Scott, T.W.; Hay, S.I. Refining the Global Spatial Limits of Dengue Virus Transmission by Evidence-Based Consensus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1760. [CrossRef] [PubMed]
3. Dash, A.P.; Bhatia, R.; Sunyoto, T.; Mourya, D.T. Emerging and Re-Emerging Arboviral Diseases in Southeast Asia. *J. Vector Borne Dis.* **2013**, *50*, 77–84. [PubMed]
4. Gubler, D.J. Epidemic Dengue/Dengue Hemorrhagic Fever as a Public Health, Social and Economic Problem in the 21st Century. *Trends Microbiol.* **2002**, *10*, 100–103. [CrossRef] [PubMed]
5. Flahault, A. Emerging infectious diseases: The example of the Indian Ocean chikungunya outbreak (2005–2006). *Bull. Acad. Natl. Méd.* **2007**, *191*, 113–124; discussion 125–128. [PubMed]
6. Bhatt, S.; Gething, P.W.; Brady, O.J.; Messina, J.P.; Farlow, A.W.; Moyes, C.L.; Drake, J.M.; Brownstein, J.S.; Hoen, A.G.; Sankoh, O.; et al. The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature* **2013**, *496*, 504–507. [CrossRef]
7. Stanaway, J.D.; Shepard, D.S.; Undurraga, E.A.; Halasa, Y.A.; Coffeng, L.E.; Brady, O.J.; Hay, S.I.; Bedi, N.; Bensenor, I.M.; Castañeda-Orjuela, C.A.; et al. The Global Burden of Dengue: An Analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect. Dis.* **2016**, *16*, 712–723. [CrossRef]
8. Jaenisch, T.; Junghans, T.; Wills, B.; Brady, O.J.; Eckerle, I.; Farlow, A.; Hay, S.I.; McCall, P.J.; Messina, J.P.; Ofula, V.; et al. Dengue Expansion in Africa—Not Recognized or Not Happening? *Emerg. Infect. Dis.* **2014**, *20*, 717. [CrossRef]
9. Neumayr, A.; Muñoz, J.; Schunk, M.; Bottieau, E.; Cramer, J.; Calleri, G.; López-Vélez, R.; Angheben, A.; Zoller, T.; Visser, L.; et al. Sentinel Surveillance of Imported Dengue via Travellers to Europe 2012 to 2014: TropNet Data from the DengueTools Research Initiative. *Eurosurveillance* **2017**, *22*, 30433. [CrossRef]
10. Amarasinghe, A.; Kuritsky, J.N.; Letson, G.W.; Margolis, H.S. Dengue Virus Infection in Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17*, 1349–1354. [CrossRef]

11. La Réunion—La France et Ses Territoires | Insee. Available online: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/5039941?sommaire=5040030> (accessed on 24 September 2022).
12. Boyer, S.; Foray, C.; Dehecq, J.-S. Spatial and Temporal Heterogeneities of Aedes Albopictus Density in La Reunion Island: Rise and Weakness of Entomological Indices. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e91170. [CrossRef]
13. Kles, V.; Michault, A.; Rodhain, F.; Mevel, F.; Chastel, C. A serological survey regarding Flaviviridae infections on the island of Réunion (1971–1989). *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **1990** *1994*, *87*, 71–76.
14. Michault, A. Insularity and epidemic risks in Réunion. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **1990** *1998*, *91*, 52–55.
15. Zeller, H.G. Dengue, arbovirus and migrations in the Indian Ocean. *Bull. Soc. Pathol. Exot.* **1990** *1998*, *91*, 56–60.
16. DiSera, L.; Sjödin, H.; Rocklöv, J.; Tozan, Y.; Südre, B.; Zeller, H.; Muñoz, Á.G. The Mosquito, the Virus, the Climate: An Unforeseen Réunion in 2018. *GeoHealth* **2020**, *4*, e2020GH000253. [CrossRef] [PubMed]
17. SPF Surveillance de la dengue à La Réunion. Point au 7 décembre 2021. Available online: <https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2021/surveillance-de-la-dengue-a-la-reunion.-point-au-7-decembre-2021> (accessed on 24 September 2022).
18. Renault, P.; Solet, J.-L.; Sissoko, D.; Balleydier, E.; Larrieu, S.; Filleul, L.; Lassalle, C.; Thiria, J.; Rachou, E.; de Valk, H.; et al. A Major Epidemic of Chikungunya Virus Infection on Reunion Island, France, 2005–2006. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2007**, *77*, 727–731. [CrossRef] [PubMed]
19. Grange, L.; Simon-Loriere, E.; Sakuntabhai, A.; Gresh, L.; Paul, R.; Harris, E. Epidemiological Risk Factors Associated with High Global Frequency of Inapparent Dengue Virus Infections. *Front. Immunol.* **2014**, *5*, 280. [CrossRef] [PubMed]
20. Wang, T.; Wang, M.; Shu, B.; Chen, X.; Luo, L.; Wang, J.; Cen, Y.; Anderson, B.D.; Merrill, M.M.; Merrill, H.R.; et al. Evaluation of Inapparent Dengue Infections during an Outbreak in Southern China. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2015**, *9*, e0003677. [CrossRef]
21. Chikaki, E.; Ishikawa, H. A Dengue Transmission Model in Thailand Considering Sequential Infections with All Four Serotypes. *J. Infect. Dev. Ctries.* **2009**, *3*, 711–722. [CrossRef]
22. Dengue—Chapter 4—2020 Yellow Book | Travelers' Health | CDC. Available online: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/yellowbook/2020/travel-related-infectious-diseases/dengue> (accessed on 9 August 2021).
23. WHO | Dengue. Available online: <http://www.who.int/denguecontrol/en/> (accessed on 25 September 2016).
24. Dussart, P.; Baril, L.; Petit, L.; Beniguel, L.; Quang, L.C.; Ly, S.; Azevedo, R.; do, S.S.; Meynard, J.-B.; Vong, S.; et al. Clinical and Virological Study of Dengue Cases and the Members of Their Households: The Multinational DENFRAME Project. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2012**, *6*, e1482. [CrossRef]
25. Ly, S.; Fortas, C.; Duong, V.; Benmarhnia, T.; Sakuntabhai, A.; Paul, R.; Huy, R.; Sorn, S.; Nguon, K.; Chan, S.; et al. Asymptomatic Dengue Virus Infections, Cambodia, 2012–2013. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25*, 1354–1362. [CrossRef]
26. Duong, V.; Lambrechts, L.; Paul, R.E.; Ly, S.; Lay, R.S.; Long, K.C.; Huy, R.; Tarantola, A.; Scott, T.W.; Sakuntabhai, A.; et al. Asymptomatic Humans Transmit Dengue Virus to Mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 14688–14693. [CrossRef] [PubMed]
27. PAHO. *Tool for the Diagnosis and Care of Patients with Suspected Arboviral Diseases*; PAHO: Washington, DC, USA, 2017; ISBN 978-92-75-11936-5.
28. WHO | Dengue Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Available online: <http://www.who.int/rpc/guidelines/9789241547871/en/> (accessed on 4 July 2017).
29. Guzman, M.G.; Gubler, D.J.; Izquierdo, A.; Martinez, E.; Halstead, S.B. Dengue Infection. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2016**, *2*, 1–25. [CrossRef] [PubMed]
30. Chatchen, S.; Sabchareon, A.; Sirivichayakul, C. Serodiagnosis of Asymptomatic Dengue Infection. *Asian Pac. J. Trop. Med.* **2017**, *10*, 11–14. [CrossRef] [PubMed]
31. García, G.; Sierra, B.; Pérez, A.B.; Aguirre, E.; Rosado, I.; Gonzalez, N.; Izquierdo, A.; Pupo, M.; Danay Díaz, D.R.; Sánchez, L.; et al. Asymptomatic Dengue Infection in a Cuban Population Confirms the Protective Role of the RR Variant of the FcγRIIIa Polymorphism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *82*, 1153–1156. [CrossRef]
32. Lacroix, R.; Delatte, H.; Hue, T.; Reiter, P. Dispersal and Survival of Male and Female Aedes Albopictus (Diptera: Culicidae) on Réunion Island. *J. Med. Entomol.* **2009**, *46*, 1117–1124. [CrossRef]
33. Giry, C.; Roquebert, B.; Li-Pat-Yuen, G.; Gasque, P.; Jaffar-Bandjee, M.-C. Simultaneous Detection of Chikungunya Virus, Dengue Virus and Human Pathogenic Leptospira Genomes Using a Multiplex TaqMan® Assay. *BMC Microbiol.* **2017**, *17*, 105. [CrossRef]
34. Légifrance—Publications Officielles—Journal Officiel—JORF N° 0277 Du 30/11/2006. Available online: https://www.legifrance.gouv.fr/download/pdf?id=REqL9dEa6zHzO_9B-g8NfXy_5j9RBhfFzUoFVjb4G4= (accessed on 9 December 2022).
35. Chien, Y.-W.; Liu, Z.-H.; Tseng, F.-C.; Ho, T.-C.; Guo, H.-R.; Ko, N.-Y.; Ko, W.-C.; Perng, G.C. Prolonged Persistence of IgM against Dengue Virus Detected by Commonly Used Commercial Assays. *BMC Infect. Dis.* **2018**, *18*, 156. [CrossRef]
36. Burke, D.S.; Nisalak, A.; Johnson, D.E.; Scott, R.M. A Prospective Study of Dengue Infections in Bangkok. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **1988**, *38*, 172–180. [CrossRef]
37. Pengsaa, K.; Limkittikul, K.; Yoksan, S.; Wisetsing, P.; Sabchareon, A. Dengue Antibody in Thai Children From Maternally Transferred Antibody to Acquired Infection. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **2011**, *30*, 897–900. [CrossRef]
38. Chau, T.N.B.; Hieu, N.T.; Anders, K.L.; Wolbers, M.; Le Bich, L.; Lu Thi Minh, H.; Hien, T.T.; Hung, N.T.; Farrar, J.; Whitehead, S.; et al. Dengue Virus Infections and Maternal Antibody Decay in a Prospective Birth Cohort Study of Vietnamese Infants. *J. Infect. Dis.* **2009**, *200*, 1893–1900. [CrossRef]

39. da Cunha, R.V.; Dias, M.; Nogueira, R.M.; Chagas, N.; Miagostovich, M.P.; Schatzmayr, H.G. Secondary Dengue Infection in Schoolchildren in a Dengue Endemic Area in the State of Rio de Janeiro, Brazil. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* **1995**, *37*, 517–521. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Endy, T.P.; Yoon, I.-K.; Mammen, M.P. Prospective Cohort Studies of Dengue Viral Transmission and Severity of Disease. In *Dengue Virus*; Rothman, A.L., Ed.; Current Topics in Microbiology and Immunology; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, 2010; pp. 1–13. ISBN 978-3-642-02214-2.
41. Balmaseda, A.; Standish, K.; Mercado, J.C.; Matute, J.C.; Tellez, Y.; Saborío, S.; Hammond, S.N.; Nuñez, A.; Avilés, W.; Henn, M.R.; et al. Trends in Patterns of Dengue Transmission over Four Years of a Pediatric Cohort Study in Nicaragua. *J. Infect. Dis.* **2010**, *201*, 5–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Capeding, R.Z.; Brion, J.D.; Caponpon, M.M.; Gibbons, R.V.; Jarman, R.G.; Yoon, I.-K.; Libraty, D.H. The Incidence, Characteristics, and Presentation of Dengue Virus Infections during Infancy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2010**, *82*, 330–336. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Lamaurt, F.; De Santis, O.; Ramis, J.; Schultz, C.; Rivadeneyra, A.; Waelli, M.; Flahault, A. Knowledge, Attitudes, Beliefs, and Practices Regarding Dengue in La Réunion Island, France. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2022**, *19*, 4390. [[CrossRef](#)]
44. Dossier Complet—Département de La Réunion (974) | Insee. Available online: <https://www.insee.fr/fr/statistiques/2011101?geo=DEP-974> (accessed on 9 December 2022).

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

2. Publication 7 : “Genomic insights into early SARS-CoV-2 strains isolated in Reunion Island.”

medRxiv preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2021.01.21.21249623>; this version posted January 26, 2021. The copyright holder for this preprint (which was not certified by peer review) is the author/funder, who has granted medRxiv a license to display the preprint in perpetuity. All rights reserved. No reuse allowed without permission.

1 **Article Summary Line:** The COVID-19 pandemic has had an unprecedented impact on the
2 global community. Here we provide epidemiological and genomic details of the early stages of
3 the pandemic on Reunion Island.

4 **Running Title:** Genomics insight into early SARS-CoV-2 in Reunion Island

5 **Keywords:** SARS-CoV-2, Coronavirus, COVID-19, Genomics, Oxford Nanopore Technologies,
6 Reunion Island

7 **Title:** Genomic insights into early SARS-CoV-2 strains isolated in Reunion Island

8 **Authors:** *David A Wilkinson, Camille Lebarbenchon, Célestine Atyame, Sarah Hafsia, Marie-
9 Christine Jaffar-Bandjee, Luce Yemadje-Menudier, Sébastien Tanaka, Olivier Meilhac, *Patrick
10 Mavingui

11 * Corresponding authors

12 **Affiliations:**

13 Université de La Réunion, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT)
14 INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, Sainte-Clotilde, La Réunion, France. (DA Wilkinson, C
15 Lebarbenchon, C Atyamé, S Hafsia, P Mavingui)

16 Centre Hospitalier Universitaire de la Réunion, Saint-Denis, France (O Meilhac, M-C Jaffar-
17 Bandjee)

18 Santé Publique France, Saint Denis, France (L Yemadje-Menudier)

19 Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Department of Anesthesiology and Critical
20 Care Medicine, Bichat-Claude Bernard Hospital, Paris, France (S Tanaka)

NOTE: This preprint reports new research that has not been certified by peer review and should not be used to guide clinical practice.

21 Réunion Island University, French Institute of Health and Medical Research (INSERM), U1188
22 Diabetes atherothrombosis Réunion Indian Ocean (DéTROI), CYROI Plateform, Saint-Denis de
23 La Réunion, Réunion, France. Réunion Island University-affiliated Hospital, Réunion, France.
24 (O Meilhac, S Tanaka)

25

26 **Abstract**

27 The relative isolation of many island communities provides some protection from the COVID-19
28 pandemic, as imported cases can be limited and traced effectively. Until recently, this was true
29 for the population of the French overseas department, Reunion Island, where only limited
30 numbers of autochthonous cases were observed prior to August 2020. Since the report of the first
31 case of COVID-19, contact tracing has been carried out for each new case identified in Reunion
32 Island to identify transmission and clusters. To contribute to the public health response and
33 understand the diffusion of SARS-Cov-2 strains in Reunion Island, we established in-house
34 genome sequencing capability in Reunion using Oxford nanopore technology (MinION) as an
35 inexpensive option for genomic typing of SARS-CoV-2 lineages on the island, and cross-
36 validated typing results between viral isolation methods and different sequencing technologies.
37 The results of our work during the early phase of the epidemics are presented herein.

38 **Introduction:**

39 Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) was first identified as
40 the causative agent of coronavirus disease 2019 (COVID-19) in China in December 2019 after
41 its emergence from wild animal populations[1]. Since, it has infected more than 45,000,000
42 individuals with 1.2 million deaths worldwide (at the time of writing). Its transmission has been
43 rapid and widespread despite global intervention measures (such as quarantine and travel
44 restrictions) due largely to the fact that viral transmission can occur from asymptomatic
45 individuals and pre-symptomatic individuals[2]. This coupled with its relatively high case
46 fatality rate[3] means that SARS-CoV-2 remains a public health emergency of unprecedented
47 scale.

48 The response to this pandemic has also been of an unprecedented scale. Governments
49 have restructured healthcare systems to accommodate increased testing capacity for improved
50 contact tracing, and genomics has played an important role in improving our understanding of
51 COVID-19 transmission pathways and outbreaks[4,5]. As the number of acquired mutations in
52 the SARS-CoV-2 genome has been relatively low over the course of the pandemic, whole
53 genome sequencing has been essential to allow accurate strain typing, which in turn allows cases
54 to be associated based on genetic similarity of the infecting strains. One study from Australia
55 estimated that the use of genomic typing in conjunction with classical epidemiological tracing
56 improved the case assignment rate by as much as 16%[6]. Next generation sequencing has
57 therefore been of great importance during the SARS-CoV-2 pandemic and emerging
58 technologies such as Oxford Nanopore sequencing have made genomic approaches more
59 accessible: To date, there have been more than 100,000 SARS-CoV-2 genomes deposited in the
60 Global Initiative on Sharing All Influenza Data (GISAID) database[7].

61 Reunion Island is an overseas department of France situated in the Indian Ocean and is
62 largely subject to the same regulations concerning COVID-19-related practices as mainland
63 France and the other French overseas departments. Reunion Island has a population of
64 approximately 850,000 people who live mainly in coastal regions. The population is relatively
65 young, with people 65 years or over representing 8.1 % fewer of the population than in mainland
66 France (2020 institute of national statistics data, www.insee.fr/fr/statistiques). The first case of
67 COVID-19 was reported in Reunion on 11th March 2020, four days before French regulations
68 imposed strict lockdown measures which significantly reduced mobility across the country[8].
69 Prior to this in February, all direct commercial flights between Reunion and China had been
70 suspended. In addition, lockdown measures provided effective protection for the Reunion
71 population, meaning that numbers of cases remained low and were mainly imported as local
72 inhabitants returned from areas of active SARS-CoV-2 circulation. Importantly, during this time
73 most inbound flights were canceled, returning passengers were obliged to undergo a 14-day
74 confinement period upon arrival, and all returning individuals were closely monitored by
75 regional health authorities. Limited local virus circulation occurred in Reunion at this time, with
76 approximately 70 % imported cases and 30 % autochthonous cases (defined as most likely local
77 transmission with no history of travel), with a limited severity [9]. Subsequently, Reunion
78 avoided the first pandemic wave that swept through Europe and placed the European population
79 at the epicenter of the pandemic from March to April 2020. A timeline of reported cases and
80 important events in the epidemiology of COVID-19 on Reunion Island is presented in Figure 1.
81 Here we isolated and provided genomic data of SARS-CoV-2 strains circulating during the early
82 phase of the epidemics on Reunion Island.

83 **Methodology:**

84 **Patients and samples**

85 Nasopharyngeal specimens were recovered either from patients admitted to CHU
86 Reunion or from outpatients, all with laboratory confirmed COVID-19. Before use, we
87 ascertained the presence of viral genomic ARN in each specimen swab by real time RT-qPCR
88 (described below). Samples were handled and stored at -80°C in a biosecurity level three
89 virology laboratory. Consent was obtained from each patient, classified as non-opposition, at the
90 time of entry to the hospital.

91 **RNA Extraction and RT-qPCR**

92 Nucleic acids were extracted using the QIAamp Viral RNA mini kit (QIAGEN, Valencia,
93 California, USA) and eluted in 60 µL of AVE buffer. Reverse transcription was performed on 10
94 µL of RNA using the ProtoScript II Reverse Transcriptase and Random Primer 6 (New England
95 BioLabs, Ipswich, MA, USA) as previously described[10]. cDNAs were tested for the presence
96 of the N and Nsp14 genes using the PCR protocol published by The University of Hong Kong
97 ([https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-](https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols)
98 [table-of-available-protocols](https://www.who.int/publications/m/item/molecular-assays-to-diagnose-covid-19-summary-table-of-available-protocols)). PCR were performed with the QuantiNova Probe RT-PCR Kit
99 (QIAGEN, Valencia, California, USA) and 5 µL of cDNA in a CFX96 Touch™ Real-Time PCR
100 Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA).

101 **Viral isolation and production**

102 SARS-CoV-2 strains were isolated in the African green monkey kidney cell line, Vero
103 E6. Briefly, cells were cultured in a 25 cm² flask containing 5 ml of Eagle medium (MEM:
104 Gibco/Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 5% heat-inactivated fetal bovine
105 serum (FBS), 2 mmol/L L-Glutamine, 1 mmol/L sodium pyruvate, 100 U/mL of penicillin, 100
106 µg/mL of streptomycin and 0.5 µg/mL of Amphotericin B (PAN Biotech, Aidenbach, Germany),
107 at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere. When cell density reached approximately 80%, cells were

108 rinsed once with MEM medium supplemented with 2% FBS, then 50 to 100 µl of SARS-CoV-2-
109 positive swab specimen was mixed with 2 mL MEM 2% FBS and layered on the Vero cell
110 monolayer. After 2 h of incubation the inoculum was removed, cells were rinsed once and 6 mL
111 of fresh MEM 2% FBS medium was added. Flasks were incubated at 37°C in a 5% CO₂
112 atmosphere. Cultured were checked daily. Cell lines demonstrated a cytopathic effect 3 to 5 days
113 post-infection. Supernatants of positive cultures were recovered, centrifuged at 400 X g for 5 min
114 at 4°C, then aliquoted and stored at -80°C until used.

115 For viral production, a total of 100 µl supernatant of positive culture was used to infect a
116 monolayer of Vero cells grown in 75 cm² flask as above. After three days, cytopathic effect was
117 visible and the supernatant was recovered, cleared by centrifugation, aliquoted and stored at -
118 80°C.

119 Viral titration

120 Titration was performed by plaque-forming assay. Vero cells (cultured as above) were
121 seeded in 6-well culture plates. Tenfold dilutions of SARS-CoV-2 solution were made in MEM
122 2% FBS culture medium and 500 µl of each dilution was added to the cells in duplicate. After an
123 incubation of 2 h at 37°C under a 5% CO₂ atmosphere, unabsorbed viral particles were removed
124 and 2 ml of culture medium supplemented with 0,8% carboxymethylcellulose (CMC; Sigma-
125 Aldrich, Saint-Quentin-Fallavier, France) was added to each well and incubation was extended
126 for 5 days. The CMC overlay was carefully removed, and the cells were fixed with 2 mL of 3.7
127 % paraformaldehyde in PBS. The plates were incubated at 37°C for 20 min. The cells were then
128 rinsed once with PBS and stained with 0.5% crystal violet in 20% ethanol. Plaques were visually
129 counted and expressed as plaque-forming units per mL (PFU/mL).

130 Nanopore (MinION) Sequencing and Analysis:

131 Genomes were sequenced from viruses originally infecting four independent patients.

132 Two samples (RUN-PIMIT1 and RUN-PIMIT2) were from couple of travelers returning from

133 France mainland. Sample RUN-PIMIT8 was obtained from a tourist originating from Greece

134 whereas sample RUN-PIMIT20 was quoted as real autochthonous case with unidentified contact

135 with an imported case. We combined different sequencing technologies to cross-validate the

136 sequences generated by different protocols. We also re-sequenced the same isolates from

137 different passage histories to examine whether cell-line isolation may result in the accumulation

138 of mutations.

139 In total, ten SARS-COV2 genomes were sequenced on a single Oxford Nanopore

140 Technologies FLO-MIN106D (R9.4.1) flowcell using the Artic Network's overlapping amplicon

141 protocol[11,12]. Following first-strand cDNA synthesis (as above), all sample preparation

142 methods followed the nCoV-2019 sequencing protocol version 2

143 (<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.bdp7i5rn>). Briefly, genomic material was amplified in

144 two independent PCR reactions using version 3 primer pools obtained from of the Artic network

145 website (<https://github.com/artic-network/artic-ncov2019>). PCR products were pooled, dA-tailed

146 using the NEBNext® Ultra™ II End Repair/dA-Tailing Module then barcoded using the

147 Nanopore Native Barcoding Expansion kit (EXP-NBD104). Barcoded amplicons were then

148 purified using a 0.4x volume of AMPure-XP SPRI beads, washing the beads with an excess

149 volume of Nanopore's small fragment buffer (SFB) to ensure that un-ligated barcode molecules

150 were removed. Purified amplicons were then pooled in equimolar proportions before adapter

151 ligation and sequencing.

152 The sequencing run was left for 24 hours and stopped when predicted coverage exceeded
153 1000-fold for each genome. Basecalling and demultiplexing were performed using guppy
154 (v4.0.11). Basecalling used default parameters in accurate mode, and demultiplexing was
155 performed using the "--require_barcodes_both_ends" parameter to minimize sample crosstalk.
156 Reads were then assembled using Medaka v1.0.3 (<https://nanoporetech.github.io/medaka/>) as
157 part of the Artic network bioinformatics standard operating procedure
158 (<https://artic.network/ncov-2019/ncov2019-bioinformatics-sop.html>), subsampling amplicon
159 coverage to 400x and using genome accession MN908947.3 for read mapping. Geneious
160 v9.1.8[13] was used to inspect and curate mapped sequence data. Consensus base-calling
161 required a minimum of 30-fold coverage.

162 **Illumina Sequencing and Analysis:**

163 Four of the SARS-CoV-2 samples (2 isolates and 2 swabs) that were sequenced using the
164 ONT amplicon protocol were additionally sequenced using an Illumina shotgun method from
165 unamplified cDNA in order to complete genomic loci that were poorly amplified by the tiling
166 PCR and to allow cross validation of the ONT sequencing methodology against the Illumina gold
167 standard.

168 Briefly, sequencing libraries were generated from 10 ng of cDNA using the Celero™
169 PCR Workflow with Enzymatic fragmentation (DNA-Seq) following the manufacturer's
170 instructions. Sequencing was performed on the MiSeq platform, with 1 * 170 bp single end
171 reads. Demultiplexed sequences were provided by the sequencing company (Biofidal, Lyon,
172 France). Sequences were quality trimmed and adapters removed using Trimmomatic v0.39.
173 Trimmed reads were mapped to reference sequence MN908947.3 using minimap2 v.2.17-

174 r941[14]. Geneious v9.1.8[13] was used to inspect and curate mapped sequence data and
175 consensus sequences.

176 Genome typing:

177 Assembled genomes were assigned to global major lineages using pangolin v.2.0.5[15] to
178 compare to the pangoLEARN database (version from 20th July 2020), default parameters were
179 used for quality control filtering and probability scores for lineage calling.

180 Results and Discussion:

181 MinION sequencing generated complete genomic data sets for six of the eight sequenced
182 isolates and for one swab out of two (Table 1). The remaining three samples (two isolates and
183 one swab) demonstrated high Ct values when detecting viral cDNA by qPCR, suggesting that the
184 concentrations of virus in these samples were low. PCR amplification was not uniform in these
185 samples and genomic assemblies had short gaps where 30-fold coverage was not achieved. The
186 primers used in the tiling protocol are unable to target the 3' and 5' extremities of the virus, and
187 therefore all assemblies were missing 54 bases from the 5' extremity and 67 bases from the 3'
188 extremity.

189 Illumina shotgun sequencing produced near-complete genome assemblies for four of the
190 samples (two isolates and two swabs), again only excluding 5' and 3' extremities of the genome,
191 which had limited coverage that varied between isolates. By combining Illumina and MinION
192 data mapped to the same reference strain we were able to improve the genomic assemblies for
193 these four genome sequences. Furthermore, in genomic regions that were successfully sequenced
194 by both approaches, no disagreements were observed in consensus sequences generated by
195 MinION and Illumina sequencing. However, MinION assemblies had a slightly higher
196 proportion of ambiguous base calls.

197 Sequencing data are summarized in Table 1.

198 Resequencing of isolated passage variants produced identical sequence variants to the
199 parental strain in each instance (Table 2), suggesting that the process of viral isolation and
200 passaging (in this case in Vero E6 cells) does not select for mutant variants.

201 Typing assigned all genomes to pangolin lineage B.1, either belonging to GISAID
202 lineage G, or GH (Table 2) which (along with lineage GR) are the prevailing lineages circulating
203 globally at the time of writing [16]. Phylogenetic analysis identified three different sequence
204 variants, which differed from each other by a maximum of seven mutations (Figure 2).

205 Conclusion:

206 Our findings provide support that MinION sequencing can be successfully applied for
207 rapid sequencing and generation of genomic data in remote locations, such as on Reunion Island.
208 Paired comparison with genomes obtained with Illumina sequencing further highlight that the
209 quality of the generated sequences can be used confidently in molecular epidemiology and
210 phylodynamic studies.

211 Additionally, we observed that viral isolation, limited passaging and production in Vero
212 E6 cell lines were not associated with the selection of mutations that could bias genomic typing
213 results. This is important due to the strong genetic similarity between prevailing SARS-CoV-2
214 lineages and because cell-line based viral amplification is a useful method for extracting
215 increased quantities of viral material when direct sequencing of swabs with low viral loads may
216 provide incomplete genomic data.

217 At the time of writing, Reunion Island is facing its first wave of COVID-19 infection,
218 with more than 400 cases of COVID-19 reported weekly[17]. As has been demonstrated

219 elsewhere, genomic data can be used to significantly improve the case assignment rate and
220 contact tracing measures that help to mitigate future disease[6]. Phylodynamic investigations
221 based on these data can also inform the timing and origin of viral introduction, as well as their
222 local transmission dynamics and epidemiological characteristics. Thus, the capacity to perform
223 in-house, rapid and comparatively cheap genomic typing of SARS-CoV-2 isolates will hopefully
224 play an important role in improving Reunion Island's response to the COVID-19 pandemic.
225 These analyses are intended to continue on a larger local scale in Reunion Island in order to
226 understand the circulation of SARS-CoV-2 during the current, largely autochthonous, COVID-
227 19 epidemic wave.

228 **Acknowledgments**

229 This research was funded by Université de La Réunion (COVID-19 emergency seed funding).

230 **Conflicts of interest:**

231 Authors declare no conflicts of interest.

232 **References**

- 233 1. Zhou P, Yang X Lou, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W, et al. A pneumonia outbreak
234 associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020.
235 doi:10.1038/s41586-020-2012-7
- 236 2. Mizumoto K, Kagaya K, Zarebski A, Chowell G. Estimating the asymptomatic proportion
237 of coronavirus disease 2019 (COVID-19) cases on board the Diamond Princess cruise
238 ship, Yokohama, Japan, 2020. *Eurosurveillance*. 2020. doi:10.2807/1560-
239 7917.ES.2020.25.10.2000180
- 240 3. Verity R, Okell LC, Dorigatti I, Winskill P, Whittaker C, Imai N, et al. Estimates of the
241 severity of coronavirus disease 2019: a model-based analysis. *Lancet Infect Dis*. 2020.
242 doi:10.1016/S1473-3099(20)30243-7
- 243 4. Geoghegan JL, Ren X, Storey M, Hadfield J, Jelley L, Jefferies S, et al. Genomic
244 epidemiology reveals transmission patterns and dynamics of SARS-CoV-2 in Aotearoa
245 New Zealand. *medRxiv*. 2020. doi:10.1101/2020.08.05.20168930
- 246 5. Candido DS, Claro IM, de Jesus JG, Souza WM, Moreira FRR, Dellicour S, et al.
247 Evolution and epidemic spread of SARS-CoV-2 in Brazil. *Science* (80-). 2020.
248 doi:10.1126/science.abd2161

- 249 6. Rockett RJ, Arnott A, Lam C, Sadsad R, Timms V, Gray KA, et al. Revealing COVID-19
250 transmission in Australia by SARS-CoV-2 genome sequencing and agent-based modeling.
251 Nat Med. 2020. doi:10.1038/s41591-020-1000-7
- 252 7. Shu Y, McCauley J. GISAID: Global initiative on sharing all influenza data – from vision
253 to reality. Eurosurveillance. 2017. doi:10.2807/1560-7917.ES.2017.22.13.30494
- 254 8. Ruktanonchai NW, Floyd JR, Lai S, Ruktanonchai CW, Sadilek A, Rente-Lourenco P, et
255 al. Assessing the impact of coordinated COVID-19 exit strategies across Europe. Science
256 (80-). 2020. doi:10.1126/science.abc5096
- 257 9. COVID-19□: point épidémiologique à la Réunion du 13 août 2020. [cited 6 Nov 2020].
258 Available: [https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-](https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2020/covid-19-point-epidemiologique-a-la-reunion-du-13-aout-2020)
259 [regional/2020/covid-19-point-epidemiologique-a-la-reunion-du-13-aout-2020](https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2020/covid-19-point-epidemiologique-a-la-reunion-du-13-aout-2020)
- 260 10. Lebarbenchon C, Ramasindrazana B, Joffrin L, Bos S, Lagadec E, Le Minter G, et al.
261 Astroviruses in bats, Madagascar. Emerg Microbes Infect. 2017;6: e58.
262 doi:10.1038/emi.2017.47
- 263 11. Quick J, Grubaugh ND, Pullan ST, Claro IM, Smith AD, Gangavarapu K, et al. Multiplex
264 PCR method for MinION and Illumina sequencing of Zika and other virus genomes
265 directly from clinical samples. Nat Protoc. 2017. doi:10.1038/nprot.2017.066
- 266 12. Grubaugh ND, Gangavarapu K, Quick J, Matteson NL, De Jesus JG, Main BJ, et al. An
267 amplicon-based sequencing framework for accurately measuring intrahost virus diversity
268 using PrimalSeq and iVar. Genome Biol. 2019. doi:10.1186/s13059-018-1618-7
- 269 13. Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung M, Sturrock S, et al. Geneious

- 270 Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and
271 analysis of sequence data. *Bioinformatics*. 2012. doi:10.1093/bioinformatics/bts199
- 272 14. Li H. Minimap2: Pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics*. 2018.
273 doi:10.1093/bioinformatics/bty191
- 274 15. Rambaut A, Holmes EC, O’Toole Á, Hill V, McCrone JT, Ruis C, et al. A dynamic
275 nomenclature proposal for SARS-CoV-2 lineages to assist genomic epidemiology. *Nat*
276 *Microbiol*. 2020. doi:10.1038/s41564-020-0770-5
- 277 16. Mercatelli D, Giorgi FM. Geographic and Genomic Distribution of SARS-CoV-2
278 Mutations. *Front Microbiol*. 2020;11: 1800. doi:10.3389/fmicb.2020.01800
- 279 17. COVID-19□: point épidémiologique à la Réunion du 29 octobre 2020. [cited 6 Nov
280 2020]. Available: [https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-](https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2020/covid-19-point-epidemiologique-a-la-reunion-du-29-octobre-2020)
281 [indien/documents/bulletin-regional/2020/covid-19-point-epidemiologique-a-la-reunion-](https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2020/covid-19-point-epidemiologique-a-la-reunion-du-29-octobre-2020)
282 [du-29-octobre-2020](https://www.santepubliquefrance.fr/regions/ocean-indien/documents/bulletin-regional/2020/covid-19-point-epidemiologique-a-la-reunion-du-29-octobre-2020)
- 283 18. Year-letter Genetic Clade Naming for SARS-CoV-2 on Nextstrain.org. [cited 11 Sep
284 2020]. Available: <https://nextstrain.org/blog/2020-06-02-SARSCoV2-clade-naming>

285

286 Address for correspondence:

287 Dr David A Wilkinson, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT)

288 INSERM 1187, CNRS 9192, IRD 249, 2 Rue Maxime Rivière, Sainte-Clotilde, La Réunion,

289 France. Email : david.wilkinson@univ-reunion.fr

290 Dr Patrick Mavingui, UMR Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical (PIMIT) INSERM

291 1187, CNRS 9192, IRD 249, 2 Rue Maxime Rivière, Sainte-Clotilde, La Réunion, France.

292 Email : patrick.mavingui@cnrs.fr

293 Table 1. Genome sequencing details

ID	Swab (S) or Culture (C)	Isolation/ Passage Details*	MinION, amplicon tiling				Illumina				Combined		
			Complete	Missing	Ambiguities	Coverage**	Complete	Missing	Ambiguities	Coverage	Complete ?	Missing	Ambiguities
hCoV-19/Réunion/RUN-PIMIT20	C	Vero E6	No	1.7 %	1	407x	Yes*	2.1 %	0	1500x	Yes*	0.1 %	
hCoV-19/Réunion/RUN-PIMIT1	S	NA	Yes*	0.4 %	0	435x	Yes*	2.1 %	0	3250x	Yes*	0.1 %	
hCoV-19/Réunion/RUN-PIMIT2	S	NA	No	1.5 %	1	356x	Yes*	2.4 %	0	675x	Yes*	0.2 %	
hCoV-19/Réunion/RUN-PIMIT8	C	Vero E6	Yes*	0.4 %	0	413x	Yes*	0.1 %	0	1700x	Yes*	0.1 %	
RUN-PIMIT1c	C	RUN-PIMIT1a, passage 1	Yes*	0.4 %	0	385x	-	-	-	-	-	-	
RUN-PIMIT1d	C	RUN-PIMIT1c, passage 2	Yes*	0.4 %	0	423x	-	-	-	-	-	-	
RUN-PIMIT1a	C	RUN-PIMIT1, Vero E6	No	1.4 %	0	336x	-	-	-	-	-	-	
RUN-PIMIT1b	C	RUN-PIMIT1, Vero E6	Yes*	0.4 %	0	404x	-	-	-	-	-	-	
RUN-PIMIT2a	C	RUN-PIMIT2, Vero E6	Yes*	0.4 %	0	394x	-	-	-	-	-	-	
RUN-PIMIT20a	C	RUN-PIMIT20, Vero E6	Yes*	0.4 %	0	407x	-	-	-	-	-	-	

* Genomes are regarded as complete if <2.5 % of the genome is missing from the 3' and 5' ends of the genome. Any genome containing consecutive ambiguities outside of the 3' and 5' regions is considered as incomplete.
** MinION coverage is calculated by mapping in Medaka after subsampling sequence coverage to a maximum of 400x per primer pair. Overlapping regions increase average coverage.
*** Genomic sequences were considered as identical if no polymorphisms were present. Base calls in Illumina data versus ambiguous calls in MinION data are not considered to be contradictory (unless the ambiguity is the base call in the Illumina sequence).
+ For cultured isolates, cell lines are indicated. For isolates that are resequenced from previous passages, corresponding parental strain is indicated.

294 Table 2. Lineage typing data of different isolates.

ID	Pangolin lineage	GISAID lineage	Year/Letter lineage*	Isolate history	Mutations from parent strain
hCoV-19/Réunion/RUN-PIMIT1	B.1	G	20A	Swab	NA
RUN-PIMIT1a	B.1	G	20A	1 st generation isolate	0
RUN-PIMIT1b	B.1	G	20A	1 st generation isolate	0
RUN-PIMIT1c	B.1	G	20A	2 nd generation passage	0
RUN-PIMIT1d	B.1	G	20A	3 rd generation passage	0
hCoV-19/Réunion/RUN-PIMIT2	B.1	G	20A	Swab	NA
RUN-PIMIT2a	B.1	G	20A	1 st generation isolate	0
hCoV-19/Réunion/RUN-PIMIT8	B.1	GH	20C	1 st generation isolate	NA
hCoV-19/Réunion/RUN-PIMIT20	B.1	G	20A	1 st generation isolate	NA
RUN-PIMIT20a	B.1	G	20A	2 nd generation passage	0

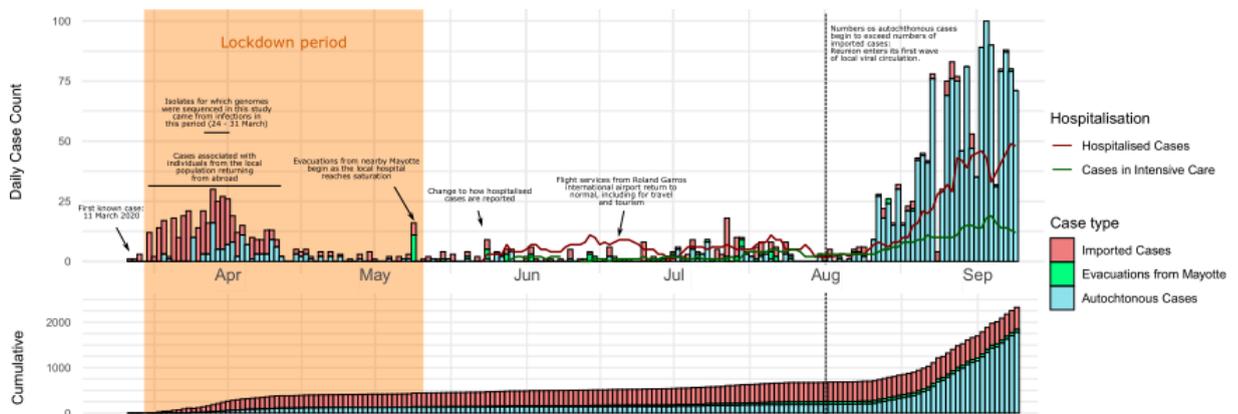
*Year/Letter lineage as defined by Hodcroft et al.[18]

Reserved space. Do not place any text in this section. Include the mandatory author checklist or your manuscript will be returned. Use *continuous* line numbering in your manuscript.

295 Figure 1: Epidemiological timeline of COVID-19 cases in Reunion Island corresponding to the
296 first six months since the first identified cases (11th March 2020 – 11 September 2020).

297 Figure 2: Phylogenetic tree and pairwise mutation number between genomes of SARS-CoV-2
298 from independent cases in La Reunion.

299



3. Publication 8 : “Genetic diversity of endosymbiotic bacteria *Wolbachia* infecting two mosquito species of the genus *Eretmapodites* occurring in sympatry in the Comoros archipelago.”



OPEN ACCESS

EDITED BY
Sampath Kumar,
Tata Institute for Genetics and Society, India

REVIEWED BY
Arunachalam Ramaiah,
Georgia Department of Public Health,
United States
Marina S. Ascunce,
Agricultural Research Service (USDA),
United States

*CORRESPONDENCE
Célestine Atyame
✉ celestine.atyame-nten@univ-reunion.fr
Patrick Mavingui
✉ Patrick.MAVINGUI@cnrs.fr

¹These authors have contributed equally to this work and share first authorship

RECEIVED 24 November 2023
ACCEPTED 11 March 2024
PUBLISHED 27 March 2024

CITATION
Gomard Y, Hafsia S, Lebon C, Rabarison P, Idaroussi A-b, Yssouf A, Boussès P, Mavingui P and Atyame C (2024) Genetic diversity of endosymbiotic bacteria *Wolbachia* infecting two mosquito species of the genus *Eretmapodites* occurring in sympatry in the Comoros archipelago.
Front. Microbiol. 15:1343917.
doi: 10.3389/fmicb.2024.1343917

COPYRIGHT
© 2024 Gomard, Hafsia, Lebon, Rabarison, Idaroussi, Yssouf, Boussès, Mavingui and Atyame. This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License \(CC BY\)](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/). 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.

Genetic diversity of endosymbiotic bacteria *Wolbachia* infecting two mosquito species of the genus *Eretmapodites* occurring in sympatry in the Comoros archipelago

Yann Gomard^{1†}, Sarah Hafsia^{1†}, Cyrille Lebon¹, Patrick Rabarison², Ambdoul-bar Idaroussi², Amina Yssouf³, Philippe Boussès⁴, Patrick Mavingui^{1*} and Célestine Atyame^{1*}

¹Université de La Réunion, UMR PIMIT (Processus Infectieux en Milieu Insulaire Tropical) CNRS 9192, INSERM 1187, IRD 249, Saint-Denis, île de La Réunion, France, ²Service de lutte antivectorielle, ARS Mayotte, Kawéni, France, ³National Malaria Control Program, Moroni, Comoros, ⁴UMR MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs: Écologie, Génétique, Évolution et Contrôle), IRD, CNRS, Université de Montpellier, Montpellier, France

Introduction: The influence of *Wolbachia* on mosquito reproduction and vector competence has led to renewed interest in studying the genetic diversity of these bacteria and the phenotypes they induced in mosquito vectors. In this study, we focused on two species of *Eretmapodites*, namely *Eretmapodites quinquevittatus* and *Eretmapodites subsimplicipes*, from three islands in the Comoros archipelago (in the Southwestern Indian Ocean).

Methods: Using the *COI* gene, we examined the mitochondrial genetic diversity of 879 *Eretmapodites* individuals from 54 sites. Additionally, we investigated the presence and genetic diversity of *Wolbachia* using the *wsp* marker and the diversity of five housekeeping genes commonly used for genotyping through Multiple Locus Sequence Typing (MLST).

Results and discussion: Overall, *Er. quinquevittatus* was the most abundant species in the three surveyed islands and both mosquito species occurred in sympatry in most of the investigated sites. We detected a higher mitochondrial genetic diversity in *Er. quinquevittatus* with 35 reported haplotypes ($N = 615$ specimens, $Hd = 0.481$ and $\pi = 0.002$) while 13 haplotypes were found in *Er. subsimplicipes* ($N = 205$ specimens, $Hd = 0.338$ and $\pi = 0.001$), this difference is likely due to the bias in sampling size between the two species. We report for the first time the presence of *Wolbachia* in these two *Eretmapodites* species. The prevalence of *Wolbachia* infection varied significantly between species, with a low prevalence recorded in *Er. quinquevittatus* (0.8%, $N = 5/627$) while infection was close to fixation in *Er. subsimplicipes* (87.7%, $N = 221/252$). Both male and female individuals of the two mosquito species appeared to be infected. The analysis of MLST genes revealed the presence of two *Wolbachia* strains corresponding to two new strain types (STs) within the supergroups A and B, which have been named wEretA and wEretB. These strains were found as mono-infections and are closely related, phylogenetically, to *Wolbachia* strains previously reported in *Drosophila* species.

Finally, we demonstrate that maternal transmission of *Wolbachia* is imperfect in *Er. subsimplicipes*, which could explain the presence of a minority of uninfected individuals in the field.

KEYWORDS

Wolbachia, *Eretmapodites quinquevittatus*, *Eretmapodites subsimplicipes*, mitochondrial genetic diversity, Comoros archipelago

Introduction

Endosymbiotic bacteria are of increasing interest due to their impact on the biology of arthropods. Some of these bacteria are known to be essential for the evolution of their hosts enabling them to adapt to new ecological niches (Douglas, 1998). Other bacteria provide selective advantages depending on the ecological contexts by providing for example protection against predators (Tsuchida et al., 2010) or pathogens (Oliver et al., 2003; Scarborough et al., 2005; Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008; Jaenike et al., 2010). In addition to these positive effects, endosymbiotic bacteria are also selfish elements that can manipulate the reproduction of their hosts to increase their own fitness (Duron et al., 2008). This is the case for the bacteria *Wolbachia* which are associated with various reproductive manipulation phenotypes in arthropods (Werren et al., 2008).

Wolbachia are maternally inherited alpha-proteobacteria commonly found in arthropods and filarial nematodes (Werren et al., 2008). These bacteria are estimated to be present in up to 66% of insect species (Hilgenboecker et al., 2008; Zug and Hammerstein, 2012; Weinert et al., 2015), thus probably representing the most abundant endosymbiont described to date. *Wolbachia* exhibit high genetic diversity and have been classified into 17 phylogenetic groups or supergroups (A to Q) (Baldo et al., 2006; Paraskevopoulos et al., 2006; Bordenstein et al., 2009; Ros et al., 2009; Glowska et al., 2015). The widespread distribution of *Wolbachia* is primarily attributed to their impact on the reproductive biology of their hosts. In arthropods, *Wolbachia* manipulate host reproduction by biasing the sex ratio toward females (the transmitting sex), or by causing sterility through a phenomenon known as cytoplasmic incompatibility (CI) (Werren et al., 2008). Cytoplasmic incompatibility results from sperm-egg incompatibility occurring when *Wolbachia*-infected males mate with either uninfected females or females infected with an incompatible *Wolbachia* strain, resulting in high embryonic mortality reaching up to 100% in certain mosquito species (Laven, 1951; Werren et al., 2008; Atyame et al., 2014). This phenotype is commonly observed in arthropods (Shropshire et al., 2020; Turelli et al., 2022) including in mosquito vectors (Sicard et al., 2019).

Aside from the manipulation of reproduction, *Wolbachia* can also impact the vector competence of mosquitoes, which refers to their ability to become infected with and transmit a pathogen. *Wolbachia* have shown to provide protection against major mosquito-borne pathogens like Dengue virus (DENV), Chikungunya virus (CHIKV) or *Plasmodium* infections (Moreira et al., 2009; Bian et al., 2010, 2013; Hoffmann et al., 2011; Walker et al., 2011; Aliota et al., 2016; Dutra et al., 2016).

However, *Wolbachia* can also be linked to increased pathogen transmission in some cases (Hughes et al., 2012; Dodson et al., 2014; Zélé et al., 2014). Because of *Wolbachia*'s influence on both mosquito reproduction and vector competence, these bacteria are increasingly seen as promising tools for mosquito and mosquito-borne diseases control (Bourtzis et al., 2014). In recent years, there has a growing number of studies focusing on the genetic diversity of *Wolbachia* and their associated phenotypes in mosquito vectors (Sicard et al., 2019). *Wolbachia* have been well studied in various medically importance mosquito species of such as *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus* (Duron et al., 2005; Atyame et al., 2011, 2014; Dumas et al., 2013), *Aedes albopictus* (Kambhampati et al., 1993; Armbruster et al., 2003; Tortosa et al., 2010; Zouache et al., 2011), as well as more recently in *Anopheles* species (Baldini et al., 2014; Ayala et al., 2019) and *Aedes aegypti* (Coon et al., 2016; Thongsripong et al., 2018). However, there have been limited studies on the presence of *Wolbachia* in mosquitoes of the *Eretmapodites* genus (Tokash-Peters et al., 2022; Osuna et al., 2023), despite their role in the arbovirus transmission (arthropod-borne viruses) (Bamou et al., 2021; Cêtre-Sossah et al., 2023).

Mosquitoes from the *Eretmapodites* genus (Theobald, 1901) (subfamily: Culicinae; tribe: Aedini) are exclusively Afrotropical species occurring in continental Africa (Harbach, 2007), Madagascar (Tantely et al., 2016), and in the islands of the Comoros archipelago (composed of four volcanic islands: Grande Comore, Mohéli, Anjouan and Mayotte) within the Southwestern Indian Ocean (Le Goff et al., 2014; Boussès et al., 2018). A total of 51 *Eretmapodites* species have been described so far (<https://mosquito-taxonomic-inventory>, accessed in November 2023) (Harbach, 2013), most (32 species) from Cameroon (Bamou et al., 2021), while only four species are known in Madagascar (Tantely et al., 2016), and two species are reported in the Comoros archipelago (Le Goff et al., 2014; Boussès et al., 2018). *Eretmapodites* species are mostly found in forested areas but some species are also adapted to rural and peri-urban environments (Le Goff et al., 2014; Boussès et al., 2018; Bamou et al., 2021). Along with their aggressive daytime biting behavior, these mosquitoes are known to bite both animals and humans (Musa et al., 2020); as a result they have the potential to serve as bridge vectors of pathogens between animals and humans. Different arboviruses such as Rift Valley fever virus (RVFV), Semliki Forest virus (SFV), or CHIKV have been detected and/or isolated from *Eretmapodites* mosquitoes [review in Bamou et al. (2021)]. In addition, some studies have described the ability of *Eretmapodites* mosquitoes to transmit arboviruses under laboratory conditions. For example, Bauer (1928) showed that *Eretmapodites chrysogaster* is able to transmit the Yellow Fever virus (YFV). The study of McIntosh

and coworkers (McIntosh et al., 1980) demonstrated the ability of *Eretmapodites quinquevittatus* to transmit the RVFV. Likewise, it has been recently shown that *Eretmapodites subsimplicipes* is a competent vector for the transmission of RVFV (Cêtre-Sossah et al., 2023). Despite the medical interest of *Eretmapodites* species, the biology, ecology and genetics of these mosquitoes remain poorly investigated.

In this study we focused on two *Eretmapodites* species, namely *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes*, from three islands in the Comoros archipelago: Grande Comore, Mohéli and Mayotte. We used molecular identification to determine the abundance of each mosquito species on the surveyed islands. Then, we examined the presence of *Wolbachia* in both *Eretmapodites* species through the presence/absence of the *Wolbachia* surface protein gene *wsp* (Braig et al., 1998). The genetic diversity of the detected *Wolbachia* was further characterized by sequencing the *wsp* gene and the five housekeeping genes developed for the *Wolbachia* typing (MLST) (Baldo et al., 2006). Finally, we examined the vertical transmission of *Wolbachia* in a laboratory colony of *Er. subsimplicipes*. The role of *Wolbachia* in the evolution of *Eretmapodites* species is discussed.

Materials and methods

Mosquito sampling

Adult *Eretmapodites* specimens were collected in 2019 (March to May and November to December) from 54 natural breeding sites on three islands of the Comoros archipelago (in the Southwestern Indian Ocean): Grande Comore (18 sites), Mohéli (eight sites), and Mayotte (28 sites) (Figure 1; Supplementary Table 1). Larvae were also collected in the site Bambo Est on Mayotte in March 2019 and March 2022 to establish a laboratory colony for testing vertical transmission of *Wolbachia* (see below). Adult mosquitoes were captured using portable electric aspirators (BioQuip InsectaVac aspirator, Bioquip, CA). Collected adults were introduced in cages (16 × 16 × 16 cm) and brought to the laboratory where they were sorted by sex and individually stored in 1.5 ml tubes at −80°C (for samples from Mayotte) or in 70% ethanol (for samples from Grande Comore and Mohéli) until morphological identification and molecular analyses.

Mosquito identification

The larvae and adults of *Eretmapodites* from the Bambo Est site (Mayotte) and collected in March 2019 and March 2022 were identified morphologically using taxonomic keys (Edwards, 1941; Hopkins, 1952; Service, 1990). The larvae of *Er. quinquevittatus* have a characteristic thick, heavily chitinized 3-VIII seta and, in adults, the scutum is decorated with five parallel bands of dark scales on a yellow-brown background. The larvae of *Er. subsimplicipes* are easily distinguished from those of *Er. quinquevittatus* by lateral setae of abdominal segments I-VI inserted on a sclerotized conical tubercle and, in adults, a more homogeneous scutum devoid of such dark bands. Molecular identification of species was realized on larvae and all collected adult specimens through PCR amplification and sequencing of

a 658 bp fragment of the mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 encoding gene (*COI*) (Folmer et al., 1994) (primers listed in Supplementary Table 2). DNA extraction, PCR, and sequencing were performed as described below.

Wolbachia genotyping

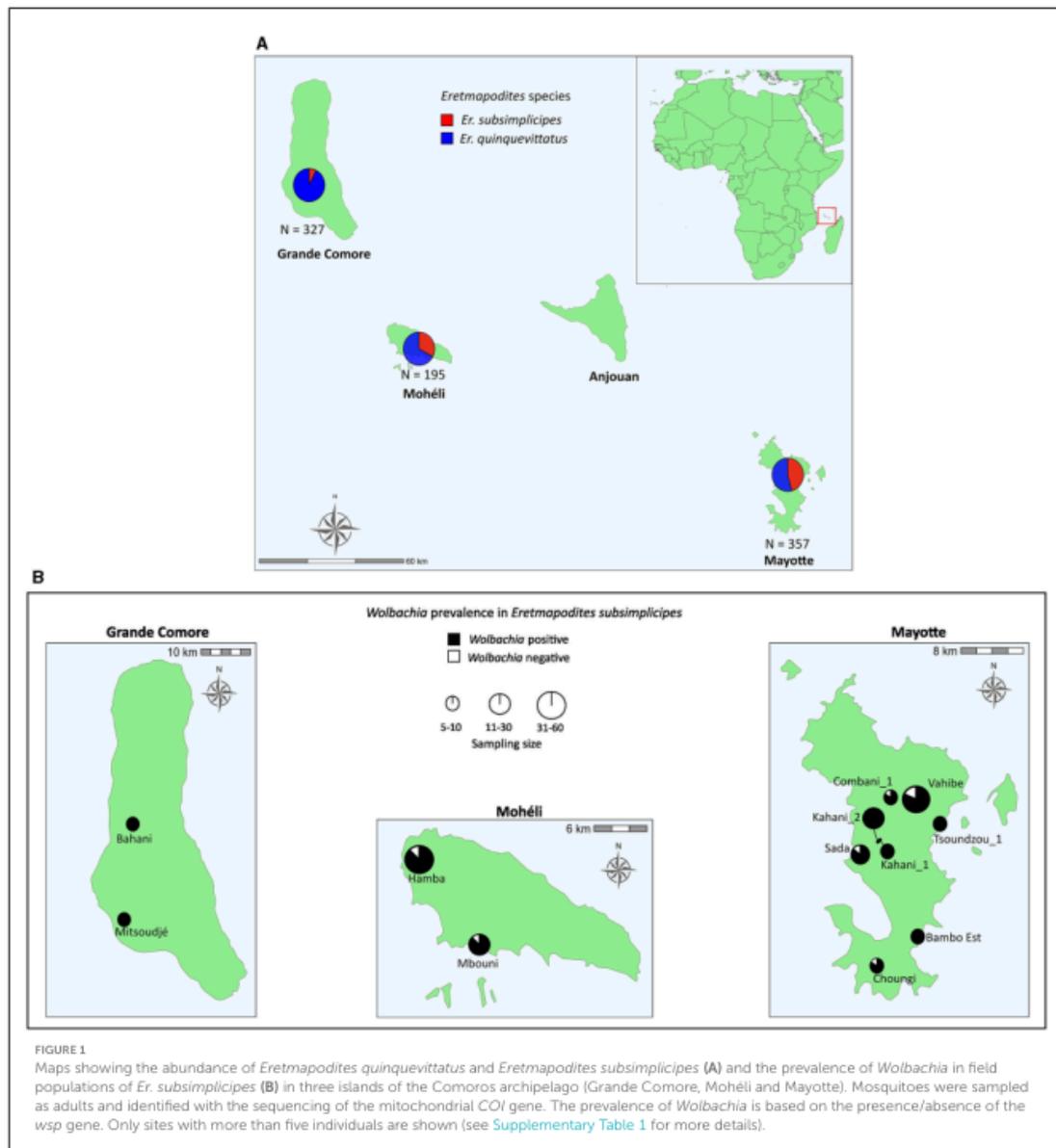
Wolbachia detection was performed in all sampled adults using PCR targeting the surface protein gene *wsp* (Braig et al., 1998) (Supplementary Table 2) which is more variable than the slowly evolving 16S rRNA gene (Zhou et al., 1998). For *wsp*-positive samples, *Wolbachia* were genotyped by sequencing the *wsp* gene and the five MLST loci: *coxA*, *fbpA*, *ftsZ*, *gatB* and *hcpA* (Baldo et al., 2006) (Supplementary Table 2). For all individuals in which *Wolbachia* DNA could not be amplified, the quality of the DNA template was checked by the amplification of the *COI* gene.

PCR amplification and sequencing

DNA was extracted from individual mosquitoes using the QIAcube HT robotic workstation and the associated QIAcube Pathogen 96 QIAcube HT Kit (Qiagen) following manufacturer's recommendations, eluted with 100 µl AVE buffer (Qiagen) and eventually stored at −20°C until molecular investigations. PCRs were performed with 0.5 ng of genomic DNA in a 25 µl final volume reaction containing 8.5 µl of water, 12.5 µl of GoTaq® G2 HotStart Green Master Mix (Promega), and 1 µl of each primer (10 µM) (Supplementary Table 2). All PCR programs included an initial denaturation step at 95°C for 5 min, followed by 36 cycles (30 cycles for the *COI* gene) at 94°C for 30 s, 52°C–59°C for 60 s and 72°C for 90 s, and a final elongation step at 72°C for 7 min. Amplified DNA fragments were ran on 1.5% agarose gel electrophoresis stained with 1X GelRed™ (Biotium Inc.) and visualized under ultraviolet light. PCR products were Sanger sequenced on both strands (Genoscreen, Lille, France). Only unique generated sequences were submitted to GenBank under the following accession numbers: OR282837-OR282884, OR296528-OR296530, OR296531-OR296533, OR296534-OR296536, OR296537-OR296539, OR296540-OR296543, and OR296544-OR296547 for *COI*, *coxA*, *fbpA*, *ftsZ*, *gatB*, *hcpA*, and *wsp*, respectively.

Sequences

All sequences were visually inspected and manually edited using Geneious Prime v.2022.2.2 (Kearse et al., 2012). For the *COI* gene, comparisons with public sequences were performed using basic local alignment search tool (BLAST) (www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST, accessed on 28 July 2023) from GenBank. The mitochondrial haplotype diversity (*Hd*) and nucleotide diversity (π) were calculated in the software DnaSP v6.12.03 (Rozas et al., 2017). For *Wolbachia* genes, the generated



sequences were compared with data available in the *Wolbachia* MLST database (<https://pubmlst.org/organisms/wolbachia-spp>, accessed on 03 August 2023) (Jolley et al., 2018). For each MLST gene, a new allele was considered if there was at least one nucleotide difference with alleles already present in the pubMLST database. Thereafter, the combination of alleles allowed identifying the Sequence Types (STs) among those existing or to propose new STs.

Phylogenetic analysis

Phylogenetic relationships were evaluated for *Eretmapodites COI* and *Wolbachia* genes. Only unique mitochondrial haplotypes and bacterial alleles were included in the analyses. For *Wolbachia*, phylogenetic analyses were conducted for each of the six sequenced genes and on all five MLST concatenated genes (*coxA*, *fbpA*, *ftsZ*, *gatB*, and *hcpA*, in this order). The phylogenies were constructed

with data from Baldo et al. (2006). For each data set, the best-fitting model of sequence evolution was determined using jModelTest v.2.1.4 (Darriba et al., 2012). Then, phylogenetic constructions were performed using MrBayes v.3.2.3 (Ronquist et al., 2012). For each phylogeny, the analysis corresponded to two independent runs of four incrementally heated Metropolis Coupled Markov Chain Monte Carlo (MCMCMC) starting from a random tree. The MCMCMC was run for 10 million generations with trees and associated model parameters sampled every 100 generations. The convergence level was assessed with an average standard deviation of split frequencies inferior to 0.05. The 10% initial trees for each run were discarded as burn-in and the phylogeny along with posterior probabilities were obtained from the remaining trees. The resulting Bayesian phylogeny trees were visualized and annotated with FigTree v.1.4.2 (Rambaut, 2014).

Vertical transmission of *Wolbachia*

Since only the *Er. subsimplicipes* species could be reared from larvae collected in the Bambo Est site (Mayotte) in March 2019, we used it to examine the vertical transmission of *Wolbachia*. Field larvae (F_0 generation) were brought to the laboratory and kept alive in the insectary where they were identified morphologically and maintained under standard rearing conditions (27°C and 80% relative humidity with a 12h:12h photoperiod). Larvae were supplied every 2 days with yeast tablets and adults were fed with 10% sucrose solution. To get eggs and ensure the maintenance of mosquitoes, females were blood-fed using a Hemotek feeding system (Hemotek Limited, GreatHarwood, UK) with defibrinated cow blood. The eggs of the next generation (F_1 generation) were collected and reared to adulthood. The amplification process was performed over four generations (F_4 generation) to increase the number of females for the experiment. Then, the vertical transmission of *Wolbachia* was assessed using females and males from the established laboratory colony. Females of the F_4 generation were allowed to mate in the laboratory with males from the same colony. After mating, the females were blood-fed and individually isolated to lay eggs. Then, the presence of *Wolbachia* was tested for each female by PCR using the *wsp* gene as described above. The offsprings from each *Wolbachia*-infected female were kept alive until adulthood and males and females were screened for the presence of *Wolbachia*.

Results

Eretmapodites quinquevittatus is more abundant than *Eretmapodites subsimplicipes*

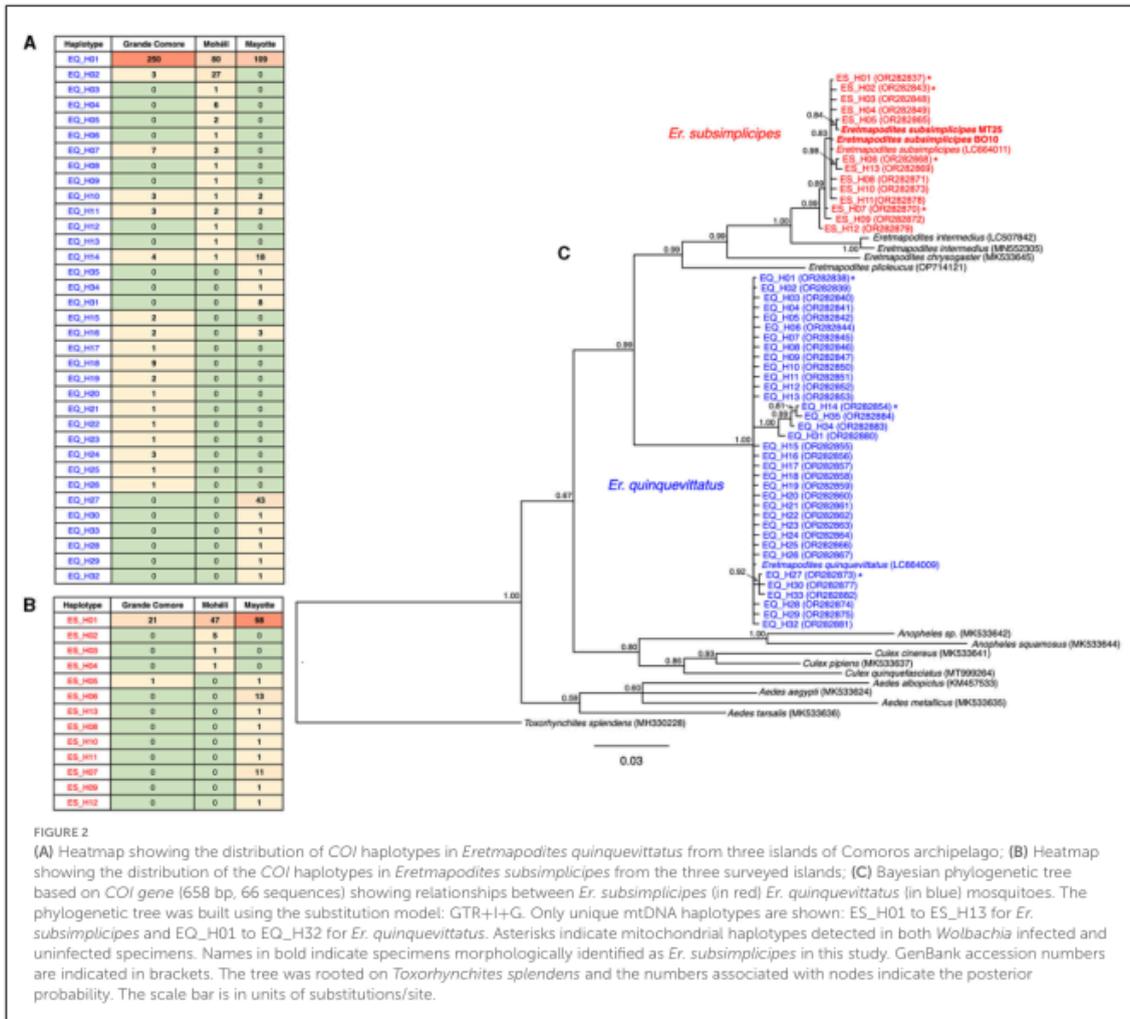
Larvae and adults collected in the site Bambo Est (Mayotte) in March 2019 and March 2022 were morphologically identified as *Er. subsimplicipes*. *COI* sequencing of these morphologically identified specimens showed a closed match with the published sequence of *Er. subsimplicipes* from Mozambique (GenBank accession number: LC664011, 99.8%–100.0% percentage of identity based on 633 bp), thus confirming the identification of our specimens. We

then sequenced a total of 879 mosquitoes (655 females and 224 males) from Grande Comore ($N = 327$), Mohéli ($N = 195$), and Mayotte ($N = 357$). The comparison of the obtained *COI* sequences with the GenBank database indicated the presence of two *Eretmapodites* species: *Er. quinquevittatus* (GenBank accession number: LC664009, 98.4%–100.0% percentage of identity based on 629 bp) and *Er. subsimplicipes* (GenBank accession number: LC664011, 99.7%–100.0% percentage of identity based on 633 bp). Among the sequences, 71.3% ($N = 627/879$) and 28.7% ($N = 252/879$) belonged to *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes*, respectively (Supplementary Tables 1, 3). *Eretmapodites quinquevittatus* appeared more common than *Er. subsimplicipes* in all three investigated islands (Figure 1A). Both *Eretmapodites* species were found in sympatry in 31 out of 54 sampled sites (seven sites in Grande Comore, seven sites in Mohéli and 17 sites in Mayotte), while *Er. quinquevittatus* was found alone in 22 sites (11 sites in Grande Comore, one site in Mohéli and ten sites in Mayotte) and *Er. subsimplicipes* alone at one site (Bambo Est) on Mayotte (Supplementary Table 1).

Higher mtDNA polymorphism in *Er. quinquevittatus*

Among the 627 *Er. quinquevittatus* specimens, *COI* sequences with good qualities (i.e., 658 bp with no ambiguities) were obtained for 615 samples leading to 35 haplotypes (Figure 2A; Supplementary Table 4). Pairwise nucleotide identity between the haplotypes ranged from 98.2% to 99.9%. The overall haplotype diversity (Hd) and nucleotide diversity (π) values were 0.481 and 0.002, respectively. The most frequent haplotype [EQ_H01, found in 71.4% of sequences ($N = 439/615$)] was also the most widespread in all three islands (Figure 2A; Supplementary Table 4). The second most frequent haplotype (EQ_H27, scored in 43 specimens) was geographically restricted to Mayotte (Supplementary Table 4). Of the 35 haplotypes, four haplotypes were shared by all three islands (EQ_H01, EQ_H10, EQ_H11, and EQ_H14), two haplotypes (EQ_H02 and EQ_H07) were shared by Grande Comore and Mohéli, one haplotype (EQ_H16) was common to Grande Comore and Mayotte, and no common haplotype was detected between Mohéli and Mayotte (Supplementary Table 4). On Grande Comore, 18 haplotypes were found whereas the number of haplotypes was similar between Mohéli and Mayotte (14 haplotypes on each island). A total of 11, eight and nine haplotypes were unique on Grande Comore, Mohéli and Mayotte, respectively (Figure 2A; Supplementary Table 4).

COI good quality sequences were obtained for 205 of the 252 *Er. subsimplicipes* samples leading to 13 haplotypes (Figure 2B; Supplementary Table 5). Pairwise nucleotide identity between the haplotypes yielded values ranging from 99.4 to 99.9%. The overall Hd and π values were 0.338 and 0.001, respectively. The haplotype ES_H01 was the most frequently observed in the dataset, with 80.9% of specimens ($N = 166/205$) and the only one common to all three islands (Figure 2B; Supplementary Table 5). The number of haplotypes was higher in Mayotte (ten haplotypes), followed by Mohéli (four haplotypes),



while the lowest diversity was observed in Grande Comore (two haplotypes). Unique haplotypes were only found in Mayotte (eight haplotypes) and Mohéli (three haplotypes) (Figure 2B; Supplementary Table 5).

We assessed phylogenetic relationships between the two *Eretmapodites* species by incorporating the *COI* haplotypes identified in the present study and those of other mosquito species retrieved from GenBank including sequences of *Eretmapodites* mosquitoes: *Er. quinquevittatus* (GenBank: LC664009), *Er. subsimplicipes* (GenBank: LC664011), *Eretmapodites intermedius* (GenBank: LC507842 and MN552305), *Eretmapodites chrysogaster* (GenBank: MK533645), and *Eretmapodites plioleucus* (GenBank: OP714121). The phylogenetic tree revealed that *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes* formed two well-supported clades (Figure 2C). Although higher haplotype diversity was found in *Er. quinquevittatus*, the genetic cluster formed by *Er. subsimplicipes* appears slightly more diverged than that of *Er. quinquevittatus*.

Lower prevalence of *Wolbachia* in *Er. quinquevittatus* than in *Er. subsimplicipes*

The 879 *Eretmapodites* mosquitoes were screened for *Wolbachia* infection based on the detection of the *wsp* gene by PCR. The overall prevalence of *Wolbachia* was 25.7% ($N = 226/879$), with a significant lower prevalence detected in *Er. quinquevittatus* (0.8%, $N = 5/627$) as compared to *Er. subsimplicipes* (87.7%, $N = 221/252$) (Table 1) (Fisher's exact test, $P < 0.001$). *Wolbachia* infections were detected in both males and females of both mosquito species (Table 1). In *Er. quinquevittatus*, two out of the five *Wolbachia* infected mosquitoes were females and three were males. In contrast, the majority of the *Wolbachia* infected *Er. subsimplicipes* mosquitoes were females, with 201 females and 3 males out of a total of 221 infected mosquitoes. For *Er. quinquevittatus*, the bacterial infection prevalence between sites ranged from 0.0% to 7.7% with the five *Wolbachia*-infected specimens detected from five

TABLE 1 Prevalence of *Wolbachia* in *Eretmapodites quinquevittatus* and *Eretmapodites subsimplicipes* in three islands of the Comoros archipelago, based on presence/absence of the *wsp* gene and according to the sex of mosquitoes.

Island	Sex	N	<i>Eretmapodites quinquevittatus</i>	<i>Eretmapodites subsimplicipes</i>
			Prevalence of <i>Wolbachia</i> in %	Prevalence of <i>Wolbachia</i> in %
Grande Comore	All	327	0.7 (2/303)	97.1 (22/24)
	Females	209	0.5 (1/188)	90.5 (19/21)
	Males	118	0.9 (1/115)	100.0 (3/3)
Mohéli	All	195	0.8 (1/131)	85.9 (55/64)
	Females	126	0.0 (0/62)	85.9 (55/64)
	Males	69	1.4 (1/69)	-
Mayotte	All	357	1.0 (2/193)	87.8 (144/164)
	Females	320	0.6 (1/156)	87.8 (144/164)
	Males	37	2.7 (1/37)	-
Total	All	879	0.8 (5/627)	87.7 (221/252)
	Females	655	0.5 (2/406)	87.6 (218/249)
	Males	224	1.4 (3/221)	100.0 (3/3)

N = total number of mosquitoes examined.

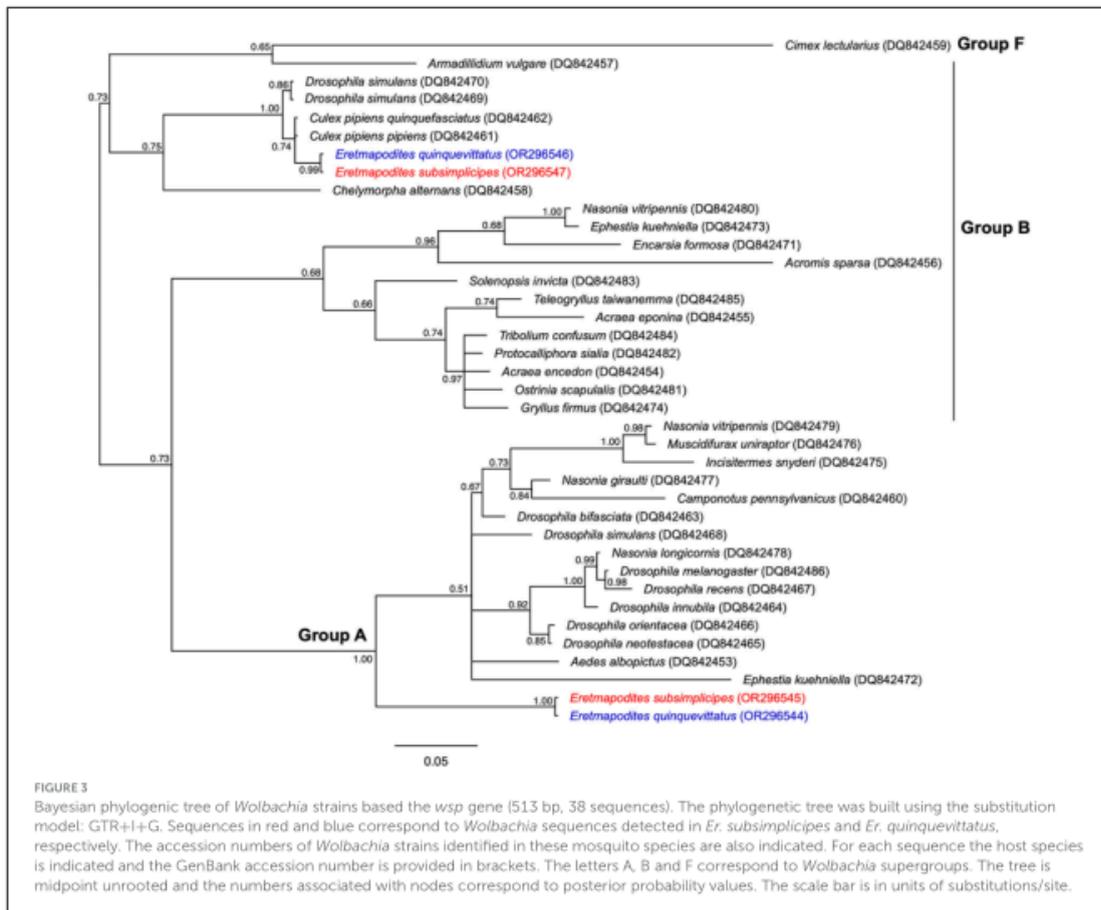
sites: two sites in Grande Comore, one site in Mohéli and two sites in Mayotte (Supplementary Table 1). For *Er. subsimplicipes*, *Wolbachia*-positive specimens were detected in all but one site (the Iconi site on Grande Comore, N = 32 sites with *Er. subsimplicipes* specimens) and infection prevalence ranged from 50.0% to 100.0% including in sites with a large number of samples (Figure 1B; Supplementary Table 1). For both mosquito species, *Wolbachia* infection prevalence did not significantly vary according to the sampled islands (Fisher's exact tests, all $P > 0.7$) (Supplementary Table 1).

Two *Wolbachia* A and B supergroups occurred in *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes*

The sequencing of the *wsp* gene in *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes* revealed the presence of two *Wolbachia* supergroups A and B in each *Eretmapodites* species (Figure 3). For *Er. quinquevittatus*, three samples out of the five *Wolbachia*-infected were successfully sequenced and one sample belonged to supergroup A while two samples belonged to supergroup B (Figure 3; Supplementary Table 3). Concerning *Er. subsimplicipes*, the sequencing of the *wsp* gene was successful for 218 out of the 221 samples. Almost all of these samples (N = 217/218) belonged to supergroup A and one sample to supergroup B. When comparing the 218 *wsp* sequences of supergroup A (217 sequences for *Er. subsimplicipes* and one sequence for *Er. quinquevittatus*), no polymorphism was noted, a unique *wsp* allele shared by the two mosquito species was observed (Figure 3; Supplementary Table 3). The analysis of the three *wsp* sequences from supergroup B (two sequences for *Er. quinquevittatus* and one sequence for *Er.*

subsimplicipes) also revealed one *wsp* allele shared by both *Eretmapodites* species.

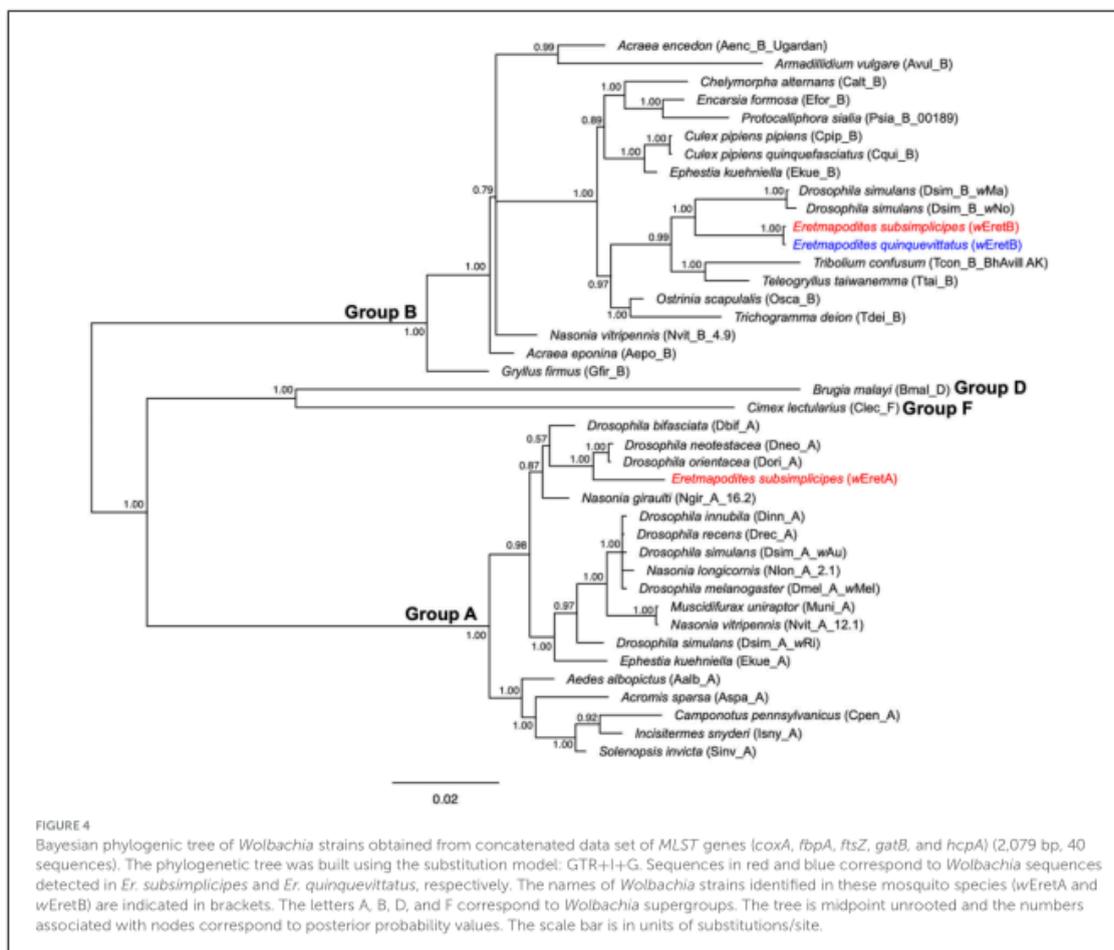
As the *wsp* gene alone is not relevant for a reliable genotyping of *Wolbachia* strains due to recombination in *Wolbachia* genomes (Jiggins et al., 2001; Bordenstein and Wernegreen, 2004; Baldo et al., 2006; Atyame et al., 2011), we sequenced the five *Wolbachia* MLST genes *coxA*, *fbpA*, *ftsZ*, *gatB* and *hcpA*. The sequences of the five MLST genes were not obtained systematically for each of the 226 *Wolbachia*-infected *Eretmapodites* mosquitoes. Indeed, PCR amplifications have failed for some genes (particularly *fbpA*) in certain samples, possibly due to mutations in the targeted primers sites. Additionally, since we used universal degenerated primers (Baldo et al., 2006), it may have been possible to improve our protocols to increase amplification success for *Eretmapodites*. Ultimately, we obtained 214 sequences for *coxA*, 114 sequences for *fbpA*, 210 sequences for *gatB*, 177 sequences for *hcpA* and 214 sequences for *ftsZ*. We confirmed the presence of *Wolbachia* strains belonging to supergroups A and B with each of the five MLST genes (Supplementary Figures 1–5; Supplementary Table 3). We found two alleles for four of the five genes (*coxA*, *fbpA*, *ftsZ* and *gatB*), one allele belonging to supergroup A and the other one to supergroup B (Supplementary Figures 1–4; Supplementary Table 3). The most polymorphic locus was *hcpA* with three alleles, two alleles for supergroup A and one allele for supergroup B (Supplementary Figure 5; Supplementary Table 3). The two *hcpA* alleles falling in the supergroup A were genetically close, with 99.8% pairwise identity based on 476 bp. Our data do not support co-infection by *Wolbachia* strains from supergroups A and B. None of the five MLST genes could be amplified in the single *Er. quinquevittatus* sample infected with a *Wolbachia* strain from supergroup A. Therefore, using the MLST genes, we detected supergroup A only in *Er. subsimplicipes* and supergroup B in both *Er. subsimplicipes* and *Er. quinquevittatus* (Supplementary Figures 1–5; Supplementary Table 3). As observed



with the *wsp* gene, all MLST alleles were shared by the two mosquito species within supergroup B (Supplementary Figures 1–5).

Comparison of allelic polymorphism with pubMLST database revealed that within the supergroup A, alleles identified in the present study for *coxA*, *fbpA*, *ftsZ*, and *hcpA* are new with the exception of the *gatB* allele matching with allele #49 (Supplementary Table 6). The *coxA* allele showed a close match with allele #173, the *fbpA* allele with allele #60, the *ftsZ* allele with allele #52, and the two *hcpA* alleles were genetically closely related to allele #11 (Supplementary Table 6). The combination of the five alleles resulted in a new *Wolbachia* strain type, which we named “wEretA.” For supergroup B, all observed alleles for the five MLST genes are already present in the pubMLST database. Indeed, *coxA*, *fbpA*, *ftsZ*, *gatB*, and *hcpA* alleles matched with alleles #281, #453, #244, #283, and #309, respectively (Supplementary Table 6). However, no *Wolbachia* strain type was assigned to the combination of these five alleles in the pubMLST database. Hence, we considered this *Wolbachia* strain type as new and named it “wEretB.” The MLST allelic profiles of wEretA and wEretB appeared genetically different from those of a *Wolbachia* strain previously described in the species *Eretmapodites*

chrysogaster from Cameroon for which *coxA* matched with #275, *ftsZ* matched with #106, and *fbpA* matched with #6 (Osuna et al., 2023). Using complete MLST profiles obtained for 84 mosquitoes (83 *Er. subsimplicipes* and one *Er. quinquevittatus*), we performed a phylogenetic analysis based on the 2,079 bp concatenated sequences of the five MLST genes. It appears that *Wolbachia* strains wEretA (infecting *Er. subsimplicipes*) and wEretB (infecting both *Er. subsimplicipes* and *Er. quinquevittatus*) form two robust monophyletic clades within A and B supergroups, respectively (Figure 4). wEretA is genetically closely related to wDori and wDneo infecting *Drosophila orientacea* and *Drosophila neotestacea*, respectively (Figure 4). wEretB is closely related to wMa infecting *Drosophila simulans* (Figure 4). In summary, MLST data revealed that (i) wEretA is restricted to *Er. subsimplicipes* (83 complete MLST allelic profiles) and (ii) wEretB infects both *Er. subsimplicipes* and *Er. quinquevittatus* (1 complete MLST allelic profile each) (Figure 4; Supplementary Table 3). Finally, we examined the evolution of the diversity of *Wolbachia* in their hosts by comparing the concatenated MLST phylogeny and the *COI* phylogeny from different host species including in *Er. subsimplicipes* and *Er. quinquevittatus*. No congruence



between *Wolbachia* and *COI* phylogenies was shown (Figure 5), demonstrating that *Wolbachia* mainly use horizontal transfers to spread in their hosts.

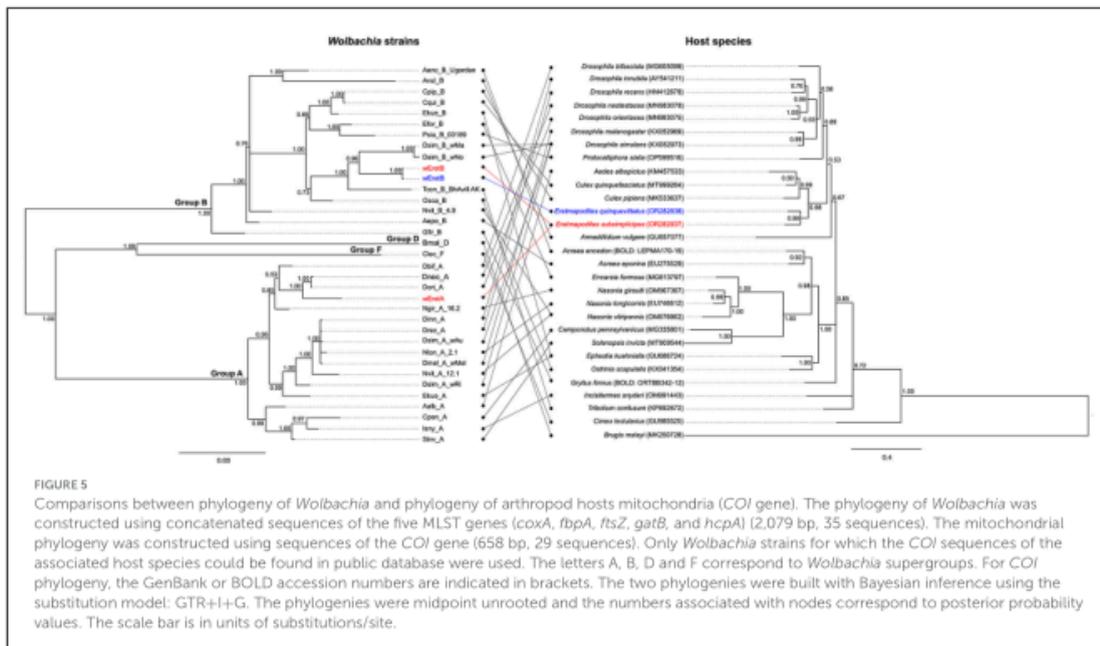
Wolbachia is maternally inherited in *Er. subsimplicipes*

To assess maternal transmission of *Wolbachia* in *Eretmapodites* mosquitoes, we focused on the species *Er. subsimplicipes* as it is the only species for which we currently have a laboratory colony. We examined the progeny of 30 wEretA infected laboratory females (see above) based on the sequencing of the *wsp* gene. In general, the number of eggs per female ranging from 4 to 61 (mean number of 32 eggs per female) (Table 2). The hatching rate of the eggs ranged from 5% to 100%, with a mean rate of 74%. It seems that the number of adults produced by each female is limited, as the mean rates for eggs becoming larvae and larvae reaching the adult stage are only 15% and 26%, respectively (Table 2). A total of 131 offspring (74 males and 57 females) from the 30 investigated females were then

screened for the presence of *Wolbachia*. Sixty per cent ($N = 78/131$) were found infected (Table 2), leading to a maternal transmission of *Wolbachia* ranging from 0% to 100%. Among the 30 females, four females did not transmit *Wolbachia* to their offspring, the transmission of *Wolbachia* was imperfect (between 6% and 88%) for ten females while perfect maternal transmission of *Wolbachia* (100%) was recorded for 16 females (Table 2).

Discussion

Using morphological and molecular methods, we confirmed the presence of two *Eretmapodites* species, *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes*, in three islands of the Comoros archipelago (Grande Comore, Mohéli and Mayotte) (Le Goff et al., 2014; Boussès et al., 2018). The two species occurred in sympatry in the majority of investigated sites but *Er. quinquevittatus* was most commonly found in the three islands. The higher abundance of *Er. quinquevittatus* observed in this study may be due to sampling biases related to the type of samples collected and the method used for collection. In contrast to a previous study



conducted between 2008 and 2012 in Mayotte, which found *Er. subsimplicipes* to be the most frequently encountered mosquito species on the island (Le Goff et al., 2014), our observations were based on adult mosquitoes. The difference between our findings and the previous study could be attributed to the fact that larvae were sampled in the study of Le Goff et al. (2014), whereas we focused on adult collection. It is possible that breeding sites of *Er. quinquevittatus* are less accessible compared to those of *Er. subsimplicipes*, which could result in sampling bias when working with adults that have the ability to fly far away from their breeding sites. However, it is also plausible that the distribution area of *Er. quinquevittatus* in Mayotte has increased over the last past 10 years. Additionally, the sampling method used in our study, which involved portable electric aspirators to collect resting adult mosquitoes in vegetation and flying adults around manipulators, may have better suited the collection of *Er. quinquevittatus* adults compared to *Er. subsimplicipes*. Since the biology and ecology of both species in the field are not well understood, it is possible that this methodological difference influenced our findings. It would be interesting in future investigations to compare the distribution area of both *Eretmapodites* species in Mayotte, but also in the other islands of the Comoros archipelago, using both larval and adult sampling.

The mtDNA polymorphism based on the *COI* gene revealed 13 and 35 haplotypes in *Er. subsimplicipes* and *Er. quinquevittatus*, respectively. In both species, we found unique haplotypes (i.e., encountered in only one island), suggesting different colonization events probably from Madagascar or the east coast of Africa, regions geographically close to the Comoros archipelago and where both *Eretmapodites* species have been also identified

(Harbach, 2007; Tantely et al., 2016). Other mtDNA haplotypes were shared by different islands and could be the result of a single colonization event of *Eretmapodites* mosquitoes (from Madagascar or Africa) either to different islands, or to one island followed by a secondary dispersion event in a stepping stone mode. Such dispersion from a nearby island can be facilitated by frequent trade between the islands of the Comoros archipelago (Roger et al., 2014). For example, it is well known that the spread of the Asian tiger mosquito *Ae. albopictus* worldwide has been facilitated by the international trade of used tires (Reiter and Sprenger, 1987).

The mitochondrial haplotype diversity was higher in *Er. quinquevittatus* (35 haplotypes, $Hd = 0.481$ and $\pi = 0.002$, for $N = 615$ samples) than in *Er. subsimplicipes* (13 haplotypes, $Hd = 0.338$ and $\pi = 0.001$, for $N = 205$ samples). The difference between the two species can be explained by the sampling sizes as we found more *Er. quinquevittatus* specimens in our dataset. Alternatively, a higher mtDNA diversity in *Er. quinquevittatus* could result from a low prevalence of *Wolbachia* infection. Indeed, mitochondria and *Wolbachia* are in linkage disequilibrium, both cytoplasmic elements being linked through maternal cotransmission within egg cytoplasm's (Rasgon et al., 2006; Atyame et al., 2011; Dumas et al., 2013). Therefore, the spread of *Wolbachia* in host populations should result in an indirect selective sweep of the mtDNA leading to a reduction of mitochondrial diversity in *Wolbachia* infected host populations (Rasgon et al., 2006; Atyame et al., 2011; Dumas et al., 2013). In this study, we detected *Wolbachia* for the first time in both *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes*, the lowest *Wolbachia* prevalence occurring in *Er. quinquevittatus* (0.8% vs. 87.7% in *Er. subsimplicipes*).

TABLE 2 Maternal transmission of *Wolbachia* in *Eretmapodites subsimplicipes*.

Female	N eggs	N larvae	% egg hatching	% emergence	% egg reaching to adult	Adult progeny						% maternal transmission
						Number of adults			<i>Wolbachia</i> positive samples			
						Total	♂	♀	Total	♂	♀	
Eret_01	16	16	100%	25%	25%	4	3	1	3	2	1	75%
Eret_02	18	7	39%	43%	17%	3	1	2	2	1	1	67%
Eret_03	21	9	43%	11%	5%	1	1	0	1	1	0	100%
Eret_04	22	20	91%	15%	14%	3	1	2	1	0	1	33%
Eret_05	24	21	88%	5%	4%	1	1	0	0	0	0	0%
Eret_07	51	49	96%	4%	4%	2	0	2	2	0	2	100%
Eret_08	61	60	98%	3%	3%	2	0	2	2	0	2	100%
Eret_09	16	15	94%	7%	6%	1	0	1	1	0	1	100%
Eret_10	4	1	25%	100%	25%	1	1	0	1	1	0	100%
Eret_11	27	6	22%	50%	11%	3	3	0	3	3	0	100%
Eret_12	15	6	40%	17%	7%	1	0	1	1	0	1	100%
Eret_14	39	39	100%	8%	8%	3	0	3	3	0	3	100%
Eret_15	39	30	77%	27%	21%	8	4	4	8	4	4	100%
Eret_16	54	52	96%	8%	7%	4	4	0	4	4	0	100%
Eret_17	38	2	5%	50%	3%	1	0	1	1	0	1	100%
Eret_19	33	18	55%	11%	6%	2	2	0	2	2	0	100%
Eret_20	56	53	95%	2%	2%	1	1	0	1	1	0	100%
Eret_21	39	22	56%	14%	8%	3	3	0	3	3	0	100%
Eret_22	15	15	100%	27%	27%	4	3	1	3	2	1	75%
Eret_23	32	26	81%	65%	53%	17	12	5	1	1	0	6%
Eret_24	55	54	98%	9%	9%	5	2	3	4	1	3	80%
Eret_25	34	33	97%	24%	24%	8	3	5	8	3	5	100%
Eret_26	29	22	76%	36%	28%	8	4	4	7	3	4	88%
Eret_27	10	3	30%	33%	10%	1	0	1	0	0	0	0%
Eret_28	54	46	85%	33%	28%	15	7	8	0	0	0	0%
Eret_29	32	29	91%	21%	19%	6	3	3	0	0	0	0%

(Continued)

TABLE 2 (Continued)

Female	N eggs	N larvae	% egg hatching	% emergence	% egg reaching to adult	Adult progeny				% maternal transmission		
						Number of adults		Wolbachia positive samples				
						Total	♂	♀	Total		♂	♀
Eret_30	43	40	93%	23%	21%	9	4	5	7	2	5	78%
Eret_31	17	10	59%	100%	59%	10	8	2	6	4	2	60%
Eret_32	36	34	94%	6%	6%	2	1	1	1	0	1	50%
Eret_33	34	28	82%	7%	6%	2	2	0	2	2	0	100%
Mean/Total			74%	26%	15%	131	74	57	78	40	38	

The presence of *Wolbachia* in females and their offspring was examined through the presence/absence of the *wsp* gene. For each female, the number of eggs, the number of larvae (first instar larvae), the egg hatching rate (%), the percentage of emerging adults, the percentage of egg reaching to adult and the number of emerging adults (males and females) were provided. Finally, the rate of maternal transmission of *Wolbachia* was determined from adult progeny of each female. N = total number of mosquitoes examined (eggs or larvae).

Wolbachia infection is not fixed in any of the *Eretmapodites* field populations, with *Wolbachia*-infected and uninfected specimens found within the same sampling sites. The presence of *Wolbachia*-infected and uninfected specimens is commonly observed in field populations of other arthropod species and can be associated with low phenotypic manipulation but also to imperfect maternal transmission (Werren et al., 2008). We have monitored maternal transmission of (the most frequent) *wEretA* using a laboratory colony of *Er. subsimplicipes*. It should be noted that it was challenging to rear *Er. subsimplicipes* species under insectary conditions and a reduced number of adult offspring was obtained for each female. Despite this challenge, our results show that maternal transmission of *Wolbachia* is imperfect or non-existent in some females, which could explain why *Wolbachia* infection is not fixed in *Er. subsimplicipes* field populations. *COI* sequencing data is also consistent with imperfect maternal transmission in *Er. subsimplicipes* since identical mtDNA haplotypes are shared by *Wolbachia*-infected and uninfected mosquitoes (Figure 2C).

The examined phylogenies of *wsp* and each of the five MLST genes showed that both *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes* are infected with two *Wolbachia* supergroups A and B. Within each *Wolbachia* supergroup, the genetic diversity was low, only one allele being detected for almost all loci (except for *hcpA*). The concatenated phylogeny of the five MLST genes also confirmed the presence of two *Wolbachia* supergroups A and B strains (namely *wEretA* and *wEretB*, respectively) in our dataset. In *Er. subsimplicipes*, mosquitoes were infected with either *wEretA* or *wEretB*, although more higher infections by *wEretA* than *wEretB* were observed; while only *wEretB* was observed in *Er. quinquevittatus*. The presence of two divergent *Wolbachia* strains in *Er. subsimplicipes* can be explained by horizontal transfer events from other arthropod species infected with genetically related *Wolbachia* such as *Drosophila* spp. which appeared to be infected with *Wolbachia* strains closely related to the strains *wEretA* and *wEretB* (Figure 4). Interestingly, the strain *wEretB* was shared by *Er. subsimplicipes* and *Er. quinquevittatus*. Several hypotheses can be proposed to explain this pattern. The *wEretB* strain might have been present in the common ancestor of both *Eretmapodites* species, and this *Wolbachia* strain was maintained in both species after their divergence, but the absence of nucleotide diversity between *wEretB* infecting both mosquito species does not support this assumption. For instance, some difference exists between the *Wolbachia* strains *Dinn_A* and *Drec_A* (within the supergroup A) infecting the genetically closely related *Drosophila* species *D. innibula* and *D. recens* (Figure 4). Another possibility would be horizontal transfers of *Wolbachia* between both mosquito species or from other host species. The widespread distribution of *Wolbachia* in arthropods is commonly associated with horizontal transfers occurring between closely related or genetically divergent host species (Heath et al., 1999; Ahmed et al., 2016; Tolley et al., 2019). These transfers would take place through mechanisms such as contamination, predation, or parasitism, particularly among species sharing the same ecological niches. Although evidence of horizontal transfers is rare, studies have shown that such transfers can occur in host-parasitoid associations (Huigens et al., 2004; Ahmed et al., 2015). The lack of congruence between *Wolbachia* and hosts phylogenies also support the possibility of horizontal transfers of *Wolbachia* between species (Tolley et al., 2019). In our

study, we compared the phylogenies of concatenated MLST genes and *COI*, and no congruence was found (Figure 5), confirming the potential for horizontal transfers of *Wolbachia* between host species. Furthermore, the success of interspecific transfers of *Wolbachia* via embryonic microinjections (Sasaki and Ishikawa, 2000; McMeniman et al., 2009; Hughes and Rasgon, 2014) also supports the hypothesis of horizontal transfers of *Wolbachia*. Assuming a horizontal transfer of *wEretB* from *Er. subsimplicipes* to *Er. quinquevittatus*, the low prevalence of *Wolbachia* in *Er. quinquevittatus* could be explained either by a recent transfer of *wEretB*, or by differences in phenotypes induced by this *Wolbachia* strain when infecting each mosquito species. This change in phenotype expression of the same *Wolbachia* strain when infecting different host species has been previously described in *Drosophila recens* and *Drosophila subquinaria* (Jaenike, 2007). It would be interesting for future investigations to examine the phenotypes induced by the *Wolbachia* strains *wEretA* and *wEretB* in *Er. subsimplicipes* and *Er. quinquevittatus* to better understand the dynamics of these bacteria in the field. Lastly, a horizontal transfer of *wEretB* might have happened through introgression between both *Eretmapodites* species. Introgressions of *Wolbachia* have been observed in various subspecies of mosquitoes in the *Culex pipiens* complex, such as *Culex pipiens pipiens* and *Culex pipiens quinquefasciatus*, which hybridize in natural environments. This hybridization leads to subspecies sharing the same *Wolbachia* strains, as determined through the *Wolbachia* MLST genotyping method (Atyame et al., 2011; Dumas et al., 2013) (see also Figure 4). This hypothesis could be tested in the future by comparing the polymorphism in nuclear genomes of *Er. subsimplicipes* and *Er. quinquevittatus* mosquitoes.

Conclusion

In the present study, we characterized the mitochondrial genetic diversity of *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes* occurring in sympatry in three islands of the Comoros archipelago. We also characterized the genetic diversity of *Wolbachia* infecting both mosquito species and identified two new *Wolbachia* strains, which have been named *wEretA* and *wEretB*. Experimental rearing of *Er. subsimplicipes* revealed imperfect maternal transmission of *Wolbachia* that might explain the infection patterns found in the field. Future studies will examine the phenotypes induced by these *Wolbachia* in *Er. quinquevittatus* and *Er. subsimplicipes* to better understand their dynamics *in natura*. As *Eretmapodites* mosquitoes are competent vectors for the transmission of arboviruses (Bamou et al., 2021; Cêtre-Sossah et al., 2023), future investigations should also consider the effects of *wEretA* and *wEretB* on vector competence.

Data availability statement

The datasets presented in this study can be found in online repositories. The names of the repository/repositories and accession number(s) can be found below: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>, OR282837-OR282884,

OR296528-OR296530, OR296531-OR296533, OR296534-OR296536, OR296537-OR296539, OR296540-OR296543, and OR296544-OR296547.

Ethics statement

The manuscript presents research on animals that do not require ethical approval for their study.

Author contributions

YG: Data curation, Formal analysis, Methodology, Writing—original draft, Writing—review & editing. SH: Conceptualization, Methodology, Writing—original draft, Writing—review & editing. CL: Investigation, Methodology, Writing—original draft. PR: Investigation, Resources, Writing—original draft. A-bI: Investigation, Resources, Writing—original draft. AY: Investigation, Resources, Writing—original draft. PB: Formal analysis, Methodology, Writing—original draft. PM: Conceptualization, Funding acquisition, Validation, Writing—review & editing. CA: Conceptualization, Investigation, Methodology, Supervision, Validation, Writing—original draft, Writing—review & editing.

Funding

The author(s) declare financial support was received for the research, authorship, and/or publication of this article. This work was supported by the European Regional Development Funds PO INTERREG through the VECTOBIOMES project (number RE0009962) and the multi-years agreement of ARS-Mayotte/2022/n°75. SH was supported by a PhD degree scholarship from the Regional Council of Reunion Island (DIRED/20181182) and the University of Reunion Island.

Acknowledgments

We thank all collaborators from Union of Comoros for their help on the field and in the labs: Mohamed Salim Ben Said Hafi (Regional Director of Health, Anjouan), Djamaldine Mohamed Sambi (Regional Director of Health, Mohéli), Aboubacar Said Anli (Regional Director of Health, Moroni), Daanti Mouhtal Elhad and Idami Ousseni (PNLP, Anjouan), Yousra Ahamada Ali (PNLP, Mohéli), Youssouf Ismainla, and Amblat Ali Ahmed (PNLP, Moroni). We thank all collaborators from ARS Mayotte for their help on the field and in the labs: Ismael Nahouda, Mikidachi Said, Mourssalina Haraouna, Lassadi Hassani Ali, and Madi-Saindou Mouhamadi. We thank Louis Collet (Centre Hospitalier de Mayotte) for his help in the storage and the shipment of samples. We are thankful to Fiona Baudino (UMR PIMIT, Réunion) for her help in the lab. We are grateful to Pablo Tortosa (UMR PIMIT) for his proofreading and relevant remarks on the manuscript.

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.

Publisher's note

All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated

organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.

Supplementary material

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2024.1343917/full#supplementary-material>

References

- Ahmed, M. Z., Breinholt, J. W., and Kawahara, A. Y. (2016). Evidence for common horizontal transmission of *Wolbachia* among butterflies and moths. *BMC Evol. Biol.* 16:118. doi: 10.1186/s12862-016-0660-x
- Ahmed, M. Z., Li, S.-J., Xue, X., Yin, X.-J., Ren, S.-X., Jiggins, F. M., et al. (2015). The intracellular bacterium *Wolbachia* uses parasitoid wasps as phoretic vectors for efficient horizontal transmission. *PLoS Pathog.* 10:e1004672. doi: 10.1371/journal.ppat.1004672
- Aliota, M. T., Peinado, S. A., Velez, I. D., and Osorio, J. E. (2016). The wMel strain of *Wolbachia* reduces transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Sci. Rep.* 6:28792. doi: 10.1038/srep28792
- Armbruster, P., Damsky, W. E. Jr., Giordano, R., Birungi, J., Munstermann, L. E., and Conn, J. E. (2003). Infection of new- and old-world *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the intracellular parasite *Wolbachia*: implications for host mitochondrial DNA evolution. *J. Med. Entomol.* 40, 356–360. doi: 10.1603/0022-2585-40.3.356
- Atyame, C. M., Delsuc, F., Pasteur, N., Weill, M., and Duron, O. (2011). Diversification of *Wolbachia* endosymbiont in the *Culex pipiens* mosquito. *Molec. Biol. Evol.* 28, 2761–2772. doi: 10.1093/molbev/msr083
- Atyame, C. M., Labbé, P., Dumas, E., Milesi, P., Charlat, S., Fort, P., et al. (2014). *Wolbachia* divergence and the evolution of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *PLoS ONE* 9:e87336. doi: 10.1371/journal.pone.0087336
- Ayala, D., Akone-Ella, O., Rahola, N., Kengne, P., Ngangue, M. F., Mezeme, F., et al. (2019). Natural *Wolbachia* infections are common in the major malaria vectors in Central Africa. *Evol. Appl.* 12, 1583–1594. doi: 10.1111/evo.12804
- Baldini, F., Segata, N., Pompon, J., Marcenac, P., Robert Shaw, W., Dabiré, R. K., et al. (2014). Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Natu. Commun.* 5:3985. doi: 10.1038/ncomms4985
- Baldo, L., Dunning Hotopp, J. C., Jolley, K. A., Bordenstein, S. R., Biber, S. A., Choudhury, R. R., et al. (2006). Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipiensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7098–7110. doi: 10.1128/AEM.00731-06
- Bamou, R., Mayi, M. P. A., Djiappi-Tchamen, B., Nana-Ndjangwo, S. M., Nchoutpouen, E., Cornet, A. J., et al. (2021). An update on the mosquito fauna and mosquito-borne diseases distribution in Cameroon. *Paras. Vectors* 14:527. doi: 10.1186/s13071-021-04950-9
- Bauer, J. H. (1928). The transmission of yellow fever by mosquitoes other than *Aedes aegypti*. *J. Am. Med. Assoc.* 90, 2091–2092. doi: 10.1001/jama.1928.02690530019007
- Bian, G., Joshi, D., Dong, Y., Lu, P., Zhou, G., Pan, X., et al. (2013). *Wolbachia* invades *Anopheles stephensi* populations and induces refractoriness to *Plasmodium* infection. *Science* 340, 748–751. doi: 10.1126/science.1236192
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., and Xi, Z. (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLOS Pathog.* 6:e1000833. doi: 10.1371/journal.ppat.1000833
- Bordenstein, S. R., Paraskevopoulos, C., Dunning Hotopp, J. C., Sapountzis, P., Lo, N., Bandi, C., et al. (2009). Parasitism and mutualism in *Wolbachia*: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Molec. Biol. Evol.* 26, 231–241. doi: 10.1093/molbev/msn243
- Bordenstein, S. R., and Wernegreen, J. J. (2004). Bacteriophage flux in endosymbionts (*Wolbachia*): infection frequency, lateral transfer, and recombination rates. *Molec. Biol. Evol.* 21, 1981–1991. doi: 10.1093/molbev/msh211
- Bourtzis, K., Dobson, S. L., Xi, Z., Rasgon, J. L., Calvitti, M., Moreira, L. A., et al. (2014). Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Tropica* 132, S150–S163. doi: 10.1016/j.actatropica.2013.11.004
- Boussès, P., Le Goff, G., and Robert, V. (2018). Inventaire des moustiques (Diptera: Culicidae) des îles du sud-ouest de l'océan Indien, Madagascar excepté — Une revue critique. *Ann. Soc. Entomol. France* 54, 89–110. doi: 10.1080/00379271.2018.1429951
- Braig, H. R., Zhou, W., Dobson, S. L., and O'Neill, S. L. (1998). Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipiensis*. *J. Bacteriol.* 180, 2373–2378. doi: 10.1128/JB.180.9.2373-2378.1998
- Cêtre-Sossah, C., Lebon, C., Rabarison, P., Cardinale, E., Mavingui, P., and Atyame, C. (2023). Evidence of *Eretmapodites subsimplicis* and *Aedes albopictus* as competent vectors for Rift Valley fever virus transmission in Mayotte. *Acta Tropica* 239:106835. doi: 10.1016/j.actatropica.2023.106835
- Coon, K. L., Brown, M. R., and Strand, M. R. (2016). Mosquitoes host communities of bacteria that are essential for development but vary greatly between local habitats. *Molec. Ecol.* 25, 5806–5826. doi: 10.1111/mec.13877
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., and Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods* 9, 772–772. doi: 10.1038/nmeth.2109
- Dodson, B. L., Hughes, G. L., Paul, O., Matarachiero, A. C., Kramer, L. D., and Rasgon, J. L. (2014). *Wolbachia* enhances West Nile Virus (WNV) infection in the mosquito *Culex tarsalis*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e2965. doi: 10.1371/journal.pntd.0002965
- Douglas, A. E. (1998). Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*. *Ann. Rev. Entomol.* 43, 17–37. doi: 10.1146/annurev.ento.43.1.17
- Dumas, E., Atyame, C. M., Milesi, P., Fonseca, D. M., Shaikevich, E. V., Unal, S., et al. (2013). Population structure of *Wolbachia* and cytoplasmic introgression in a complex of mosquito species. *BMC Evol. Biol.* 13:181. doi: 10.1186/1471-2148-13-181
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., et al. (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol.* 6:27. doi: 10.1186/1741-7007-6-27
- Duron, O., Fort, P., and Weill, M. (2005). Hypervariable prophage WO sequences describe an unexpected high number of *Wolbachia* variants in the mosquito *Culex pipiens*. *Proc. R. Soc. B* 273, 495–502. doi: 10.1098/rspb.2005.3336
- Dutra, H. L. C., Rocha, M. N., Dias, F. B. S., Mansur, S. B., Caragata, E. P., and Moreira, L. A. (2016). *Wolbachia* blocks currently circulating Zika Virus isolates in Brazilian *Aedes aegypti* mosquitoes. *Cell Host Micr.* 19, 771–774. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.021
- Edwards, F. W. (1941). *Mosquitoes of the Ethiopian Region. III.-Culicine aults and pupae*. Available online at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19411000211> (accessed November 2, 2023).
- Folmer, O., Black, M., Hoeh, W., Lutz, R., and Vrijenhoek, R. (1994). DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome oxidase subunit-I from diverse metazoan invertebrates. *Molec. Marine Biol. Biotechnol.* 15, 294–299.
- Głowska, E., Dragun-Damian, A., Dabert, M., and Gerth, M. (2015). New *Wolbachia* supergroups detected in quill mites (Acari: Symbiongyllidae). *Infect. Genet. Evol.* 30, 140–146. doi: 10.1016/j.meegid.2014.12.019
- Harbach, R. E. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny. *Zootaxa* 1668, 591–638. doi: 10.11646/zootaxa.1668.1.28
- Harbach, R. E. (2013). *Mosquito taxonomic inventory*. Available online at: <https://mosquito-taxonomic-inventory.myspecies.info/how-reference-site> (accessed November 3, 2023).
- Heath, B. D., Butcher, R. D. J., Whitfield, W. G. F., and Hubbard, S. F. (1999). Horizontal transfer of *Wolbachia* between phylogenetically distant insect species by a naturally occurring mechanism. *Curr. Biol.* 9, 313–316. doi: 10.1016/S0960-9822(99)80139-0
- Hedges, L. M., Brownlie, J. C., O'Neill, S. L., and Johnson, K. N. (2008). *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322, 702–702. doi: 10.1126/science.1162418

- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., and Werren, J. H. (2008). How many species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data. *FEMS Microbiol. Lett.* 281, 215–220. doi: 10.1111/j.1574-6968.2008.01110.x
- Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., Muzzi, F., et al. (2011). Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* 476, 454–457. doi: 10.1038/nature10356
- Hopkins, G. H. E. (1952). *Mosquitoes of the Ethiopian Region. I. Larval bionomics of mosquitoes and taxonomy of Culicine larvae*. Available online at: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19532901687> (accessed November 2, 2023).
- Hughes, G. L., and Rasgon, J. L. (2014). Transinfection: a method to investigate *Wolbachia*-host interactions and control arthropod-borne disease. *Insect Molec. Biol.* 23, 141–151. doi: 10.1111/imb.12066
- Hughes, G. L., Vega-Rodriguez, J., Xue, P., and Rasgon, J. L. (2012). *Wolbachia* strain wAlbB enhances infection by the rodent malaria parasite *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae* mosquitoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1491–1495. doi: 10.1128/AEM.06751-11
- Huigens, M. E., de Almeida, R. P., Boons, P., a., H., Luck, R. F., and Stouthamer, R. (2004). Natural interspecific and intraspecific horizontal transfer of parthenogenesis-inducing *Wolbachia* in *Trichogramma* wasps. *Proc. R. Soc. B.* 271, 509–515. doi: 10.1098/rspb.2003.2640
- Jaenike, J. (2007). Spontaneous emergence of a new *Wolbachia* phenotype. *Evolution* 61, 2244–2252. doi: 10.1111/j.1558-5646.2007.00180.x
- Jaenike, J., Unckless, R., Cockburn, S. N., Boelio, L. M., and Perlman, S. J. (2010). Adaptation via symbiosis: recent spread of a *Drosophila* defensive symbiont. *Science* 329, 212–215. doi: 10.1126/science.1188235
- Jiggins, F. M., Schulenburg, J. H. G., von der Hurst, G. D. D., and Majerus, M. E. N. (2001). Recombination confounds interpretations of *Wolbachia* evolution. *Proc. R. Soc. B.* 268, 1423–1427. doi: 10.1098/rspb.2001.1656
- Jolley, K. A., Bray, J. E., and Maiden, M. C. J. (2018). Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Res.* 3:124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1
- Kambhampati, S., Rai, K. S., and Burgun, S. J. (1993). Unidirectional cytoplasmic incompatibility in the mosquito *Aedes albopictus*. *Evolution* 47, 673–677. doi: 10.2307/2410079
- Kearse, M., Moir, R., Wilson, A., Stones-Havas, S., Cheung, M., Sturrock, S., et al. (2012). Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* 28, 1647–1649. doi: 10.1093/bioinformatics/bts199
- Laven, H. (1951). Crossing experiments with *Culex* strains. *Evolution* 5, 370–375. doi: 10.2307/2405682
- Le Goff, G., Goodman, S. M., Elguero, E., and Robert, V. (2014). Survey of the mosquitoes (Diptera: Culicidae) of Mayotte. *PLoS ONE* 9:e100696. doi: 10.1371/journal.pone.0100696
- McIntosh, B. M., Jupp, P. G., Dos Santos, I., and Barnard, B. J. H. (1980). Vector studies on Rift Valley Fever Virus in South Africa. *South African Med. J.* 58, 127–132.
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W. C., Sidhu, M., Wang, Y.-F., et al. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* 323, 141–144. doi: 10.1126/science.1165326
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., et al. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* 139, 1268–1278. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.042
- Musa, A. A., Muturi, M. W., Musyoki, A. M., Ouso, D. O., Oundo, J. W., Makhulu, E. E., et al. (2020). Arboviruses and blood meal sources in zoophilic mosquitoes at human-wildlife interfaces in Kenya. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* 20, 444–453. doi: 10.1089/vbz.2019.2563
- Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., and Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100, 1803–1807. doi: 10.1073/pnas.0335320100
- Osuna, A. M., Gidley, A., Mayi, M. P. A., Bamou, R., Dhokiya, V., Antonio-Nkondjio, C., et al. (2023). Diverse novel *Wolbachia* bacteria strains and genera-specific co-infections with *Asaia* bacteria in *Culicine* mosquitoes from ecologically diverse regions of Cameroon. *Wellcome Open Res.* 8:267. doi: 10.12688/wellcomeopenres.18580.2
- Paraskevopoulos, C., Bordenstein, S. R., Wernegreen, J. J., Werren, J. H., and Bourtzis, K. (2006). Toward a *Wolbachia* multilocus sequence typing system: discrimination of *Wolbachia* strains present in *Drosophila* species. *Curr. Microbiol.* 53, 388–395. doi: 10.1007/s00284-006-0054-1
- Rambaut, A. (2014). *FigTree 1.4.2 software*.
- Rasgon, J. L., Cornet, A. J., and Scott, T. W. (2006). Evolutionary history of a mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proc. R. Soc. B.* 273, 1603–1611. doi: 10.1098/rspb.2006.3493
- Reiter, P., and Sprenger, D. (1987). The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *J. Am. Mosquito Control Assoc.* 3, 494–501.
- Roger, M., Beral, M., Licciardi, S., Soulé, M., Faharoudine, A., Foray, C., et al. (2014). Evidence for circulation of the rift valley fever virus among livestock in the union of comoros. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 8:e3045. doi: 10.1371/journal.pntd.0003045
- Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., et al. (2012). MrBayes 3.2: efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *System. Biol.* 61, 539–542. doi: 10.1093/sysbio/sy029
- Ros, V. I. D., Fleming, V. M., Feil, E. J., and Breeuwer, J. A. J. (2009). How diverse is the genus *Wolbachia*? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new *Wolbachia* supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1036–1043. doi: 10.1128/AEM.01109-08
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., et al. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molec. Biol. Evol.* 34, 3299–3302. doi: 10.1093/molbev/mxx248
- Sasaki, T., and Ishikawa, H. (2000). Transinfection of *Wolbachia* in the mediterranean flour moth, *Ephestia kuehniella*, by embryonic microinjection. *Hereditas* 85, 130–135. doi: 10.1046/j.1365-2540.2000.00734.x
- Scarborough, C. L., Ferrari, J., and Godfray, H. C. J. (2005). Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* 310, 1781–1781. doi: 10.1126/science.1120180
- Service, M. W. (1990). *Handbook to the Afrotropical toxorhynchitine and culicine mosquitoes, excepting Aedes and Culex*. London: British Museum (Natural History) 1–207.
- Shropshire, J. D., Leigh, B., and Bordenstein, S. R. (2020). Symbiont-mediated cytoplasmic incompatibility: what have we learned in 50 years? *eLife* 9:e61989. doi: 10.7554/eLife.61989
- 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
- Tantely, M. L., Goff, G. L., Boyer, S., and Fontenille, D. (2016). An updated checklist of mosquito species (Diptera: Culicidae) from Madagascar. *Parasite* 23:20. doi: 10.1051/parasite/2016018
- Teixeira, L., Ferreira, A., and Ashburner, M. (2008). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* 6:e1000002. doi: 10.1371/journal.pbio.1000002
- Thongsripong, P., Chandler, J. A., Green, A. B., Kittayapong, P., Wilcox, B. A., Kapan, D. D., et al. (2018). Mosquito vector-associated microbiota: metabarcoding bacteria and eukaryotic symbionts across habitat types in Thailand endemic for dengue and other arthropod-borne diseases. *Ecol. Evol.* 8, 1352–1368. doi: 10.1002/ece3.3676
- Tokash-Peters, A. G., Niyonzima, J. D., Kayirangwa, M., Muhayimana, S., Tokash, I. W., Jabon, J. D., et al. (2022). Mosquito microbiomes of Rwanda: characterizing mosquito host and microbial communities in the land of a thousand hills. *bioRxiv* 2022.08.03.502589. doi: 10.1101/2022.08.03.502589
- Tolley, S. J. A., Nonacs, P., and Sapountzis, P. (2019). *Wolbachia* horizontal transmission events in ants: what do we know and what can we learn? *Front. Microbiol.* 10:296. doi: 10.3389/fmicb.2019.00296
- Tortosa, P., Charlat, S., Labbé, P., Dehecq, J.-S., Barré, H., and Weill, M. (2010). *Wolbachia* age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: a host evolutionary response to cytoplasmic incompatibility? *PLoS ONE* 5:e9700. doi: 10.1371/journal.pone.0009700
- Tsuchida, T., Koga, R., Horikawa, M., Tsunoda, T., Maoka, T., Matsumoto, S., et al. (2010). Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science* 330, 1102–1104. doi: 10.1126/science.1195463
- Turelli, M., Katznelson, A., and Ginsberg, P. S. (2022). Why *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility is so common. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 119:e2211637119. doi: 10.1073/pnas.2211637119
- Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., et al. (2011). The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* 476, 450–453. doi: 10.1038/nature10355
- Weinert, L. A., Araujo-Jnr, E. V., Ahmed, M. Z., and Welch, J. J. (2015). The incidence of bacterial endosymbionts in terrestrial arthropods. *Proc. R. Soc. B.* 282:20150249. doi: 10.1098/rspb.2015.0249
- Werren, J. H., Baldo, L., and Clark, M. E. (2008). *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* 6, 741–751. doi: 10.1038/nrmicro1969
- Zélé, F., Nicot, A., Berthomieu, A., Weill, M., Duron, O., and Rivero, A. (2014). *Wolbachia* increases susceptibility to *Plasmodium* infection in a natural system. *Proc. R. Soc. B.* 281:20132837. doi: 10.1098/rspb.2013.2837
- Zhou, W., Rousset, F., and O'Neil, S. (1998). Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. *Proc. R. Soc. B.* 265, 509–515. doi: 10.1098/rspb.1998.0324
- Zouache, K., Raharimalala, F. N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L. H. R., 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
- Zug, R., and Hammerstein, P. (2012). Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS ONE* 7:e38544. doi: 10.1371/journal.pone.0038544