



HAL
open science

La compétence vectorielle comme indicateur d'un risque épidémique : la fièvre jaune à la Martinique, dans la Caraïbe et en Amérique

Gaëlle Gabiane

► To cite this version:

Gaëlle Gabiane. La compétence vectorielle comme indicateur d'un risque épidémique : la fièvre jaune à la Martinique, dans la Caraïbe et en Amérique. Sciences agricoles. Université des Antilles, 2022. Français. NNT : 2022ANTI0853 . tel-04761068

HAL Id: tel-04761068

<https://theses.hal.science/tel-04761068v1>

Submitted on 30 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 des Antilles

Ecole Doctorale 589 : Milieu Insulaire Tropical à Risques : protection, valorisation, santé et développement

Unité des Arbovirus et Insectes Vecteurs, Institut Pasteur, Paris

La compétence vectorielle comme indicateur d'un risque épidémique : la fièvre jaune à la Martinique, dans la Caraïbe et en Amérique

Par Gaëlle GABIANE

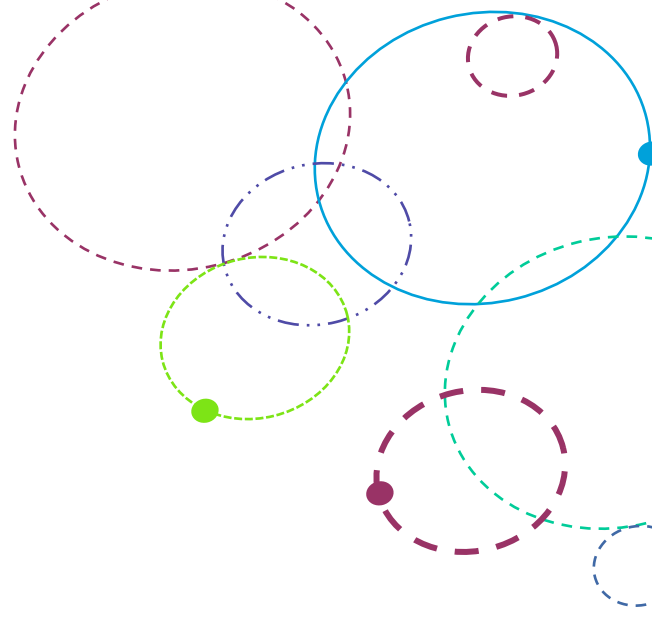
Thèse de doctorat de Virologie et Entomologie médicale

Dirigée par les Professeures Anna-Bella Failloux (Institut Pasteur) et Juliette Smith-Ravin (Université des Antilles)

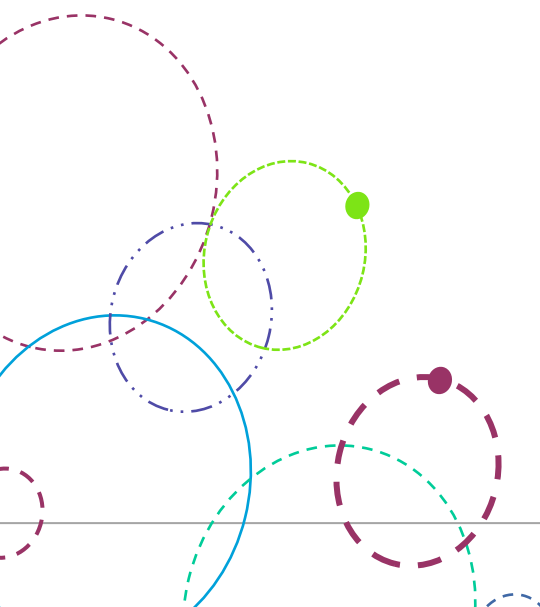
Soutenue le 14 décembre 2022

Devant le jury composé de :

- | | |
|--|---------------------|
| - M. Fabrice Chandre, DR2 IRD | Rapporteur |
| - M. Xavier de Lamballerie, Professeur Inserm | Rapporteur |
| - M. André Cabié, Professeur CHUM | Examineur |
| - Mme Sandrine Castelain, Professeure, Université de Picardie | Examineur |
| - Mme Anubis Vega-Rua, CR Institut Pasteur | Membre invité |
| - M. Jean-Bernard Duchemin, IR Institut Pasteur | Membre invité |
| - Mme Nathalie Duclouvel-Pame, Directrice déléguée, ARS Martinique | Membre invité |
| - M. Manuel Etienne, Directeur Cedre-Lav | Membre invité |
| - Mme Juliette Smith-Ravin, Professeure UA | Directrice de thèse |
| - Mme Anna-Bella Failloux, Professeure Institut Pasteur | Directrice de thèse |



Je dédie ma thèse à mes grands-parents Candide Pauline Pierre-Charles surnommée Pauline et Ernest Paul Pierre-Charles surnommé



Remerciements

Le moins que l'on puisse dire est que cette thèse ne s'est pas vraiment déroulée de façon « conventionnelle ». Après un début de thèse retardé de presque 8 mois à cause de mon statut de boursière qui ne me permettait pas d'effectuer mes travaux à l'Institut Pasteur, j'ai enfin pu intégrer l'Unité Arbovirus et Insectes Vecteurs en tant que stagiaire où j'ai enfin pu mener mes travaux. Evidemment étant « stagiaire », j'ai dû arrêter mon projet après 6 mois pour un mois et demi, n'ayant plus d'accès. Toutefois après de multiples batailles, j'ai enfin obtenu un contrat me permettant de mener à bien ce projet, mais cela n'était bien sûr pas sans compter sur une dernière coupure d'un mois, pour la forme disons. Cependant malgré toutes ces difficultés et tout ce stress supplémentaire généré, nous y voilà, nous avons pu mener la thèse à son terme.

Pour toutes ces raisons, je tiens à remercier profondément et très chaleureusement ma directrice de thèse, le Pr Anna-Bella Failloux, d'abord pour m'avoir proposée cette thèse à la fin de mon contrat d'ingénieur. Je sais que nous avons eu quelques moments très compliqués notamment avec ma prise de fonction. Merci encore d'avoir bataillé comme une lionne afin que je puisse avoir un contrat et des accès pour travailler. Je te suis également particulièrement reconnaissante pour ton soutien, ta grande implication dans mon projet de thèse et dans la correction de mon manuscrit ainsi que pour toute l'énergie déployée afin de me permettre de travailler dans les meilleures conditions possibles. Malgré les moments compliqués, saches que je suis honorée d'avoir travaillé avec toi et que j'ai appris beaucoup de choses en travaillant à tes côtés. Je suis consciente de la chance que j'ai eue et te remercie encore de me l'avoir donnée.

Je remercie également ma deuxième directrice de thèse le Pr Juliette Smith-Ravin pour m'avoir donné ma chance, pour son écoute et pour ses encouragements surtout lors de la rédaction de cette thèse.

Je remercie également profondément le Dr André Yébakima et Mr Manuel Etienne qui ont participé à toutes les batailles administratives sans condition pour l'obtention de mes financements et de mes accès.

J'adresse mes vifs remerciements à tous les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mes travaux, Mme Anubis Véga-Rua, Mr André Cabié et Mr Jean-Benard Duchemin. Je remercie particulièrement Mr Fabrice Chandre et Mr Xavier de Lamballerie d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse. Merci également aux membres invités Mme Nathalie Duclovel-Pame et Mr Manuel Etienne d'avoir accepté d'assister à cette thèse. Je vous remercie également d'avoir participé en compagnie de Mr André Cabié, du Dr André Yébakima et de Mme Fabienne Priam à mon comité de suivi de thèse. Merci à tous pour vos conseils et le temps que vous m'avez accordée. Mes remerciements vont également à l'Agence Régionale de Santé Martinique et la Collectivité Territoriale de la Martinique pour avoir financé ces travaux de thèse.

Au cours de ces dernières années, ce fût un réel plaisir de travailler au sein de l'Unité Arbovirus et Insectes Vecteurs dans un cadre où s'allient rigueur et convivialité. Je remercie chaleureusement tous les membres de l'équipe (actuels ou passés) pour leur convivialité, leur soutien et leur aide durant ma thèse. Merci aussi à Pei-Shi Yen, Rachel Bellone, Valentine Gilbert, Malika Hocine, Lucy DeGuilleme de Lataillade, Vincent Houé, Lazar Brésillon-Dubuc, Margarita, Stéphanie, Christelle Scaerou, Catherine Gegat, Jocelyne Alexandre pour leur appui et leur bienveillance. Je remercie tout particulièrement Adrien Blisnick et Marine

Viglietta pour les discussions scientifiques et non scientifiques, leur soutien, leur bienveillance tout au long de cette thèse, en particulier durant la période de rédaction de ma thèse.

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

Je remercie également le Pr François Rougeon, mon voisin pour ses conseils avisés lors de la rédaction.

Enfin, je remercie Marie Vazeille et Laurence Mousson pour leur aide, leurs précieux conseils, leur soutien, leur disponibilité, leur bonne humeur mais surtout pour la formation et toutes les connaissances que j'ai acquises à vos côtés. Merci à vous du fond du cœur. Merci également à Marie d'avoir gentiment accepté de relire mon manuscrit. Un grand merci à Laurence et Chloé Bohers pour votre aide précieuse et inestimable lors de la fin de cette thèse.

Je tiens également à remercier toute l'équipe du CEDRE-LAV pour leur accueil très chaleureux, vous m'avez tout de suite mise à l'aise. Je remercie particulièrement Marie-Julie, ma collègue de bureau, merci pour ta bienveillance, ta gentillesse et ta disponibilité.

Enfin, je remercie le dernier membre du CEDRE-LAV et non le moindre, Mr Fabrice Sonor. Par où commencer, je te remercie pour ton soutien incommensurable, la formation de terrain que tu m'as apportée, ta disponibilité et ton amitié tout simplement, merci encore du fond du cœur pour tout.

Je remercie, toutes les personnes avec qui j'ai pu collaborer et/ou discuter de mon projet de thèse, je remercie Géraldine Piorkowski de l'Unité des Virus Emergents de Marseille pour sa contribution dans l'avancée de mes travaux.

Merci à Pierre Lechat qui a réalisé une grande partie des analyses bio-informatiques des expériences présentées dans ce manuscrit. Merci également à Yoann Madec pour les analyses statistiques.

Je tiens à exprimer toute ma gratitude à mes amis et à ma famille. Avec le temps et l'implication que m'a demandée la thèse, vous m'avez toujours exprimé votre soutien de près ou de loin.

Je remercie encore ma famille, ma mère, mon frère et ma sœur qui me tenaient parfois compagnie au téléphone dans un cadre de soutien mutuel afin d'être plus productif. Merci beaucoup à vous tous pour votre soutien durant ces années intenses et merci pour votre amour surtout toi ma petite maman. Je remercie ma belle famille.

Je te remercie Jonathan d'être resté déjà, mais aussi pour ton soutien durant tous les moments difficiles et il y en a eu beaucoup.

Lors de la rédaction de ces remerciements, comme je l'ai fait tout long de la rédaction de ce manuscrit, je ne peux m'empêcher de penser à 3 êtres qui me sont très chers et malheureusement qui ne sont plus avec moi aujourd'hui, mes grands-parents Candide Pauline Pierre-Charles et Erneste Paul Pierre-Charles qui m'ont toujours poussée à viser toujours plus loin, vous me manquez tellement. Et le dernier, mon chien Spike, tes petits câlins me manquent tout le temps.

Enfin je remercie toutes les personnes que j'ai pu rencontrer et qui ont influencé d'une quelconque manière le déroulement de cette thèse.

Résumé

L'étude des maladies à transmission vectorielle représente un intérêt majeur pour la Caraïbe en raison de la présence en fortes densités du moustique *Aedes aegypti*, principal vecteur d'arbovirus. La Martinique et la Caraïbe sont, depuis des décennies, soumises à de régulières épidémies de dengue. L'arrivée et l'installation successives de deux nouveaux arbovirus, celui du chikungunya (CHIKV) en 2013, et celui du Zika (ZIKV) en 2015, a de nouveau mis en lumière l'importance de l'étude des maladies à transmission vectorielle et réveillé la crainte de l'émergence d'un autre arbovirus dans les îles, le virus de la fièvre jaune (YFV). Originaire d'Afrique, le YFV fut transporté dans le nouveau monde lors de la traite des esclaves (15^{ème} - 19^{ème} siècle) et causa des épidémies dévastatrices, principalement dans les agglomérations urbaines. Après plus de deux siècles d'épidémies, la fièvre jaune ne sévit plus dans les îles de la Caraïbe, et ceci, suite au programme d'éradication du vecteur *Ae. aegypti* initié au début du 20^{ème} siècle. La Caraïbe semble depuis épargnée par le virus, en dépit de l'omniprésence du moustique vecteur *Ae. aegypti* dans les îles (suite à l'assouplissement des programmes de contrôle) et de la présence du virus dans les forêts tropicales d'Amérique du Sud et de Trinidad au sein d'un cycle enzootique. Le YFV appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*, comme les virus de la dengue (DENV) et du Zika. Le YFV est présent en Afrique sub-saharienne et en Amérique du Sud (7 génotypes de YFV décrits : 2 en Amérique et 5 en Afrique). Les récentes épidémies de fièvre jaune en Angola en 2016 et plus largement, en Afrique de l'Ouest ainsi que celles du Brésil en 2017 et 2018 indiquent des changements dans la distribution actuelle de la maladie dans les régions tropicales et subtropicales d'Amérique du Sud et d'Afrique. Des voyageurs infectés assurant des introductions multiples dans les îles font craindre la survenue d'une épidémie initiée par un cas importé. A l'heure où les échanges de voyageurs et marchandises s'intensifient, un risque d'introduction du YFV dans la Caraïbe n'est donc pas à exclure. Dans une optique de prévention et d'évaluation de ce risque, l'objectif de ce projet de thèse est d'évaluer le risque d'émergence de la fièvre jaune à la Martinique et dans la Caraïbe où la population humaine est immunologiquement naïve pour ce virus et exposée au vecteur. Nos résultats montrent que les populations de moustiques de la Caraïbe et d'Amérique infectés par différents génotypes de YFV, sont capables de transmettre les 5 YFV avec des charges virales dans la salive du moustique pouvant atteindre plus de 2000 particules virales. Néanmoins, les glandes salivaires jouent un rôle prépondérant de frein à la transmission, un rôle plus important que l'intestin moyen. Nous avons également mis en évidence une corrélation entre la charge virale contenue dans l'intestin moyen ou la carcasse du moustique et son statut infectieux ; le franchissement de chaque barrière anatomique (intestin moyen et glandes salivaires) nécessite une charge virale élevée détectée dans le compartiment précédent. En examinant la diversité virale dans les différents compartiments du moustique, nous avons pu mettre en évidence des variants viraux présents dans l'intestin moyen et la carcasse mais absents du repas infectieux. Enfin, nous avons démontré qu'*Aedes albopictus* était compétent à transmettre les 5 YFV, pouvant ainsi jouer le rôle de vecteur secondaire. Au regard de ces résultats, nous pouvons conclure que le risque de réémergence et de propagation du YFV dans la Caraïbe est réel et que ce risque dépend de la combinaison virus/moustique. Ces données pourront être une base pour l'élaboration d'une cartographie de la compétence vectorielle des moustiques, de protocoles de surveillance, de lutte antivectorielle, et de conception de plans d'actions d'urgence.

Mots clés : fièvre jaune, Caraïbe, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, compétence vectorielle, diversité virale, émergence/réémergence.

Abstract

Studying vector-borne diseases is of major interest for the Caribbean due to the presence of high densities of *Aedes aegypti* mosquito, the main vector of arboviruses. Martinique and the Caribbean have been subjected to repeated dengue epidemics for decades. The arrival and successive establishment of two new arboviruses, chikungunya (CHIKV) in 2013, and Zika (ZIKV) in 2015, has once again highlighted the importance of investigating vector-borne diseases and raised fears of the emergence of another arbovirus in the region, yellow fever virus (YFV). Native to Africa, YFV was transported to the new world during the slave trade (15th - 19th century) and caused devastating epidemics, mainly in urban agglomerations. After more than two centuries of epidemics, yellow fever no longer rages in the Caribbean islands, and this was a consequence of the eradication program of the vector *Ae. aegypti* initiated at the beginning of the 20th century. The Caribbean seems to be spared by the virus since then, despite the omnipresence of *Ae. aegypti* in the islands (following the relaxation of control programs) and the presence of the virus in the tropical forests of South America and Trinidad circulating within an enzootic cycle. YFV belongs to the family *Flaviviridae* and genus *Flavivirus*, like DENV (dengue virus) and ZIKV. YFV is present in sub-Saharan Africa and South America (7 YFV genotypes described: 2 in America and 5 in Africa). The recent yellow fever epidemics in Angola in 2016 and more widely, in West Africa as well as those in Brazil in 2017 and 2018 indicate changes in the current distribution of the disease in tropical and subtropical regions of South America and Africa. Infected travelers ensuring multiple introductions into the islands raise fears of the occurrence of an epidemic initiated by an imported case. At a time when exchanges of travelers and goods are intensifying, the risk of introducing YFV into the Caribbean cannot be ruled out, as was the case for CHIKV and ZIKV. With a view to prevention and risk assessment, the objective of this project is to assess the risk of emergence of yellow fever in Martinique and in the Caribbean where the human population is immunologically naive for this virus and exposed to the vector. Our results show that mosquito populations from the Caribbean and America infected with different YFV genotypes are able to transmit the 5 YFVs with viral loads in mosquito saliva that can reach more than 2000 viral particles. Nevertheless, the salivary glands play a major role in braking transmission, a more important role than the midgut. We have also demonstrated a correlation between the viral load contained in the midgut or the mosquito carcass and the infectious status of the mosquito; crossing each anatomical barrier (midgut and salivary glands) requires a high viral load detected in the previous compartment. By examining the viral diversity in the different compartments of the mosquito, we were able to highlight viral variants present in the midgut and the carcass but absent in the infectious meal. Finally, we demonstrated that *Aedes albopictus* was competent to transmit the 5 YFVs, thus being able to act as a secondary vector. In view of these results, we can conclude that the risk of re-emergence and spread of YFV in the Caribbean is real and this risk depends on the virus/mosquito combination. These data could be a basis for the development of a map of mosquito vector competence, protocols for surveillance, vector control, and the design of emergency action plans.

Key words: yellow fever, Caribbean, *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, vector competence, viral diversity, emergence/reemergence.

Table des matières

REMERCIEMENTS	5
RESUME.....	8
ABSTRACT	10
LISTE DES FIGURES.....	17
LISTE DES TABLEAUX	21
LISTE DES ANNEXES	21
LISTE DES ABREVIATIONS	23
INTRODUCTION GENERALE	25
PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	29
<i>Chapitre 1 : Arbovirus et transmission vectorielle</i>	<i>33</i>
1.1. Les arbovirus	33
1.1.1. Généralités, définitions et classification	33
1.1.2. Distribution mondiale des arbovirus	34
1.2. Mécanismes à l'origine de la diversité virale.....	35
1.2.1. Mutations	35
1.2.2. Transferts de matériel génétique	36
1.2.3. Dérive génétique	37
1.3. Transmission vectorielle	37
1.3.1. Généralités sur les vecteurs	37
1.3.2. Cycles de transmission et concept d'émergence.....	38
1.3.2.1. Cycles de transmission	38
1.3.2.2. Définition de l'émergence	40
1.3.2.3. Facteurs en cause dans l'émergence des arbovirus	42
1.3.2.3.1. Changement d'hôtes et adaptation au vecteur	42
1.3.2.3.2. Intensification des échanges	43
1.3.2.3.3. Facteurs démographiques et urbanisation	44
1.3.2.3.4. Facteurs climatiques.....	45
1.3.3. Réplication et transmission des arbovirus par le vecteur moustique.....	46
1.4. Réponses antivirales.....	48
1.5. Evaluation de la transmission vectorielle	52
1.5.1. Compétence vectorielle.....	53
1.5.2. Capacité vectorielle	55
<i>Chapitre 2 : Les vecteurs moustiques d'importance médicale.....</i>	<i>60</i>
2.1. Vecteurs moustiques.....	60
2.2. Biologie des vecteurs.....	61
2.3. Aedes (Stegomyia) aegypti	65
2.4. Aedes (Stegomyia) albopictus	66
<i>Chapitre 3 : Lutte antivectorielle</i>	<i>73</i>
3.1. Lutte physique	73
3.2. Lutte chimique	74
3.2.1. Les organochlorés et les pyréthrinoïdes.....	74
3.2.2. Les organophosphorés et les carbamates	75
3.2.3. Les régulateurs de croissance	76
3.2.4. Les produits biocides	76
3.3. Résistances aux insecticides	76
3.3.1. Résistance génétique.....	77
3.3.2. Résistance métabolique	77
3.4. Lutte biologique	78
3.5. Les alternatives à la LAV	79
<i>Chapitre 4 : La fièvre jaune.....</i>	<i>83</i>

4.1.	Pathogénèse et épidémiologie	83
4.1.1.	Symptômes de la maladie	83
4.1.2.	Diagnostic	84
4.1.3.	Traitements et vaccins.....	85
4.1.3.1.	Traitements	85
4.1.3.2.	Vaccins.....	85
4.1.4.	Epidémiologie.....	86
4.2.	Contexte historique.....	88
4.2.1.	Emergence de la fièvre jaune dans la Caraïbe et en Amérique	88
4.2.2.	Découverte du vecteur de la fièvre jaune	89
4.2.2.1.	Carlos Finlay	89
4.2.2.2.	Walter Reed et la validation des travaux de Finlay	90
4.2.3.	Eradication du vecteur de la Caraïbe et d'Amérique puis ré-infestation.....	91
4.2.3.1.	1908, date de la dernière épidémie à la Martinique	91
Chapitre 5 : Le virus de la fièvre jaune.....		95
5.1.	Caractéristiques (isolement, structure et organisation du génome).....	95
5.2.	Cycle de réplication du virus de la fièvre jaune	95
5.3.	Distribution et phylogénie de YFV	97
5.4.	Cycles de transmission en Afrique et Amérique.....	99
Chapitre 6 : Contexte de la Caraïbe		105
6.1.	Les arbovirus d'importance médicale présents dans la Caraïbe	105
6.2.	Répartition de <i>Aedes aegypti</i> et <i>Aedes albopictus</i> dans la Caraïbe	106
6.2.1.	<i>Aedes aegypti</i>	106
6.2.2.	<i>Aedes albopictus</i>	107
6.3.	Contexte de la surveillance et de la lutte antivectorielle contre <i>Ae. aegypti</i> dans la Caraïbe.....	107
6.3.1.	Lutte antivectorielle	107
6.3.2.	Surveillance épidémiologique et entomologique	108
6.4.	Trinidad : maintenance et risque d'émergence au sein de la Caraïbe.....	110
6.4.1.	Vecteurs.....	110
6.4.2.	La fièvre jaune à la Trinidad et à l'extérieur de la Trinidad	110
6.5.	Transferts du virus des zones endémiques vers les zones non endémiques pour la fièvre jaune.....	111
OBJECTIF DE LA THESE		115
PARTIE II : MEMOIRE EXPERIMENTAL.....		117
Chapitre 7 : Matériels et Méthodes.....		121
7.1.	Matériels	121
7.1.1.	Population de moustiques.....	121
7.1.2.	Génotypes de virus.....	123
7.2.	Méthodes	124
7.2.1.	Production des stocks viraux	124
7.2.2.	Infections orales des moustiques	124
7.2.3.	Analyse de la compétence vectorielle	126
7.2.4.	Détection des particules virales.....	127
7.2.5.	Extractions des ARN viraux et séquençage.....	128
7.2.6.	Analyse des séquences virales	129
7.2.7.	Statistiques descriptives et comparaisons.....	130
RESULTATS		131
Chapitre 8 : Risque potentiel d'émergence du virus de la fièvre jaune dans la Caraïbe		135
PARTIE 1 : DETERMINATION DE LA COMPETENCE VECTORIELLE DES POPULATIONS DE MARTINIQUE POUR LES 5 SOUCHES DE YFV		137
Détermination des paramètres d'analyse de la compétence vectorielle.....		137
Les populations d'<i>Ae. aegypti</i> de la Martinique		140
8.1.	Taux d'infection.....	140
8.2.	Taux de dissémination.....	145
8.3.	Taux de transmission.....	149
8.4.	Comparaisons des 9 populations d' <i>Ae. aegypti</i> de Martinique.....	153

<i>Le nombre de particules virales détectées dans différents compartiments du moustique, Ae.aegypti de Martinique</i>	155
8.5. Le nombre de particules virales dans le tube digestif	155
8.6. Le nombre de particules virales dans la carcasse	159
8.7. Le nombre de particules virales dans la salive	163
<i>Le nombre de particules virales dans chaque compartiment en fonction du statut du moustique</i>	167
8.8. Le nombre de particules virales dans l'intestin moyen en fonction du statut des moustiques (avec ou sans dissémination)	167
8.8.1. A 14 jours post-infection	167
8.8.2. A 21 jours post-infection	170
8.9. Le nombre de particules virales dans la carcasse en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission)	172
8.9.1. A 14 jours post-infection	172
8.9.2. A 21 jours post-infection	174
8.10. Le nombre de particules virales dans l'intestin moyen en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission)	176
8.10.1. A 14 jours post-infection	176
8.10.2. A 21 jours post-infection	178
PARTIE 2 : DETERMINATION DE LA COMPETENCE VECTORIELLE DES POPULATIONS D'AE. AEGYPTI DE LA CARAÏBE ET D'AMERIQUE POUR LES 5 SOUCHES DE YFV	181
<i>Les populations d'Ae. aegypti de la Caraïbe</i>	181
8.11. Détermination de la compétence vectorielle	181
8.11.1. Taux d'infection	181
8.11.2. Taux de dissémination	183
8.11.3. Taux de transmission	185
8.12. Le nombre de particules virales détectées dans différents compartiments du moustique, Ae. aegypti de la Caraïbe	187
8.12.1. Le nombre de particules virales dans le tube digestif	187
8.12.2. Le nombre de particules virales dans la carcasse	190
8.12.3. Le nombre de particules virales dans la salive.....	192
<i>Les populations d'Ae. aegypti d'Amérique</i>	194
8.13. Détermination de la compétence vectorielle	194
8.13.1. Taux d'infection	194
8.13.2. Taux de dissémination	197
8.13.3. Taux de transmission	199
8.14. Le nombre de particules virales détectées dans différents compartiments du moustique, Ae. aegypti d'Amérique	201
8.14.1. Le nombre de particules virales dans le tube digestif	201
8.14.2. Le nombre de particules virales dans la carcasse	204
8.14.3. Le nombre de particules virales dans la salive.....	206
<i>Comparaisons des 6 populations d'Ae. aegypti de la Caraïbe et d'Amérique</i>	208
PARTIE 3 : DIFFERENCE DE COMPETENCE VECTORIELLE ENTRE AE. AEGYPTI ET AE. ALBOPICTUS	211
<i>Infection, dissémination et transmission</i>	211
8.15. A 14 jours post-infection	211
8.16. A 21 jours post-infection	212
8.16.1. Taux d'infection	212
8.16.2. Taux de dissémination	215
8.16.3. Taux de transmission	217
<i>Le nombre de particules virales détectées dans différents compartiments du moustique</i>	219
8.17. A 14 jours post-infection	219
8.18. A 21 jours post-infection	220
8.18.1. Le nombre de particules virales dans l'intestin moyen	220
8.18.2. Le nombre de particules virales dans la carcasse	223
8.18.3. Le nombre de particules virales dans la salive.....	224
<i>Chapitre 9 : Etude de l'impact des barrières anatomiques du moustique sur le virus de la fièvre jaune</i> ...	231
PARTIE 4 : ANALYSE DES POPULATIONS VIRALES DES MOUSTIQUES MORNE-ROUGE (MARTINIQUE) INFECTES AVEC 5 SOUCHES DE VIRUS DE LA FIEVRE JAUNE	233

<i>Evolution des populations virales</i>	233
<i>Diversité des populations virales</i>	236
9.1. Description des populations virales.....	237
9.1.1. Populations virales des productions et de l'intestin moyen des moustiques.....	238
9.1.2. Mutations communes entre les populations virales des intestins moyens et des carcasses de moustiques	241
9.1.3. Description des populations virales dans les différents compartiments du moustique en fonction du virus	244
9.1.4. Comparaison des populations virales dans les différents compartiments du moustique en fonction du statut infectieux	247
<i>Bilan</i>	249
DISCUSSION GENERALE	250
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	263
ANNEXES	283
PUBLICATIONS	289
AUTRES TRAVAUX	320

Liste des figures

- Figure 1 :** Les arbovirus appartenant à huit familles virales
- Figure 2 :** Récentes émergences d'arbovirus dans le monde
- Figure 3 :** Schéma représentant une quasi-espèce virale
- Figure 4 :** Cycles de transmission horizontale des arbovirus
- Figure 5 :** Cycles de transmission des arbovirus
- Figure 6 :** Schématisation des cycles de transmission et mise en évidence de la zone d'émergence
- Figure 7 :** Rôle du déplacement de voyageurs dans l'émergence
- Figure 8 :** Rôle de la complexité des interactions entre les moustiques vecteurs, les arbovirus et la transmission à travers des facteurs environnementaux
- Figure 9 :** Cycle du virus dans le moustique
- Figure 10 :** Les principales voies de signalisation du système immunitaire chez *Aedes aegypti*
- Figure 11 :** Représentation des voies de l'ARN interférence (ARNi)
- Figure 12 :** Les facteurs influençant la compétence et la capacité vectorielles
- Figure 13 :** Taxonomie d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus*
- Figure 14 :** Cycle de développement du moustique
- Figure 15 :** Cycle de développement du moustique et différents stades de développement
- Figure 16 :** Les deux espèces, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*
- Figure 17 :** Répartition mondiale d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus*
- Figure 18 :** Les principaux mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides
- Figure 19 :** Les différentes étapes de la fièvre jaune
- Figure 20 :** Carte de répartition du virus de la fièvre jaune
- Figure 21 :** Les membres ayant participé à la découverte du vecteur de la fièvre jaune
- Figure 22 :** Structure du virus
- Figure 23 :** Organisation du génome viral
- Figure 24 :** Régions endémiques pour la fièvre jaune et zones épidémiques depuis 1950
- Figure 25 :** Représentation phylogénétique des différentes souches de YFV
- Figure 26 :** Cycle de transmission du virus de la fièvre jaune
- Figure 27 :** Vecteurs du virus de la fièvre jaune
- Figure 28 :** Situation géographique des îles de la Caraïbe et l'île de Martinique
- Figure 29 :** Différentes étapes de l'infection expérimentale des moustiques en P3/I3
- Figure 30 :** Taux d'infection, dissémination et transmission d'*Ae. aegypti* Tartane (Martinique)
- Figure 31 :** Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen, la carcasse et la salive des moustiques *Aedes aegypti* Tartane (Martinique),
- Figure 32 :** Taux d'infection de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL
- Figure 33 :** Taux d'infection de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL.
- Figure 34 :** Taux de dissémination de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL
- Figure 35 :** Taux de dissémination de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL.
- Figure 36 :** Taux de transmission de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL
- Figure 37 :** Taux de transmission de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 38 : Taux d'infection, efficacité de dissémination et efficacité de transmission de 9 populations d'*Ae. aegypti* de Martinique vis-à-vis de 5 YFV

Figure 39 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL

Figure 40 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL

Figure 41 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la carcasse de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL

Figure 42 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la carcasse de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL

Figure 43 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la salive de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL

Figure 44 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la salive de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL

Figure 45 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans virus ayant disséminé dans la carcasse), examinés 14 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL

Figure 46 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans virus ayant disséminé dans la carcasse), examinés 21 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL

Figure 47 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la carcasse de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 14 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL

Figure 48 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la carcasse de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 21 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL.

Figure 49 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 14 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL

Figure 50 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 21 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL

Figure 51: Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la salive de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL

Figure 52 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans virus ayant disséminé dans la carcasse), examinés 14 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL

Figure 53 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans virus ayant

disséminé dans la carcasse), examinés 21 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10^7 ffu/mL

Figure 54 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la carcasse de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 14 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10^7 ffu/mL

Figure 55 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la carcasse de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 21 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10^7 ffu/mL

Figure 56 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 14 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10^7 ffu/mL

Figure 57 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 21 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10^7 ffu/mL

Figure 58 : Taux d'infection de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 59 : Taux de dissémination de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 60 : Taux de transmission de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 61 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de moustiques issus de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 62 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la carcasse de moustiques issus de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 63 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la salive de moustiques issus de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 64 : Taux d'infection de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 65 : Taux de dissémination de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 66 : Taux de transmission de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 67 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de moustiques issus de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 68 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la carcasse de moustiques issus de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 68 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la salive de moustiques issus de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 70 : Taux d'infection, efficacité de dissémination et efficacité de transmission de 6 populations d'*Ae aegypti* de la Caraïbe et d'Amérique vis-à-vis de 5 YFV (Bolivie, Ghana, Nigéria, Soudan, Ouganda)

Figure 71 : Taux d'infection (A), dissémination (B) et transmission (C) des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 14 jours après un repas infectieux contenant YFV Bolivie, fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 72 : Taux d'infection des moustiques, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 73 : Taux de dissémination des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 74 : Taux de transmission des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 75 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen (A), la carcasse (B) et la salive (C) des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti)

Figure 76 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 77 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la carcasse des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 78 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la salive des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL

Figure 79 : Arbre phylogénétique des génomes complets des 5 virus utilisés

Figure 80 : Phylogénie des séquences consensus majoritaires

Figure 81 : Nombre total de SNVs détectés dans les différents échantillons de populations virales

Figure 82 : Nombres de SNVs communs à toutes les populations virales (réplicas) des intestins moyens (intestins) ou des carcasses pour chaque virus

Figure 83 : Nombre de SNVs spécifiques des populations virales présentes dans les carcasses ou les intestins moyens (intestins) des moustiques pour chaque virus

Liste des tableaux

Tableau 1 : Descriptif des populations d'*Aedes aegypti* utilisées

Tableau 2 : Description des souches virales utilisées

Tableau 3 : Description du statut des moustiques infectés et séquencés, 21 jours après infection virale

Tableau 4 : Suivi de la mortalité d'*Ae. aegypti* Tartane (Martinique) à 14, 21 et 28 jour après un repas infectieux contenant YFV Bolivie

Tableau 5 : Comparaisons des populations virales issus des productions et de l'intestin moyen des moustiques en fonction du YFV utilisé

Tableau 6 : Détails des 35 mutations communes aux intestins moyens et aux carcasses, pour les moustiques infectés avec 5 YFV

Tableau 7 : Liste des mutations communes aux intestins moyens et aux carcasses des moustiques et non observées dans les productions

Tableau 8 : Liste des mutations communes à deux répliques et spécifiques des carcasses de moustiques capables de sécréter le virus dans la salive

Tableau 9 : Liste des mutations virales, communes à deux répliques et spécifiques des carcasses de moustiques capables de sécréter le virus dans la salive

Liste des Annexes

Annexe 1 : Liste des amorces utilisées pour l'amplification des génomes viraux pour le séquençage à haut débit

Annexe 2 : Tableau des SNVs (communs à tous les répliques) spécifiques (uniques) des populations virales des intestins moyens, pour YFV Bolivie, YFV Ghana, YFV Ouganda, et YFV Soudan, non détectées dans les populations virales des productions.

Annexe 3 : Liste des mutations des populations virales communes aux intestins moyens et aux carcasses des moustiques infectés avec chaque virus (Bolivie, Soudan, Ouganda, Ghana et Nigeria).

Annexe 4 : Taux d'infection de populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe et d'Amérique examinées 14 jours après un repas infectieux contenant YFV Bolivie

Annexe 5 : Facteurs associés à la transmission

Annexe 6 : Courbes ROC permettant d'identifier les moustiques capables de dissémination virale

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

Ae. : *Aedes*

ARS : Agence Régionale de Santé

ARN : Acide Ribonucléique

ARN db : ARN double brin

ARNi : ARN interférent

ARNm : ARN messenger

C6/36 : Cellules du moustique *Ae. albopictus*

CDC : Centers for Disease Control and Prevention (Centres pour le contrôle et la prévention des maladies)

CEDRE-LAV : Centre de Démoustication et de Recherches Entomologiques/Lutte antivectorielle

CHIKV : Virus du chikungunya (chikungunya virus)

CTM : Collectivité Territoriale de la Martinique

CVS : Cellule de Veille Sanitaire

DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane

DENV : Virus de la dengue (dengue virus)

ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay

FFU : focus forming Unit

FNV : Vaccin Neurotrope Français (French Neurotropic Vaccin)

G x G : interaction génotype x génotype

jpi : jours post-infection

LAV : Lutte antivectorielle

NS : non-structural

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PAHO : Organisation panaméricaine de la santé (OPS)

PBS : tampon phosphate salin

PIE : période d'incubation extrinsèque

QTL : Locus de caractères quantitatifs

RT-PCR : reverse transcriptase-polymerase chain reaction

SNVs : variants nucléotidiques uniques (single nucleotide variants)

spp : espèce

SVF : Sérum de veau foetal

WEEV : Virus de l'encéphalite équine de l'Ouest (West Equine Encephalitis Virus)

YF : fièvre jaune (Yellow Fever)

YFV : Virus de la fièvre jaune (Yellow Fever Virus)

ZIKV : Virus du Zika (Zika Virus)

Introduction générale

Les hommes et les maladies infectieuses coexistent depuis des milliers d'années. En effet, avec l'apparition de l'agriculture et la domestication des animaux, de nouveaux agents infectieux ont fait leur apparition au sein de groupes de populations, engendrant ainsi des épidémies meurtrières parfois dévastatrices pouvant même influencer le cours de l'histoire. Depuis l'antiquité et l'Égypte ancienne, les manifestations de ces maladies infectieuses ont été décrites et même si les propriétés contagieuses de ces dernières sont rapidement admises, leur origine et mode de transmission demeuraient un mystère. Ce n'est qu'à partir du milieu du 19^{ème} siècle qu'apparurent la « théorie du germe » défendu par Louis Pasteur et le « postulat de Koch » émis par Robert Koch, permettant d'établir un lien de cause à effet entre une maladie infectieuse et un microorganisme. C'est en 1898 que fût employé pour la première fois le mot « virus » dans le sens actuel du terme, par Martinus Willem Beijerinck quand il émit la notion de « *contagium vivum fluidium* » (la contagion vit dans les fluides) suite aux travaux menés en collaboration avec Mayer et Ivanovsky sur la maladie de la mosaïque du tabac en montrant ainsi le caractère filtrable des agents infectieux et leur capacité à être transmis (4). Au même moment, les travaux menés sur la maladie pied-main-bouche par Friedrich Löffler et Paul Frosch démontrèrent que l'agent infectieux filtrable est une particule solide de petite taille, une découverte qui a signé la naissance de la virologie (5) ; (6). Il existe actuellement plus de 2800 espèces de virus connu dans le monde, et bien d'autres encore à découvrir. On estime que ces derniers sont les entités biologiques les plus répandues sur la planète avec 10^{30} virions, un nombre bien supérieur au nombre de grains de sable présent sur Terre combiné au nombre d'étoiles estimé dans l'univers. L'histoire des maladies infectieuses transmises par les arthropodes vecteurs débute en 1878 quand Patrick Manson fut le premier à proposer le rôle d'un insecte vecteur dans la transmission de l'agent responsable de la filariose, la filaire *Wuchereria bancrofti* après observation du développement du nématode dans le moustique *Culex quinquefasciatus* gorgé sur un malade atteint de cette maladie (7); (8). Par la suite, le rôle du moustique *Aedes aegypti* dans la transmission de l'agent infectieux causant la fièvre jaune fut proposée en 1881 par le scientifique cubain Carlos Finlay et confirmé en 1900 par le médecin américain Walter Reed (7) ; (8). Ces découvertes furent à l'origine de l'arbovirologie, une discipline ayant pour but l'étude d'un nouveau groupe de virus, les arbovirus (de l'anglais *arthropod borne virus*), qui ont la particularité d'être transmis par des vecteurs arthropodes.

Ce groupe de virus transmis lors d'un cycle de transmission complexe faisant intervenir trois acteurs, le vecteur (arthropode), l'hôte vertébré (mammifère, oiseaux...) et l'agent pathogène (arbovirus), est responsable d'un groupe spécifique de maladies, les arboviroses. Sur le plan médical, les maladies à transmission vectorielle figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité chez l'homme liées aux maladies infectieuses. Elles représentent ainsi plus de 17% des maladies infectieuses dans le monde, avec des millions de cas et des milliers de morts (~ un million) chaque année (9) ; (10) ; (11), demeurant ainsi un problème de santé publique majeur. Parmi les plus importantes, figurent la dengue (12) ; (13), le chikungunya (14) ; (15) ; (16), le Zika (17) ; (18) et la fièvre jaune (19) transmis principalement par les moustiques vecteurs *Ae. aegypti* et *Aedes albopictus*. Au cours de ces dernières années, l'intensification des transports intercontinentaux, la croissance démographique et les changements de mode de vie, ainsi que les perturbations des écosystèmes ont favorisé l'émergence et la réémergence des arbovirus. Ainsi, les virus de la dengue (DENV), du chikungunya (CHIKV), du Zika (ZIKV), de la fièvre jaune (YFV) et leurs principaux vecteurs ont vu leur incidence et leur aire de distribution augmentées et occupent aujourd'hui des zones jusqu'ici indemnes pour certains de ces arbovirus.

Dans la Caraïbe et en Amérique, le premier signalement d'arboviroses remonte au 17^{ème} siècle durant la traite des esclaves avec l'arrivée du premier arbovirus émergent rapporté, le YFV et le premier moustique vecteur *Ae. aegypti* (20). Ce virus cause la fièvre jaune, une fièvre hémorragique mortelle. Après des siècles d'épidémies urbaines dévastatrices entre le 17^{ème} et le 20^{ème} siècle, la fièvre jaune n'est plus présente dans la Caraïbe dans les agglomérations urbaines (cycle épidémique urbain). Toutefois, ce virus subsiste dans un cycle enzootique dans les forêts tropicales de Trinidad et d'Amérique du Sud où il est maintenu entre les moustiques vecteurs selvatiques et les primates non humains. Aujourd'hui, les principaux arbovirus d'intérêt médical retrouvés dans la zone caribéenne sont le DENV, qui cause chaque année des épidémies plus ou moins intenses (21) ; à titre d'exemple, la Martinique a subi sept grandes épidémies durant les 20 dernières années, dont celle de 2010 qui fut particulièrement intense avec 40 000 cas et 18 morts (22). Le CHIKV, arrivé en 2013 dans la zone Américano-Caribéenne, fut la cause d'une large épidémie entre 2013 et 2015 causant plus d'un million et demi de cas dont plus de 72 000 cas et 83 morts en Martinique (23). Le ZIKV a émergé en Amérique et à la Caraïbe en 2015 entraînant ainsi une épidémie sans précédent qui toucha des centaines de milliers de personnes dont plus de 36 000 en Martinique (24).

Le YFV ayant le même moustique vecteur que le DENV, le CHIKV et le ZIKV, la question de la réémergence de ce virus au sein des îles de la Caraïbe reste très pertinente. En effet, la présence en abondance du moustique *Ae. aegypti*, l'arrivée d'*Ae. albopictus* dans la région et les conditions climatiques de la région tropicale favorable au développement du vecteur toute l'année ainsi que la présence d'une population immunologiquement naïve pour le YFV, créent des conditions propices à la réémergence de ce virus dans la Caraïbe. En effet, après les deux épidémies majeures que connut l'Amérique du Sud entre 2016 et 2018, frappant des zones encore vierges pour le virus à l'Est (25), ainsi que la grande épidémie qui sévit en Afrique en 2016 occasionnant des cas importés en Chine (26), les autorités de santé publique restent en alerte concernant une introduction du YFV *via* des cas importés en provenance des zones endémiques. Bien qu'un vaccin contre la fièvre jaune soit disponible, la couverture vaccinale reste encore faible. De ce fait, le risque d'introduction dans la zone caribéenne demeure élevé. La compétence vectorielle des moustiques constitue donc un paramètre important dans l'évaluation du risque d'émergence, qui varie en fonction du couple virus /moustique considéré. Dans la Caraïbe, très peu de données de compétence vectorielle sont disponibles en raison des restrictions de manipulation liées au YFV dans la zone caribéenne (27). Ces études peuvent néanmoins être menées en Amérique du Sud (28) ; (29).



Freepik

Partie I

Synthèse bibliographique

Sommaire

Chapitre 1

Arbovirus et la transmission vectorielle

Chapitre 2

Les vecteurs moustiques d'importance médicale

Chapitre 3

La lutte antivectorielle

Chapitre 4

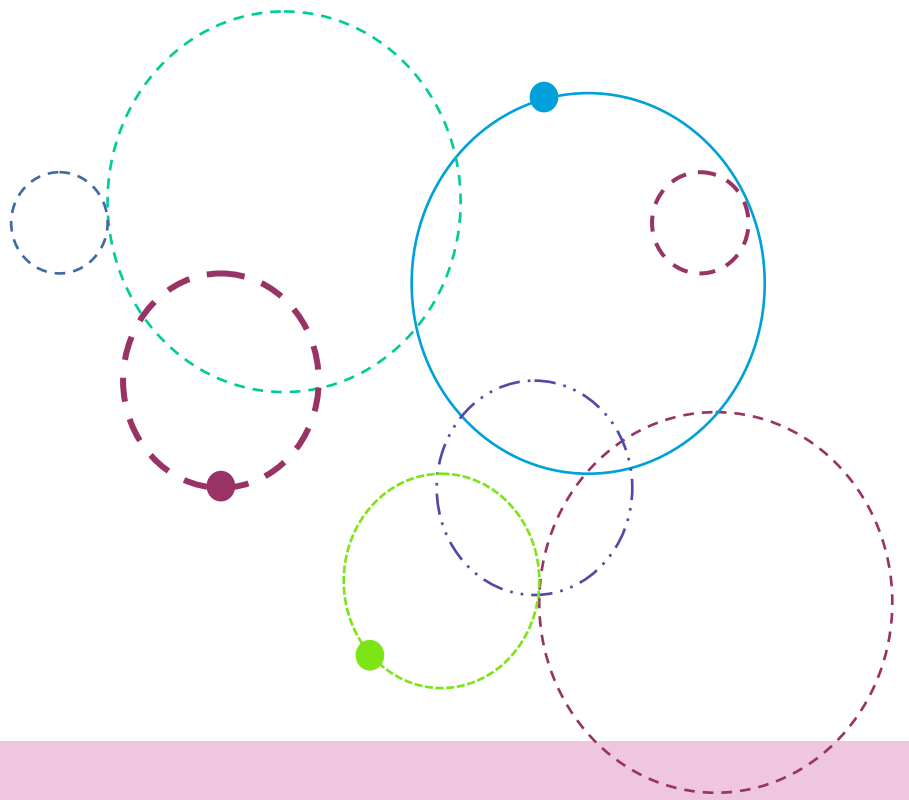
La fièvre jaune

Chapitre 5

Le virus de la fièvre jaune

Chapitre 6

Le contexte de la Caraïbe



Chapitre 1

Arbovirus et transmission vectorielle

Ce chapitre présente la complexité de l'interaction tripartite existant entre l'hôte vecteur, l'agent pathogène et l'hôte vertébré.

Dans ce chapitre, sont repris les généralités sur les arbovirus, les facteurs impliqués dans l'émergence et l'expansion. Enfin, la dernière partie est consacrée à un des concepts clés de l'entomologie médicale, la transmission vectorielle, les facteurs impliqués dans sa modulation et les méthodes de mesures utilisées pour son estimation.

Chapitre 1 : Arbovirus et transmission vectorielle

1.1. Les arbovirus

1.1.1. Généralités, définitions et classification

Le terme arbovirus désigne un groupe de virus transmis par les arthropodes vecteurs hématophages tels que les tiques, les phlébotomes, les culicoïdes et les moustiques à des hôtes vertébrés sensibles. Ces virus sont capables de se multiplier à la fois dans les cellules d'insectes et dans les cellules de vertébrés et se transmettent au cours d'un cycle de transmission plus ou moins complexe faisant intervenir trois acteurs : un vecteur, un hôte vertébré et un virus. On recense actuellement environ 534 arbovirus dans le monde dont environ 150 pouvant être pathogènes pour l'homme (30). Ces virus appartiennent à des groupes taxonomiques très divers se différenciant par leur structure, la composition de leur génome et la stratégie de réplication du génome viral. A l'exception de certains d'entre eux, les arbovirus appartiennent à huit familles virales : *Flaviviridae* (genre *Flavivirus*), *Togaviridae* (genre *Alphavirus*), *Nairoviridae* (genre *Orthonairovirus*), *Rhabdoviridae* (genre *Vesiculovirus*), *Phenuiviridae* (genre *Phlebovirus*), *Reoviridae* (genre *Orbivirus* et *Coltivirus*), *Peribunyaviridae* (genre *Orthobunyavirus*) et *Asfarviridae* (genre *Asfivirus*) (Figure 1). La majorité des arbovirus possède un génome constitué d'une molécule d'ARN (de polarité positive ou négative, segmenté ou non, simple brin ou double brin) à l'exception du virus du genre *Asfivirus* responsable de la peste porcine africaine possédant une molécule d'ADN double brin.

Les arbovirus constituent un réel problème de santé publique avec des conséquences socio-économiques majeures. Les plus importants en entomologie médicale sont ceux qui infectent l'homme. Les infections par arbovirus (arboviroses) possèdent un large éventail de symptômes allant de l'infection asymptomatique à des infections sévères, voire mortelles. Ces arboviroses sont généralement asymptomatiques et bénignes, mais peuvent évoluer et causer trois types de syndromes caractéristiques: (i) les maladies fébriles systémiques ou syndrome « dengue-like », (ii) les fièvres hémorragiques, et (iii) les maladies neurologiques invasives comme les méningo-encéphalites (30). Les arbovirus pathogènes pour l'homme appartiennent principalement à quatre familles virales : (i) les *Flaviviridae*, la plus grande famille comprenant les virus de la dengue (DENV), du Nil Occidental (WNV), du Zika (ZIKV), de la fièvre jaune (YFV), de l'encéphalite japonaise (JEV) et de l'encéphalite à tiques (TBEV), (ii) les *Togaviridae* comprenant les virus du chikungunya (CHIKV), Mayaro (MAYV), Sindbis

(SINV) et O'nyong-nyong (ONNV), (iii) les *Nairoviridae* (virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo ; CCHFV), et (iv) les *Phenuiviridae* (virus de la Vallée du Rift ; RVFV).

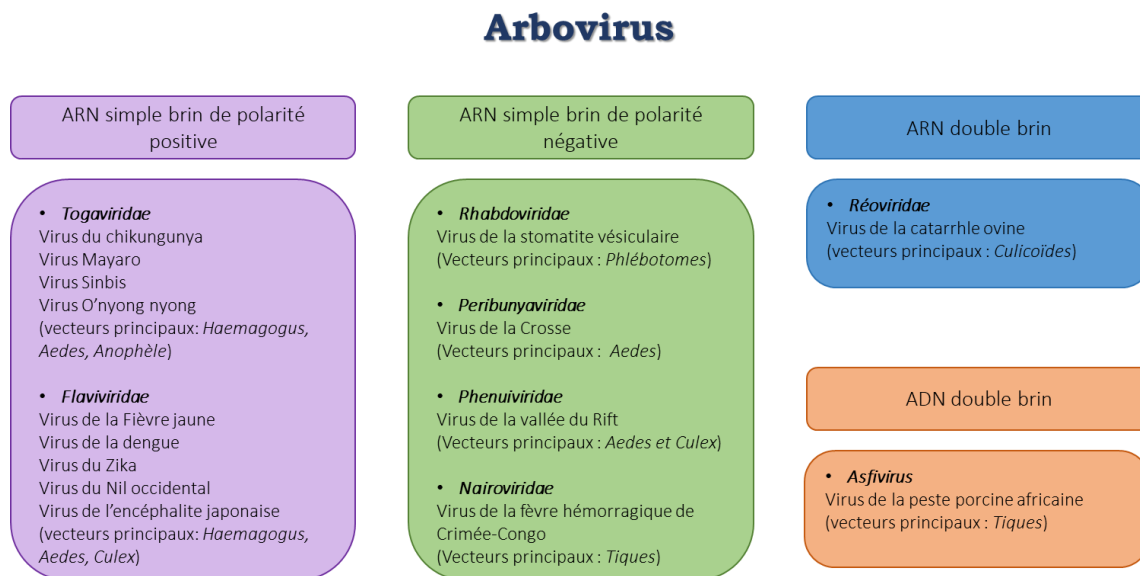


Figure 1 : Les arbovirus appartenant à huit familles virales. Les virus les plus connus sont indiqués pour chaque famille de virus, les principaux vecteurs sont indiqués entre parenthèses. Il est important de noter que tous les virus de ces familles ne sont pas des arbovirus.

1.1.2. Distribution mondiale des arbovirus

Les arbovirus sont présents sur les cinq continents, principalement en zones tropicales et subtropicales. Ce climat leur permet une transmission par les vecteurs présents pratiquement toute l'année (31). Cependant, depuis ces 40 dernières années, l'aire de répartition des arbovirus tend à changer et à s'étendre aux zones tempérées telles que l'Europe ou dans des zones jusqu'ici indemnes pour certains arbovirus (Figure 2). On peut citer par exemple le CHIKV qui a émergé en 2004 dans l'Océan Indien et s'est propagé vers l'Europe (Italie en 2007 (32) ; (33) et en France en 2010 (34), la Caraïbe et les Amériques en 2013 (35). De même, le ZIKV a émergé dans le Pacifique en 2007 et s'est disséminé dans le Pacifique (2013) puis en Amérique et dans la Caraïbe (2015) (36).

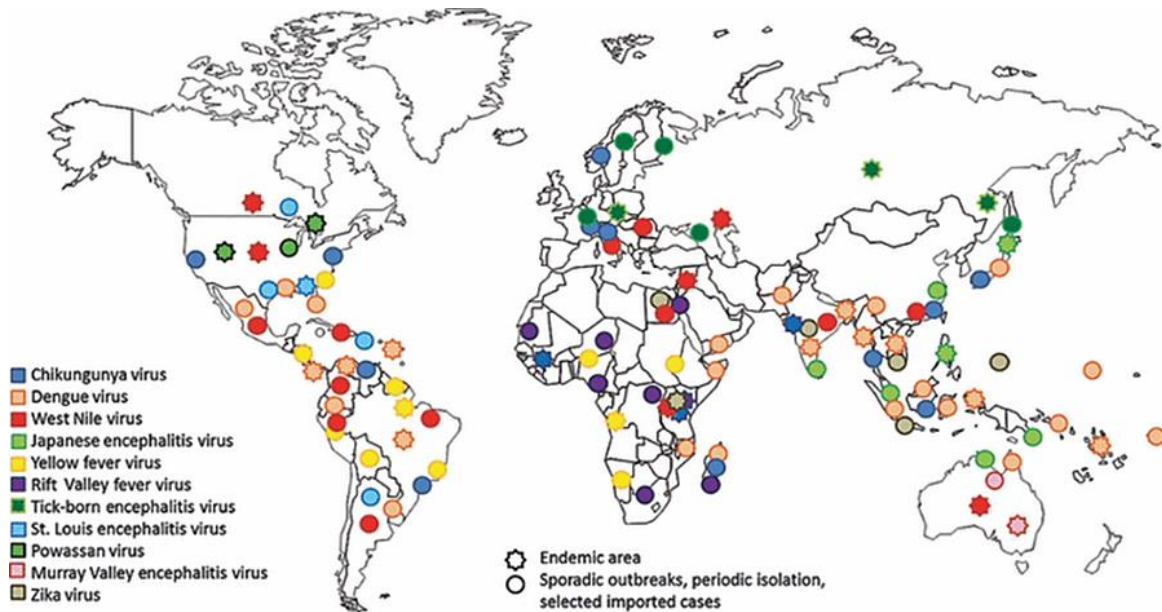


Figure 2 : Récentes émergences d'arbovirus dans le monde (tiré de (37))

1.2. Mécanismes à l'origine de la diversité virale

1.2.1. Mutations

Les virus possèdent un génome fortement modulable et sont dotés d'une capacité adaptative très impressionnante, leur permettant d'évoluer rapidement et ainsi de s'adapter aux rapides changements de l'environnement. L'un des mécanismes, source de diversité virale, est le processus de mutations ponctuelles (insertion, délétion ou substitution). Chez les virus à ARN dont les arbovirus, le taux de mutation est très élevé. En effet, contrairement aux ADN polymérases, les ARN polymérases virales sont des enzymes qui ne présentent pas d'activités correctrices exonucléases 5' → 3' (proof reading) et génèrent un taux d'erreur de l'ordre de 10^{-4} à 10^{-5} par cycle de réplication. Aussi lors de la phase d'élongation, elles génèrent entre 10 000 à 100 000 fois plus de mutations que les ADN polymérases (une mutation tous les 10^8 à 10^{11} nucléotides synthétisés) Ainsi, pour un génome de 10 kb, une erreur est introduite à chaque génome synthétisé pour un taux de mutation de 10^{-4} . (38). L'accumulation de toutes ces mutations couplées à une réplication rapide du génome viral permet de générer un pool de variants viraux au sein d'un hôte, les quasi-espèces. Ces quasi-espèces virales générées sont apparentées et organisées autour d'un génome consensus selon un processus d'équilibre entre mutation et sélection naturelle (Figure 3). L'ensemble de ces quasi-espèces virales

interagissent afin de s'adapter aux différentes pressions de sélection exercées par l'environnement. Ainsi, certaines mutations bénéfiques pourront être conservées par sélection et deviendront majoritaires alors que d'autres plutôt délétères ou neutres seront éliminées ou exprimées à bas bruit (39) ; (40).

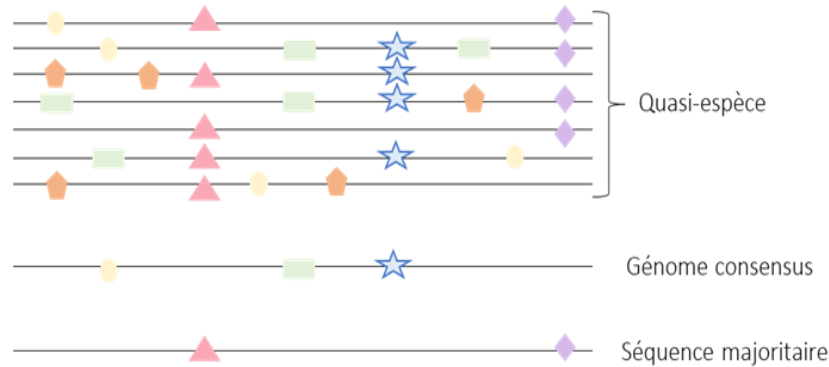


Figure 3 : Schéma représentant une quasi-espèce virale. Chaque ligne correspond à un génome viral qui possède sa propre séquence virale présente au sein d'un même hôte et n'affecte pas le génome consensus. Le génome consensus n'est pas obligatoirement présent au sein de la population. La séquence majoritaire correspond à la séquence de variants viraux la plus retrouvée parmi les virus séquencés.

1.2.2. Transferts de matériel génétique

Le transfert de gènes est une autre source de diversité génétique ; elle peut se produire selon deux processus, le réassortiment ou la recombinaison de gènes.

Le processus de réassortiment est observé lors d'échanges de segments de génomes entre deux virus de même espèce virale ou génétiquement proches lors de la co-infection de la même cellule. Ce processus s'adresse aux virus segmentés (41) : le virus Influenza (42) ; (43), et les arbovirus tels que le virus de la fièvre de la Vallée du Rift (44) ou le virus de la fièvre catarrhale ovine (BTV) (45).

Le processus de recombinaison virale intervient lors de la phase d'élongation du génome viral. Les polymérases virales étant faiblement processives permettront la formation de génomes viraux recombinants ou mosaïques au sein d'une même espèce virale (HIV-1 ; (46)). Ce processus permet également l'échange de fragments de matériel génétique par recombinaison homologue entre deux virus d'une même espèce lors de la co-infection d'une

même cellule ; l'exemple type pour les arbovirus est le virus de l'encéphalite équine de l'Ouest (WEEV) qui est le résultat de la recombinaison de deux virus proches, le virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV) et le virus Sindbis (SINV) (47).

1.2.3. Dérive génétique

La dérive génétique est un mécanisme de l'évolution causé par des événements liés au hasard. Ce processus résulte du sous échantillonnage d'une population et a lieu lorsque la taille de la population diminue de manière drastique ; on parle de goulot d'étranglement génétique (*genetic bottleneck*). Cette sous-représentation de la population qui a perdu en diversité génétique est capable de coloniser un nouvel environnement. Ce phénomène est souvent observé chez les virus lors du passage chez un nouvel hôte ou dans un nouvel organe (48). Chez les arbovirus, ce phénomène est observé lors du passage du virus de son hôte vertébré à son hôte invertébré. En effet, le virus va subir un épisode de goulot d'étranglement après chaque changement d'hôtes entraînant une sélection purificatrice où seule une fraction de la population virale apte à se répliquer dans l'hôte suivant sera en mesure de passer ce goulot d'étranglement et de se multiplier dans ce nouvel hôte. Ce mécanisme limite grandement l'évolution des arbovirus qui doivent être en mesure de se répliquer dans deux hôtes phylogénétiquement très éloignés. Ceci impose un compromis adaptif et la sélection de mutants apte à se répliquer après chaque changement d'hôtes (49). Ce phénomène de goulot d'étranglement génétique est également observé lors du passage des différentes barrières anatomiques dans le vecteur, permettant le passage d'une petite fraction de variants aptes à se répliquer dans les nouveaux tissus, renouvelant ainsi la diversité génétique (39) ; (50).

1.3. Transmission vectorielle

1.3.1. Généralités sur les vecteurs

Les arbovirus sont transmis par une variété d'arthropodes vecteurs au sein de différents cycles de transmission. Parmi les arthropodes vecteurs, on distingue les moustiques, les culicoïdes, les tiques, les phlébotomes ou encore les simulies. Dans la suite de ce manuscrit, ne seront considérés que les moustiques, les vecteurs majeurs d'arbovirus affectant la santé humaine. Les moustiques sont retrouvés principalement dans les zones tropicales et subtropicales du

globe où ils bénéficient d'un climat propice à leur développement et peuvent également être présents dans les régions tempérées.

1.3.2. Cycles de transmission et concept d'émergence

1.3.2.1. Cycles de transmission

Par définition, les arbovirus sont transmis biologiquement par les vecteurs, ces derniers devant se répliquer dans l'arthropode vecteur avant d'être transmis, par opposition à la transmission mécanique qui se fait *via* la contamination des pièces buccales (sans répllication dans le vecteur). On dénombre trois types de transmission des arbovirus : la transmission horizontale, la transmission verticale et la transmission vénérienne.

Le principal cycle de transmission permettant la propagation des arbovirus est la **transmission horizontale** (Figure 4). Elle permet le maintien du virus en circulation dans la nature. Elle fait intervenir trois partenaires : le vecteur, l'hôte vertébré et le virus. Les arbovirus sont à quelques exceptions près des agents zoonotiques qui se maintiennent dans la nature au sein d'un cycle selvatique entre des moustiques zoophiles et des animaux réservoirs majoritairement des mammifères (rongeurs, singes, chauve-souris) ou des oiseaux (51) La transmission à l'homme peut se faire de manière accidentelle par l'intermédiaire de moustiques anthro-po-zoophiles assurant le passage du virus de l'animal infecté à l'homme. L'homme est alors généralement une impasse épidémique, un hôte définitif ou accessoire qui ne contribue pas au cycle de transmission ; il ne développe pas une virémie suffisamment élevée et de longue durée permettant l'infection des arthropodes hématophages (cas du virus du Nil occidentale (WNV), EEEV, WEEV, virus Usutu (USUV), etc..). Dans le cas des grandes épidémies urbaines, l'homme agit comme un hôte amplificateur, capable de développer une virémie suffisante pour l'infection de nouveaux vecteurs ; le virus circule ainsi entre le moustique vecteur anthropophile et l'homme au sein d'un cycle urbain (cas du YFV, DENV, CHIKV, ZIKV).

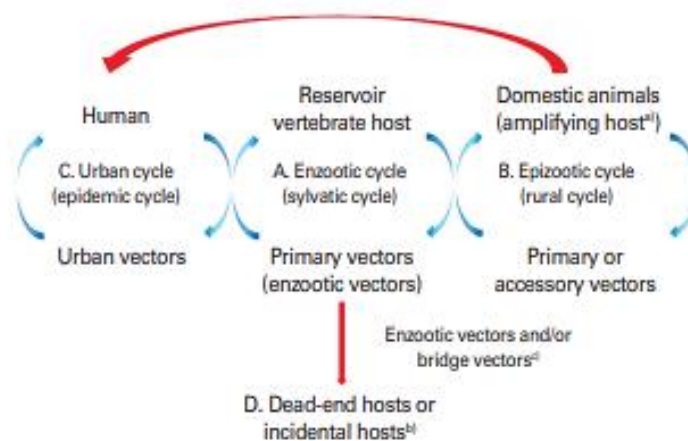


Figure 4 : Cycles de transmission horizontale des arbovirus (tiré de (51))

La **transmission verticale** correspond à la transmission du virus par la femelle infectée à sa descendance ; elle est peu fréquente chez les moustiques. On distingue la transmission trans-ovarienne et la transmission trans-œuf. La transmission trans-ovarienne s’observe quand l’agent infectieux infecte les tissus germinaux dans les ovaires. La transmission trans-œuf se produit quand le virus pénètre dans l’œuf *via* le micropyle lors de la ponte (52). La transmission verticale semble être un phénomène rare et limité ; on la retrouve notamment dans 1,4 % des cas pour la fièvre jaune (52) ;(53) ; (54), 2 % pour le Zika (55) ; (56) et ~1% pour la dengue (57-59)). Elle permet la persistance du virus dans la nature lors de conditions défavorables à l’activité des moustiques (sécheresse, froid, absence d’hôtes réceptifs) (60) ; (61) ; (62) (Figure 5).

La **transmission vénérienne** se produit quand un mâle infecté – par transmission verticale – transmet le virus à une femelle lors de l’accouplement. Ce phénomène est très rare, voire anecdotique ; il a été observé pour le DENV (avec une transmission du mâle à la femelle) (57) ou encore pour le ZIKV (avec transmission du mâle à la femelle et inversement) (63) (Figure 5).

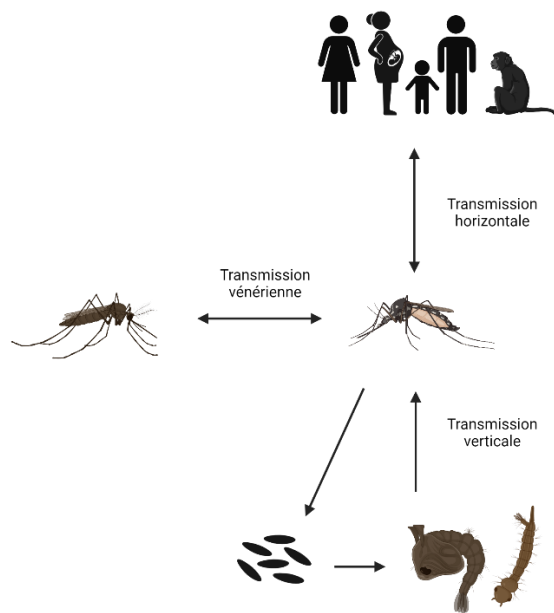


Figure 5 : Cycles de transmission des arbovirus. La transmission horizontale se réalise entre les vertébrés et les vecteurs arthropodes, la transmission verticale de la femelle moustique infectée à la descendance et la transmission vénérienne d'un mâle moustique infecté à une femelle et *vice versa*.

1.3.2.2. Définition de l'émergence

La transition du cycle selvatique au cycle urbain se réalise dans une zone intermédiaire qu'on nomme aussi zone d'émergence ; elle correspond à la mise en contact accidentelle entre le cycle enzootique et l'homme ou les animaux domestiques. Ce contact peut se réaliser par l'intermédiaire de moustiques anthropo-zoophiles (appelés aussi vecteurs relai) qui assurent le transfert du virus de l'animal à l'homme. L'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) définit une maladie émergente comme étant une maladie dont l'incidence réelle augmente de manière significative dans une population ou une région donnée et pendant une période donnée par rapport à la situation épidémiologique habituelle. L'émergence peut se résumer à l'introduction, l'installation et la diffusion d'un vecteur, d'un hôte ou d'un agent pathogène dans une zone donnée où la population est immunologiquement naïve pour le virus. Elle dépend de différents facteurs environnementaux et de facteurs intrinsèques au vecteur, à l'hôte et au virus (Figure 6).

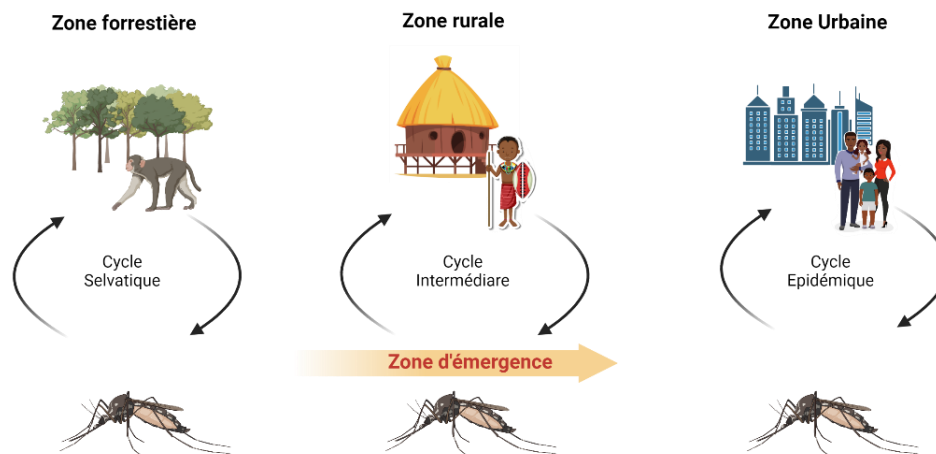


Figure 6 : Schématisation des cycles de transmission et mise en évidence de la zone d'émergence

1.3.2.3. Facteurs en cause dans l'émergence des arbovirus

Les arbovirus affectant l'homme aujourd'hui étaient à l'origine responsables de zoonoses maintenues entre un vecteur et un animal réservoir. Divers changements environnementaux ont permis aux arbovirus de franchir la barrière d'espèces et infecter l'homme. Ces changements environnementaux majeurs ont favorisé la modification de l'équilibre précaire existant entre les dynamiques de populations d'hôtes vertébrés et les virus pouvant les infecter. Ces facteurs peuvent être d'origine naturelle (inhérent au vecteur et au virus) ou de nature anthropique (facteurs démographiques, sociétaux ou encore environnementaux), engendrés généralement par l'homme aboutissant à des changements d'écosystèmes favorables aux émergences des arboviroses (64).

1.3.2.3.1. Changement d'hôtes et adaptation au vecteur

En effet, certains variants viraux peuvent être sélectionnés car ils présentent un avantage sélectif dans un nouveau vecteur. L'exemple type est celui du CHIKV. Durant l'épidémie de chikungunya survenue sur l'île de la Réunion en 2005, une substitution Alanine → Valine en position 226 de la glycoprotéine d'enveloppe E1 (E1-A226V), intervenant dans l'attachement

du virus à la cellule fut sélectionnée chez *Ae. albopictus* dans un lieu où ce vecteur est majoritaire (65). Cette mutation a eu pour conséquence une meilleure transmission du virus par *Ae. albopictus* (66);(67). Dans un second temps, une autre substitution Leucine → Glutamine en position 210 de la glycoprotéine d'enveloppe E2 (E2-L210Q) fut sélectionnée augmentant l'infection et la dissémination du virus dans ce vecteur (68) ; (69) ; (70).

1.3.2.3.2. Intensification des échanges

La mondialisation est un facteur important qui contribue à la propagation des arboviroses. En effet, la fréquence et la rapidité des transports actuels ont fourni des moyens de propagation rapide aux vecteurs (commerce de marchandises...), aux virus, et aux hôtes vertébrés (commerce d'animaux, échanges touristiques...) (71, 72) ; (73).

Expansion des vecteurs

Deux cas typiques d'expansion de vecteurs sont ceux des moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Il y a environ 400 ans, *Ae. aegypti* fut transporté par bateau depuis les côtes africaines vers le nouveau monde où il trouva des conditions climatiques propices à son installation et son expansion. En 400 ans, *Ae. aegypti* a colonisé la majorité des zones tropicales et subtropicales du globe (74). En comparaison, grâce à la mondialisation et au commerce de pneus, en seulement quatre décennies, le moustique *Ae. albopictus* originaire d'Asie du Sud-est s'est répandu sur les cinq continents dans les zones tropicales, subtropicales et tempérées. Les caractéristiques biologiques de ses œufs, résistants à la sécheresse et aux basses températures, ont permis à l'espèce d'étendre son aire de distribution au-delà de la zone subtropicale en empruntant les moyens de transports aériens et terrestres (75) (76).

Transports des virus

Les échanges entre les pays ont toujours représenté une source d'expansion des virus. Les échanges touristiques et commerciaux entre les zones endémiques pour les arbovirus et celles non endémiques ont considérablement augmenté ces dernières décennies. Le déplacement des hôtes infectés représente une des principales voies d'introduction des agents pathogènes sur un territoire. Ces cas importés sont la source de contamination pour les vecteurs locaux qui peuvent ainsi amorcer une épidémie (Figure 5). Les exemples sont nombreux : on peut citer

l'importation et la propagation du YFV en Amérique et dans la Caraïbe depuis le continent africain durant la traite des esclaves aux 15^{ème} siècle occasionnant de nombreuses épidémies (77) ; (78) ; (79). L'expansion du CHIKV à partir des îles de l'Océan Indien vers l'Europe où de nombreux cas autochtones ont été recensés, en Italie en 2007 (33) et en France en 2010 (80). Le ZIKV qui a émergé sur l'île de Yap en Micronésie en 2007 (17) s'est répandu dans tout le Pacifique (81) puis en Amérique latine et la Caraïbe en 2015 (36). Par ailleurs, le WNV a été introduit dans les années 1990 aux USA *via* des oiseaux migrateurs en provenance d'Israël (82) (Figure 7).

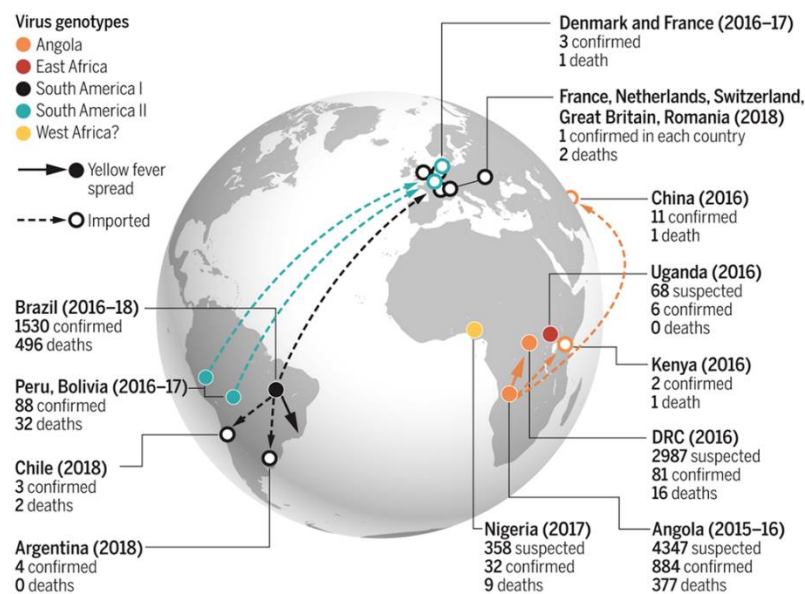


Figure 7 : Rôle du déplacement de voyageurs dans l'émergence, exemple de la fièvre jaune. Epidémies de fièvre jaune entre 2016 et 2018, de nombreux foyers de cas suspects et confirmés de fièvre jaune ont été recensés, entraînant des cas importés dans d'autres pays (flèches en pointillés), mais ceux-ci n'ont pas entraîné de cas secondaires (tiré de (83))

1.3.2.3.3. Facteurs démographiques et urbanisation

Le développement économique qui a suivi la 2^{ème} guerre mondiale a favorisé une croissance démographique et de nombreux changements sociétaux qui ont influencé la dynamique de transmission des arboviroses. En effet, l'urbanisation anarchique, la déforestation, la

construction de retenues d'eau comme les barrages, le développement de systèmes d'irrigation et d'évacuation des eaux usées mais aussi la mauvaise gestion des déchets, ou encore l'absence ou la vétusté des systèmes d'adduction d'eau, ont contribué à favoriser le développement des populations de moustiques et intensifier les contacts entre l'homme et les moustiques vecteurs (84) (85) (71).

1.3.2.3.4. Facteurs climatiques

Les changements climatiques peuvent avoir un impact sur la distribution de nombreux agents infectieux et notamment ceux qui sont transmis par des arthropodes vecteurs en modifiant leurs distributions ou leurs compétences vectorielles. En effet, une augmentation de la température peut favoriser l'expansion et l'installation des moustiques au-delà de leur aire de distribution habituelle. Ce fut par exemple le cas pour le virus de la fièvre catarrhale ovine transmis par les culicoïdes. L'augmentation de température a permis l'expansion des culicoïdes vers le nord de l'Europe méridionale, ce qui a eu pour conséquence l'expansion de la souche BTV-8 du virus (9). De plus, la transmission de certains arbovirus par les moustiques du genre *Aedes* peut être impactée par des changements de températures. Elle peut ainsi être plus forte en conditions de températures élevées pour le DENV (86); (87) et le ZIKV (88) ou plus faible en conditions de température basse pour le CHIKV (89) ou le ZIKV (90) (Figure 8).

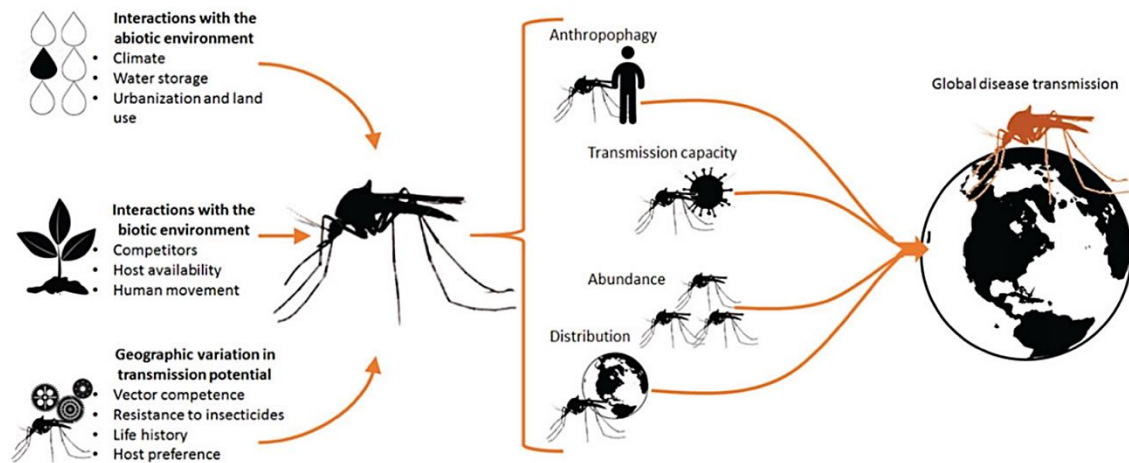


Figure 8 : Rôle de la complexité des interactions entre les moustiques vecteurs, les arbovirus et la transmission à travers des facteurs environnementaux tiré de (91).

1.3.3. Réplication et transmission des arbovirus par le vecteur moustique

Le cycle de réplication et de transmission des arbovirus se déroule au sein du moustique vecteur et se divise en plusieurs étapes (92); (93). La transmission dépend d'interactions complexes entre le vecteur et le virus. Le virus doit franchir toutes les barrières anatomiques (tissus et organes) du moustique et atteindre les glandes salivaires pour être transmis lors de la pique *via* la salive (92); (93) (Figure 9). Plus précisément, le virus est ingéré par la femelle lors d'un repas sanguin prélevé sur un hôte vertébré en phase virémique. Les particules virales ingérées entrent en contact avec les cellules de l'épithélium digestif. Grâce à une reconnaissance entre une protéine virale et un récepteur présent à la surface de l'épithélium digestif, le virus pénètre dans la cellule avant d'être détruit par les enzymes digestives ou avant la formation de la membrane péritrophique, une structure à base de chitine (riche en protéines et glycoprotéines présentant des pores de 20-30 nm) qui isole le bol alimentaire de l'épithélium digestif empêchant ainsi le passage tardif du virus (94); (92). Le virus subit une phase de réplication intense et les virions néoformés sont libérés dans la cavité générale ou hémocoèle après avoir traversé la lame basale qui soutient les cellules de l'épithélium. La cavité générale contient l'hémolymphe, un fluide circulatoire des arthropodes jouant un rôle analogue à celui du sang des vertébrés, qui assure la dissémination du virus. Le tube digestif constitue ainsi la première barrière anatomique (aussi appelé barrière d'infection de l'intestin

moyen) qui bloque la dissémination du virus 6 à 12 heures après la prise du repas de sang selon les espèces. (92) ; (95) ; (96) ; (94).

Dans la cavité générale, les virions infectent différents organes internes dont le corps gras, les organes reproducteurs, les tissus nerveux et les glandes salivaires. Parvenu aux glandes salivaires, le virus devra traverser la lame basale soutenant les acini composant les glandes salivaires, se répliquer dans les cellules et être libéré dans la salive excrétée par le moustique. Cette étape clé permet la transmission du virus à un nouvel hôte vertébré quand le moustique injecte sa salive lors de la prise d'un nouveau repas de sang (95).

La période s'écoulant entre l'ingestion du repas sanguin infectieux et la présence de particules virales dans la salive correspond à la période d'incubation extrinsèque (PIE) (97). La PIE est un paramètre extrêmement important dans la transmission vectorielle car la femelle moustique devra survivre au-delà de cette période pour être capable de transmettre le virus. La PIE varie fortement en fonction de la température (plus la température est élevée et plus la PIE sera courte, à l'inverse plus la température sera basse, plus la PIE sera longue (98) ; (99). La PIE varie également en fonction de la quantité de virus ingéré et du couple virus-moustique (92) ; (100) ; (101). Elle est expérimentalement de 2-3 jours pour *Ae. aegypti* infecté avec le CHIKV (102), de 10-12 jours pour *Ae. aegypti* infecté avec le YFV (103) ; (104), de 14 jours pour *Ae. aegypti* infecté avec le ZIKV (105). De plus une fois infectée, la femelle moustique le restera toute sa vie.

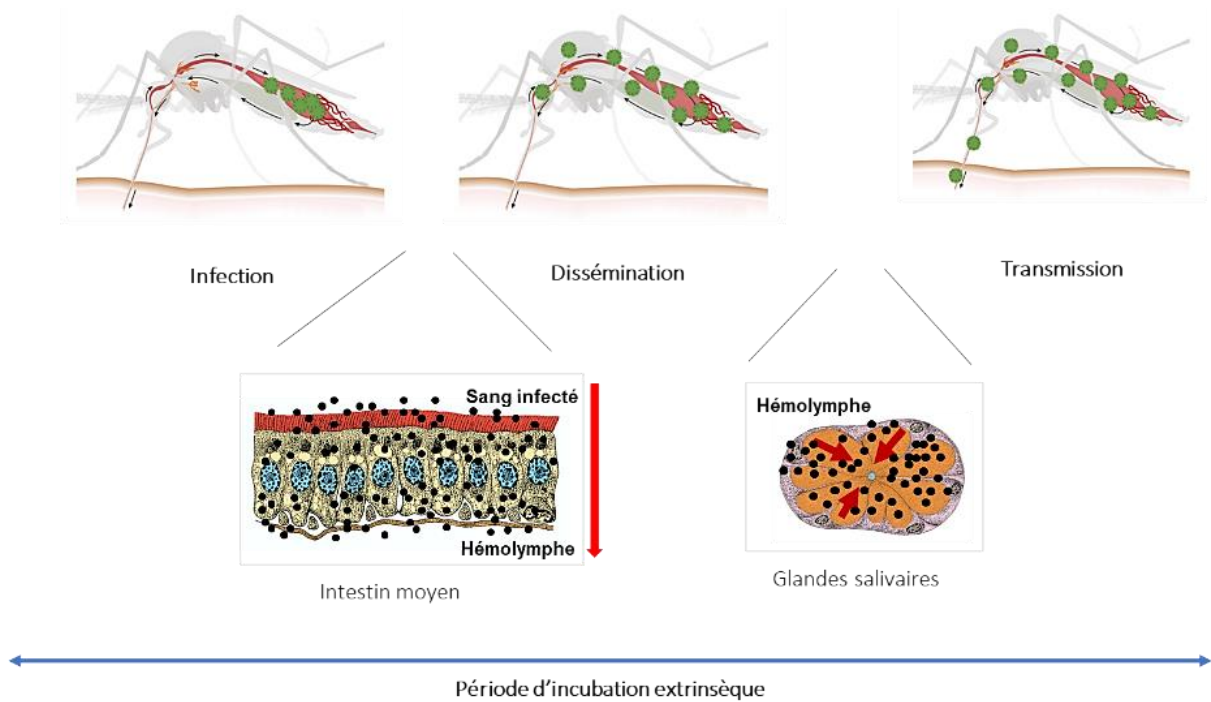


Figure 9 : Cycle du virus dans le moustique. L'**infection** correspond à la réplication du virus dans l'intestin moyen après l'ingestion d'un repas de sang infectieux prélevé sur un hôte en phase virémique. La **dissémination** correspond au passage du virus dans la cavité générale du moustique à travers la barrière de l'intestin moyen et à l'infection des autres organes internes via l'hémolymphe. La **transmission** est le passage du virus à travers la barrière des glandes salivaires afin d'atteindre la salive qui sera excrétée par la femelle. La **période d'incubation extrinsèque** est l'intervalle de temps entre l'acquisition de l'agent pathogène par le vecteur et sa capacité à le transmettre à un hôte vertébré réceptif. Les flèches rouges représentent le sens de circulation de l'agent pathogène.

1.4. Réponses antivirales

Au cours de la réplication virale, les mécanismes de défense du moustique se mettent en place. Le moustique, comme tous les insectes ne possède pas d'immunité adaptative contrairement aux vertébrés mais seulement une immunité innée. Dans l'hémocoèle du moustique, le virus se retrouve en contact avec les cellules immunitaires (réponse cellulaire) et les facteurs de la réponse humorale produits par les hémocytes (granulocytes, oenocytoides, adipohémocytes, prohémocytes, thrombocytoides). Les cellules péricardiques et le corps gras interviennent dans la réponse immunitaire du moustique qui est composée de deux voies majeures : (i) la réponse cellulaire responsable de la phagocytose et l'encapsulation des micro-organismes, la nodulation et l'activation des cascades protéolytiques permettant la

mélanisation et (ii) la réponse humorale médiée par les hémocytes et les cellules épithéliales permettant la synthèse de peptides antimicrobiens (AMPs) comme les défensines et les lysozymes, des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS pour *Reactive Oxygen Species*) libérés dans l'hémolymphe par le corps gras (106). Parmi les principaux mécanismes de défense du moustique face à une infection virale, on peut citer les voies de signalisation Toll, JAK/STAT (*Janus Kinase-Signal Transducer and Activator of Transcription*), Imd (*Immune Deficiency*), ainsi que la réponse par ARN interférence.

Les voies Toll, JAK/STAT et Imd sont déclenchées par la reconnaissance des agents pathogènes au niveau des *Pattern Recognition Receptors* (PRRs) activant une cascade de kinases et/ou protéases conduisant à la translocation au noyau de facteurs de transcription (respectivement Rel 1, STAT et Rel 2) régulant l'expression d'effecteurs antimicrobiens (cécropine, défensine, gambicine etc). **La voie Toll** est importante dans la régulation de l'infection virale par le DENV ou d'autres *flavivirus* chez *Ae.aegypti*(107); (108), (109) Cependant, elle ne semble pas intervenir lors de la régulation de l'infection par le CHIKV et le virus de la forêt de Semliki-(110, 111). **La voie Imd** est impliquée dans le mécanisme de défense/régulation contre les bactéries, notamment après un repas de sang où on note une augmentation significative du nombre de bactéries contenues dans l'intestin du moustique (112), (107), (113). Cette voie est également impliquée dans la réponse antivirale lors de l'infection d'*Ae. aegypti* par le CHIKV en diminuant la réplication du virus, elle semble plus spécifique des infections par les *alphavirus* (110) ; (111) ; (114). **La voie JAK/STAT**, quant à elle, est connue pour son rôle antiviral chez *Ae. aegypti* en diminuant la réplication du DENV (16) ; (115) (116) et chez *Culex* en diminuant la réplication du WNV (117) (Figure 10).

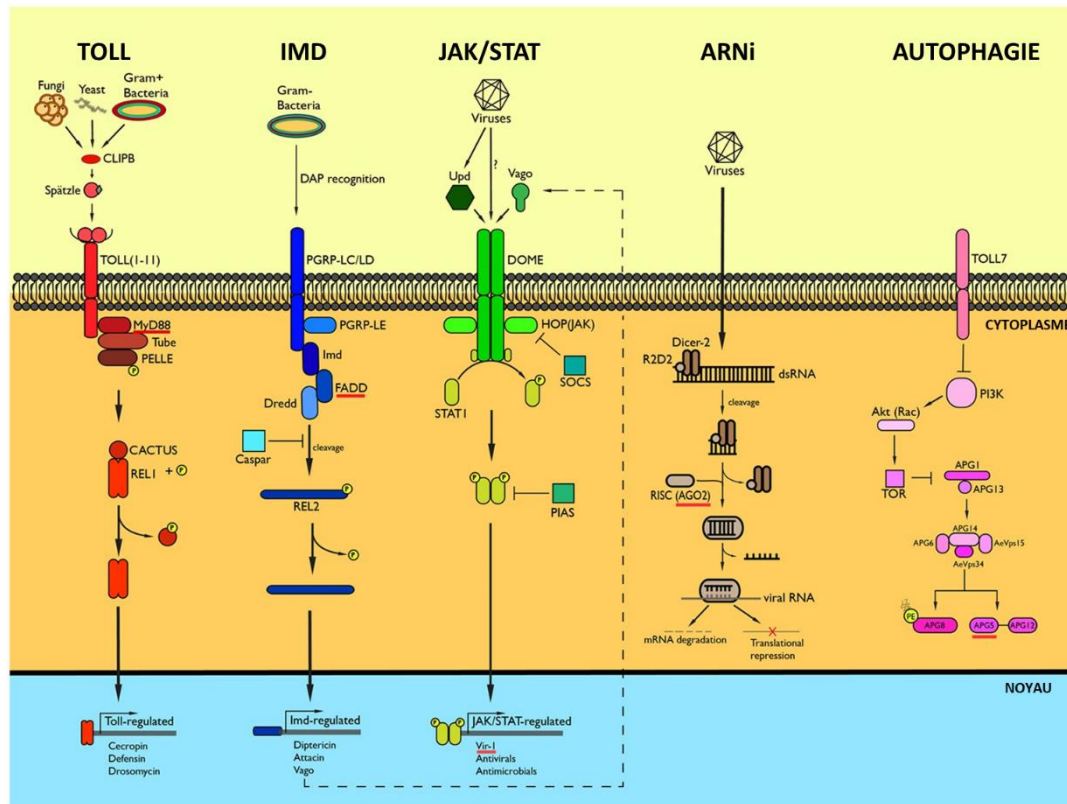


Figure 10 : Les principales voies de signalisation du système immunitaire chez *Aedes aegypti*. (tiré de (118))

La voie de l'ARN interférence (ARNi) est le mécanisme antiviral le plus efficace et le plus étudié chez les insectes. Il existe trois voies principales d'ARN interférence basées sur l'action de trois types de petits ARN ou « *small RNA* » : (i) les micro-ARN (*miRNA* pour *microRNA*), (ii) les petits ARN interférents (*siRNA* pour *small interfering RNA*) et (iii) les ARN interagissant avec les protéines *Piwi* (*piRNA* pour *Piwi-interacting RNA*). Ces trois voies sont principalement activées par la présence d'ARN spécifique, endogènes (issus de la cellule) ou exogènes (issu du virus). Elles reposent sur la reconnaissance et le clivage d'ARN simple ou double brin de tailles variables en molécules d'ARN de 13 à 30 nucléotides. Chaque type de petits ARN sera prise en charge par des complexes ribonucléoprotéiques (RNP) spécifiques permettant la régulation de l'expression transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle de transcrits complémentaires à ces petits ARN. La **voie siRNA** joue un rôle critique dans l'immunité antivirale de la cellule. Au cours de la réplication virale, des ARNs double brin sont produits et clivés par la protéine Dicer-2 (Dcr-2) *via* son site

d'interaction en v-siARNs (virus derived RNA) en ARNs de 22 nucléotides. Le complexe multiprotéique RISC (RNA-induced silencing complex) activé par l'enzyme C3PO utilise un des brins v-siARN comme guide pour la reconnaissance des ARN viraux. Il s'en suit la dégradation complète de ces derniers par l'endonucléase Ago2 (Argonaute-2) (119); (120). Cette voie est impliquée dans l'immunité contre les virus SINV, CHIKV et DENV (121); (110); (122). La **voie miRNA** est importante pour le développement embryonnaire et la régulation de l'expression des gènes endogènes. Les miRNA sont produits de manière endogène; ce sont des structures en tige boucle désappariées qui sont clivées par les endonucléases Drosha puis Dicer-1 produisant les miRNA (123). L'endonucléase Ago1 du complexe RISC permet la dégradation des ARNm cibles aboutissant à l'interruption de la traduction de l'ARN cible (même procédé que pour les siRNA). Cette voie est impliquée dans la régulation de l'infection par DENV, ZIKV et CHIKV (121); (124); (125); (126) avec un effet proviral observé pour le DENV (127). Enfin, la **voie piRNA** est impliquée dans la régulation de la transcription et de la transposition des éléments mobiles du génome dans les cellules germinales et embryonnaires (120). Elle est indépendante de Dicer. Les ARNs simple brin de 20-24 nucléotides sont reconnus par les protéines de la famille Piwi (*P-element induced wimpy testis*) comprenant les protéines Zucchini (Zuc), Piwi, Aubergine (Aub) et Ago3 (128). Cette voie intervient dans la réponse antivirale contre DENV, SINV, CHIKV et RVFV (129); (130); (131); Léger et al., 2013; Miesen et al., 2016; Scott et al., 2010) (Figure 11).

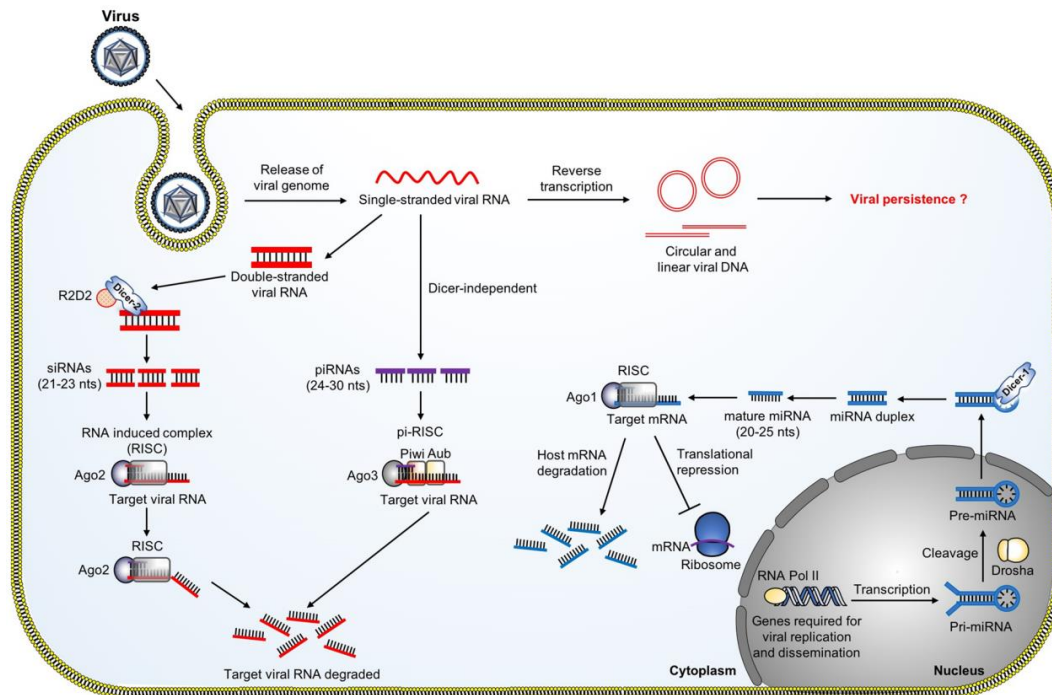


Figure 11 : Représentation des voies de l'ARN interférence (ARNi) (tiré de (2))

D'autres mécanismes peuvent également intervenir dans la réponse antivirale comme la voie de l'autophagie. Cette voie est impliquée dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en cas de stress et dans la différenciation et le développement embryonnaire (132) ; (133). L'autophagie semble avoir un effet antiviral sur les arbovirus tel que le DENV et le CHIKV (134) ; (135) ; (136), ou protecteur contre les arbovirus tel que le RVFV en limitant la réplication du virus et en prévenant la mortalité de la drosophile (137)(Figure 10).

1.5. Evaluation de la transmission vectorielle

Tous les moustiques ne sont pas vecteurs d'arbovirus. En effet, la transmission vectorielle d'un arbovirus par un vecteur correspond à l'habilité de ce dernier à pouvoir transmettre ce virus. La transmission vectorielle peut être déterminée grâce à la mesure de deux paramètres clés : la compétence vectorielle et la capacité vectorielle (Figure 12).

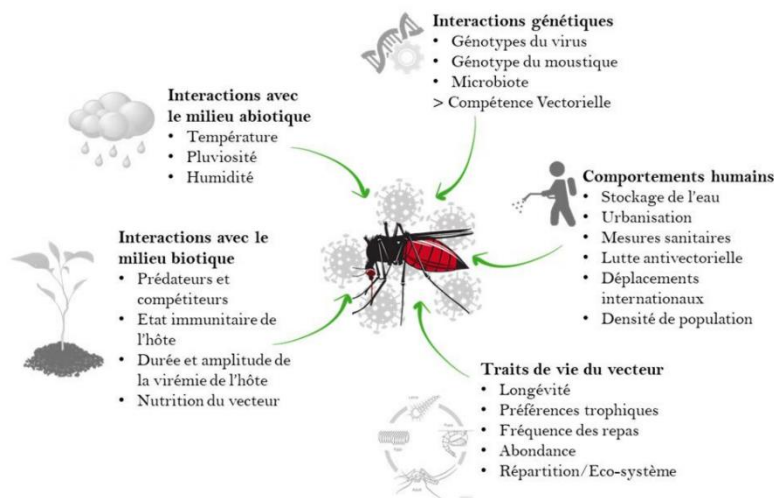


Figure 12 : Les facteurs influençant la compétence et la capacité vectorielles (d’après R. Bellone)

1.5.1. Compétence vectorielle

La compétence vectorielle est définie par la capacité d’un vecteur à être infecté par un virus lors de la prise de repas de sang sur un hôte vertébré en phase virémique (homme ou animal), à assurer la réplication virale et enfin à transmettre le virus au cours de la prise d’un repas de sang sur un nouvel hôte vertébré (92).

L’évaluation de la compétence vectorielle est réalisée en mesurant trois indices qui décrivent : **(i)** l’infection du tube digestif par le virus, **(ii)** la dissémination de ce dernier dans l’organisme du vecteur et **(iii)** la transmission du virus *via* la salive. La compétence vectorielle dépend des interactions entre des facteurs extrinsèques (dose de virus ingéré, la température...) et des facteurs intrinsèques dépendant du génotype du virus et du vecteur et de leurs interactions spécifiques. Les interactions Génotype X Génotype déterminent le niveau de réceptivité du vecteur à l’agent pathogène (138). La spécificité du couple virus-moustique peut atteindre un niveau d’exclusivité qui s’illustre par une restriction d’hôtes ; on peut prendre l’exemple du virus O’nyong nyong (ONNV) et du moustique du genre *Anophèles*. Le moustique *Anophèles gambiae* principalement connu pour être le vecteur responsable de la transmission de l’agent causal du paludisme, *Plasmodium falciparum*, est également capable de transmettre le

ONNV, un des rares arbovirus transmis par le genre *Anophèles*. Cependant, ce dernier est totalement réfractaire à la transmission de la majorité des arbovirus d'importance médicale dont le CHIKV, un *alphavirus* phylogénétiquement très proche de ONNV (139), (140). Des différences de réceptivité peuvent être observées au niveau de l'espèce de moustique vis-à-vis d'un même virus (e.g. *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* pour le YFV (28) ou pour le ZIKV (141) et peuvent également se manifester à l'échelle des populations d'une même espèce de moustiques (142); (143); (144); (145); (146); (147), (148), (149)). En résumé, la compétence vectorielle tient compte non seulement de la génétique du moustique, de la génétique du virus mais également des interactions existantes entre les deux (150); (142); (138) qui peuvent varier au cours du temps (65); (66).

Les mécanismes génétiques à la base de cette différence de réceptivité du moustique sont encore très mal connus. Cependant, des travaux sur la réceptivité du moustique *Ae. aegypti* au virus de la DENV-2 suggèrent que ce processus serait sous le contrôle d'un ou plusieurs gènes notamment des QTL (quantitative Trait Loci) localisés sur les chromosomes II et III de ce moustique. Les QTLs sont des portions de génomes intervenant dans le contrôle de caractères quantitatifs phénotypiques mesurables comme la compétence vectorielle ou la résistance aux insecticides (151). Les QTLs ont un rôle dans l'infection des cellules de l'épithélium digestif par le virus et dans la dissémination du virus, l'échappement de la barrière de l'intestin (152); (150). Par ailleurs, un membre de la famille des protéines Tudor, Tudor Staphylococcal Nuclease (Tudor-SN or TSN) jouerait un rôle proviral facilitant l'infection du tube digestif d'*Ae. aegypti* par le DENV (153). Plus récemment, des séquences virales intégrées dans les génomes des moustiques ont été détectées; les NIRVS pour non-retroviral integrated RNA virus sequences, pourraient être impliquées dans la modulation de la compétence vectorielle notamment en bloquant la réplication virale agissant ainsi comme des molécules antivirales (1);(154). De plus, la flore microbienne du moustique, appelée microbiote, affecte la compétence vectorielle. La modulation de la réplication virale par le microbiote se fait *via* divers mécanismes dont la régulation de l'immunité, la compétition pour les ressources nutritives et lipidiques ou encore la production de facteurs antiviraux. Les exemples les plus notables sont ceux faisant intervenir les bactéries du genre *Wolbachia*, dont *Ae. aegypti* est naturellement dépourvu. Deux lignées stables d'*Ae. aegypti* transfectées par *Wolbachia* ont été obtenues: *wMel* de *Drosophila melanogaster* (155) et *wAlbB* de *Ae. albopictus* (156). En présence de *wMel*, la compétence vectorielle du moustique est réduite. En effet, la durée de

vie du moustique *Ae. aegypti* est diminuée passant de 61 à 27 jours (à 25°C) impactant ainsi le PIE et la réplication/dissémination du CHIKV et du DENV est inhibée (155) ; (156) ; (157).

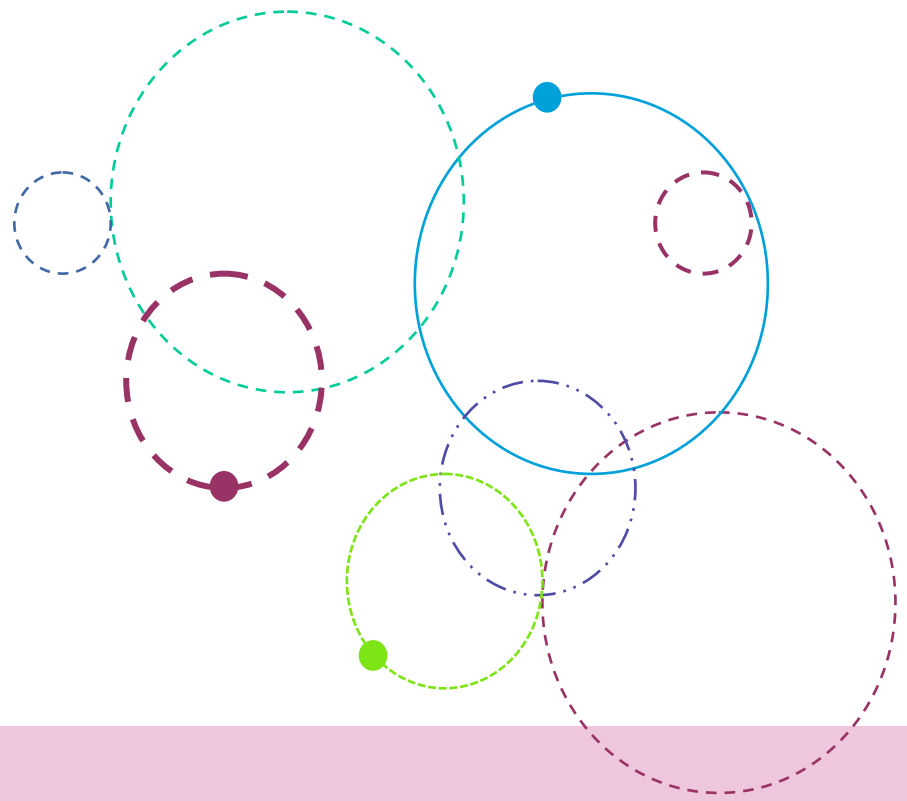
1.5.2. Capacité vectorielle

La capacité vectorielle se définit comme une mesure de l'efficacité du vecteur à transmettre un agent pathogène dans des conditions naturelles (158). Elle dépend à la fois des facteurs intrinsèques liés au vecteur (compétence vectorielle, préférences trophiques et fréquence des repas sanguin, longévité des femelles ...) et des facteurs extrinsèques biotiques (nutrition, sites de pontes, état immunitaire de l'hôte vertébré...) et abiotiques (température, humidité, la photopériode, la saison...). La capacité vectorielle (C) est ainsi issue d'une formule établie par (159) :

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

- m : densité de vecteurs par rapport à l'hôte vertébré
- a : probabilité journalière qu'un vecteur pique l'hôte
- ma : nombre de piqûres par homme par jour
- p : probabilité journalière de survie du vecteur
- b: compétence vectorielle
- n : durée de la période d'incubation extrinsèque
- c : réceptivité de l'hôte vertébré au virus
- 1/r : période infectieuse de l'hôte vertébré

La capacité vectorielle constitue ainsi un indicateur épidémique important ; en effet, plus la capacité vectorielle est élevée, plus le risque de transmission est important. Par exemple, si la densité de moustiques dans une région diminue suite à la mise en place de la lutte antivectorielle par pulvérisations d'insecticides, on obtiendra une diminution de la densité (m) de moustique ainsi que de la probabilité (a) de piqûre entraînant une diminution de la capacité vectorielle.



Chapitre 2

Les vecteurs moustiques d'importance médicale

Ce chapitre est axé sur les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, deux espèces invasives qui ont su coloniser le monde.

Ce chapitre présente la bio-écologie, la distribution, le cycle de développement et la morphologie des deux vecteurs.

Chapitre 2 : Les vecteurs moustiques d'importance médicale

2.1. Vecteurs moustiques

Les arthropodes forment une classe d'animaux invertébrés qui partagent la caractéristique d'avoir des pattes articulées, un exosquelette et un corps segmenté. Il s'agit du plus grand embranchement animal avec plus d'un million d'espèces. Au sein des arthropodes, on distingue notamment les insectes qui représentent environ 80% des arthropodes et sont les seuls arthropodes à posséder des ailes. La classe des insectes comprend différents ordres dont l'ordre des diptères. Au sein de l'ordre des diptères, plusieurs familles sont représentées dont la famille des *Culicidae* qui est caractérisée par la présence d'antennes longues et fines, d'ailes ornées d'écailles et d'un appareil buccal de type piqueur-suceur. Cette famille se subdivise en deux sous-familles : les *Anophelinae* comprenant le genre *Anophèles*, vecteur des parasites *Plasmodium* responsables du paludisme et les *Culicinae* incluant les genres *Culex* et *Aedes*, vecteurs d'arbovirus. Le sous-genre *Stegomyia* (110 espèces) est inclus dans le genre *Aedes* (800 espèces), le genre le plus populaire en raison de ces deux espèces, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, très importantes en santé humaine. On compte plus de 3500 espèces de moustiques dont moins de 15% sont anthropophiles. Les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* figurent parmi les espèces les plus anthropophiles du genre *Aedes* et sont les vecteurs naturels de nombreux arbovirus (Figure 13). Ces deux espèces sont très proches morphologiquement et se distinguent principalement au stade adulte par le motif en écailles blanches-argentées présent sur leur thorax, en forme de lyre pour *Ae. aegypti* (avec deux lignes centrales) et une bande longitudinale unique pour *Ae. albopictus* au milieu du scutum. (Figure 14)

Embranchement	: <i>Arthropoda</i>	(= Pattes articulées)
Classe	: <i>Insecta</i>	(= Corps segmenté en trois parties)
Sous-Classe	: <i>Pterygota</i>	(= avec des ailes)
Ordre	: <i>Diptera</i>	(= avec deux ailes)
Sous-Ordre	: <i>Nematocera</i>	(= avec des antennes rondes et longues)
Famille	: <i>Culicidae</i>	(= moustiques)
Sous-Famille	: <i>Culicinae</i>	
Genre	: <i>Aedes</i>	
Sous-Genre	: <i>Stegomyia</i>	
Espèce	: <i>Ae. aegypti</i> (Linnaeus, 1762) ; <i>Ae. albopictus</i> (Skusse, 1984)	

Figure 13 : Taxonomie d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* (adapté de Inventaire National du Patrimoine Naturel - INPN)

2.2. Biologie des vecteurs

Les cycles de développement des moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* sont identiques et durent en moyenne entre 10 et 14 jours. Cette durée varie essentiellement en fonction de la température ambiante, de celle de l'eau du gîte et des ressources en nourriture. Le cycle sera plus court pour les températures élevées (> à 28°C) et plus long pour les températures plus basses (< à 28°C). Les moustiques sont des insectes holométaboles (métamorphose complète) dont le cycle de développement est composé d'une phase aquatique comprenant cinq stades pré-imaginaux (4 stades larvaires et 1 stade nymphal) et un stade aérien dit stade imaginal (adulte) (Figure 14). Les femelles de moustiques sont fécondées une seule fois dans leur vie et les spermatozoïdes sont stockés dans trois spermathèques (chez les *Culicinae*). Après une ovogenèse d'environ trois jours, les femelles du genre *Aedes* pondent entre 50 et 500 œufs de forme ovale d'environ 0,5 mm sur un support humide. Les collections d'eau appelées « gîtes » peuvent être d'origine naturelle comme les creux d'arbres, de rochers, les cavités des plantes... ou d'origine anthropique (associés au comportement de l'homme) comme les pneus, les pots de fleurs et leurs soucoupes, les fûts, les citernes, les abreuvoirs et gouttières mal vidées,.. etc.... Les œufs sont pondus individuellement et généralement dans plusieurs gîtes. Ce comportement augmente les chances de survie de la descendance. Les œufs pondus sont blancs (couleur du chorion) et sans flotteur. Ils sont résistants à l'eau grâce à la présence d'un chorion imperméable à base de chitine. Les œufs deviennent bruns à mesure que le chorion se solidifie. Les œufs peuvent ainsi résister à la dessiccation et les embryons peuvent rester viables pendant plusieurs mois jusqu'à un an (en fonction des conditions environnementales).

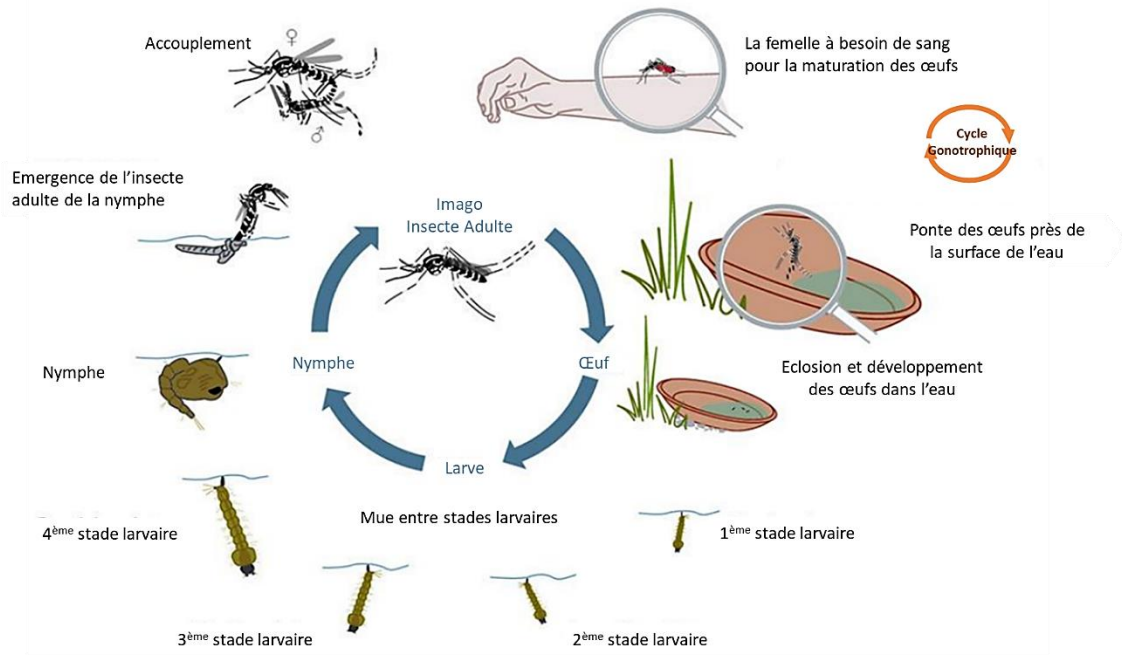


Figure 14: Cycle de développement du moustique (Adapté de I. Schleip, Biogents)

En fonction de la disponibilité des ressources alimentaires et de la température de l'eau, les œufs éclosent 24 à 48h après immersion, libérant des larves aquatiques complètement formées. Le développement des larves s'effectue selon quatre stades successifs (L1, L2, L3 et L4) marqués par des mues permettant une augmentation de la taille des larves passant ainsi de 1 mm (L1) à 1 cm (L4). Les larves présentent un corps en trois parties : une tête comprenant les pièces buccales de type broyeur, un thorax et un abdomen avec un siphon respiratoire à son extrémité permettant la respiration à la surface de l'eau (Figure 15A). Le développement larvaire se déroule en 7 à 12 jours selon la disponibilité des nutriments, la température, la présence de prédateurs ou autres compétiteurs. Les larves sont microphages et se nourrissent de microorganismes aquatiques tels que les bactéries, les algues ou encore les plantes en décomposition. La mue de la larve de stade L4 permet l'entrée en stade nymphal donnant lieu à la transformation de la larve en nymphé. A ce stade, la nymphé est toujours aquatique et mobile mais ne se nourrit plus ; elle a une forme en « virgule » et un corps bipartite comprenant un céphalothorax sur lequel sont fixés deux trompettes respiratoires, et un

abdomen (Figure 15B). Des changements morphologiques importants se déroulent à ce stade pour aboutir à l'adulte (160).

Au bout de 1 à 2 jours, c'est l'émergence ; on passe du mode de vie aquatique à un mode de vie aérien, de la nymphe, émerge un adulte complètement formé (imago) en environ 15-20 minutes (Figure 15C). Les mâles ayant un développement larvaire plus court, émergent les premiers et ont également une durée de vie plus courte (18 jours en moyenne) par rapport aux femelles (en moyenne 30 jours à plusieurs mois). Le moustique adulte peut mesurer entre 5 et 20 mm comme pour tous les insectes, il est constitué de trois parties : la tête, le thorax et l'abdomen. Le moustique appartenant à la classe des insectes et à l'ordre des diptères, il est muni de trois paires de pattes et d'une paire d'ailes membraneuses fixées au thorax. Les principaux organes sensoriels (les antennes, les yeux et les pièces buccales) sont retrouvés au niveau de la tête. Les antennes des mâles se distinguent par la présence de soies longues et « plumeuses » alors que celles des femelles sont plutôt courtes. Les pièces buccales sont de type piqueur-suceur chez la femelle avec un proboscis long et rigide pour transpercer la peau de l'hôte lors de la prise de repas de sang avec de palpes courts. Chez le mâle, les pièces buccales sont de type suceur avec de longs palpes. L'abdomen est composé de 10 segments dont les derniers correspondent aux appendices génitaux ; en forme de biseau pour la femelle et en forme de « w » pour le mâle. L'anatomie interne est caractérisée par un tube digestif qui occupe la majorité de la cavité générale. La circulation, la respiration et l'excrétion sont assurées respectivement par l'hémolymphe, le réseau de trachées avec les stigmates et les tubes de Malpighi. La paire de glandes salivaires (composé de trois lobes) est situé au niveau du thorax.

La reproduction intervient généralement dans les jours suivant l'émergence. Les femelles, même si elles peuvent s'accoupler avec différents mâles, ne seront inséminées que par un seul mâle. Avec les spermatozoïdes stockés dans les spermathèques, la femelle va fertiliser ses œufs durant toute sa vie (Figure 15D). Le spermatozoïde féconde l'ovocyte en pénétrant par le micropyle. Les mâles et les femelles se nourrissent de liquide sucré qu'ils trouvent généralement dans les végétaux (sève d'arbres, exsudat de fruits, nectar de fleur...). Une fois fécondée, la femelle doit en général se nourrir de sang sur un hôte vertébré afin d'obtenir les protéines indispensables à la maturation de ses œufs. Quand les œufs sont à maturité, la femelle de moustique se met à la recherche d'un site de ponte. Les femelles sont capables de parcourir des centaines de mètres voire quelques kilomètres à la recherche de nourriture ou d'un gîte de ponte. Au cours de sa vie, la femelle moustique effectue plusieurs repas et entre 5

à 8 cycles de ponte. La période entre un repas de sang et la ponte correspond à un cycle gonotrophique qui peut durer entre 2 et 5 jours. Lors de la prise du sang, la femelle injecte de la salive dont la composition est complexe, comprenant des molécules anti hémostatiques pour prévenir l'agrégation plaquettaire, la vasoconstriction et la coagulation. Au cours de ce repas sanguin, la femelle peut aussi bien ingérer des agents pathogènes portés par l'hôte et mêlés au sang absorbé.

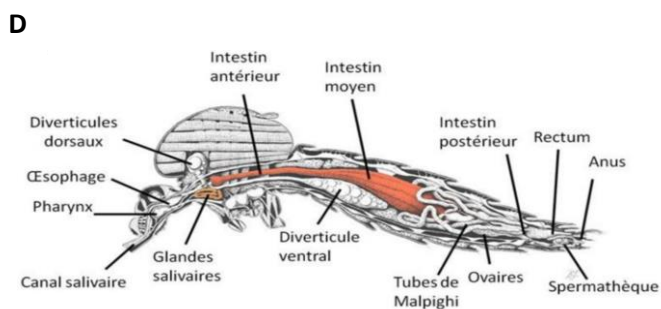
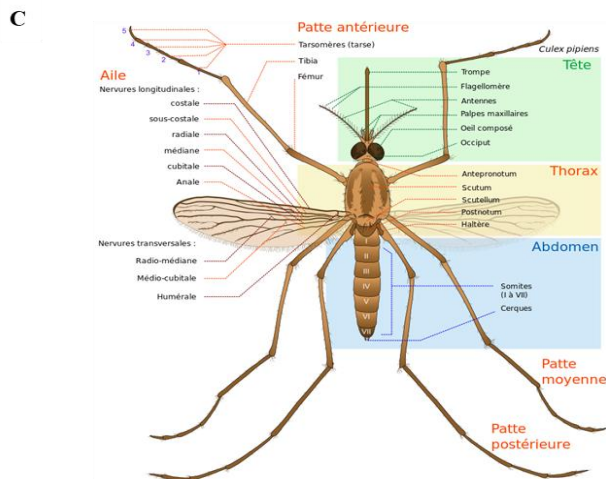
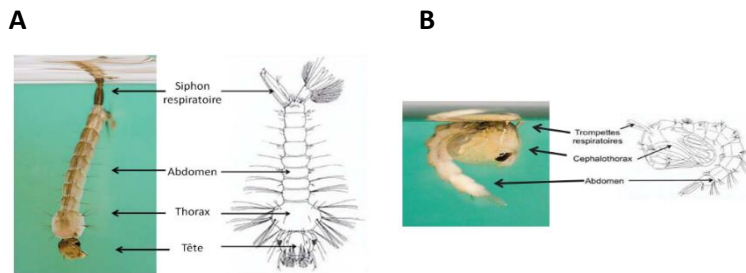


Figure 15 : Morphologie du moustique à différents stades de développement (larve (A), nymphe (B), adulte externe (C) et adulte interne (D) (adapté de Ray Wilson (A et B ; Mariana Ruiz Villarreal (C) et Jobling, 1987) colorié par l'Institut Pasteur).

Bien qu'ayant des cycles de développement similaires, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (Figure 16A) présentent des différences dans leur mode de nutrition, leur mode de vie (nature des gîtes larvaires), et leur distribution géographique.

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

2.3. *Aedes (Stegomyia) aegypti*

Originaire d'Afrique, le moustique *Ae. aegypti* (Linnaeus, 1762) également appelé « *Yellow fever mosquito* » est connu comme étant le principal vecteur d'arbovirus comme DENV (sérotypes 1- 4), ZIKV, CHIKV et YFV. *Ae. aegypti* est décrit sous trois formes : *Ae. aegypti aegypti*, *Ae. aegypti formosus* et *Ae. aegypti queenslandensis*. *Ae. ae. formosus* est la forme primitive d' *Ae. ae. aegypti*, de couleur sombre ; elle est essentiellement présente en Afrique tropicale et dans quelques îles de l'Océan Indien. Cette espèce prend principalement ses repas de sang sur les animaux et occasionnellement sur l'homme. Elle vit majoritairement dans les forêts primaires et les zones à la lisière des forêts, colonisant des gîtes d'origine naturelle. *Ae. aegypti aegypti* de couleur claire est une espèce hautement anthropophile et inféodée à l'homme. Elle vit dans les habitats urbains et domestiques qui lui fournissent des gîtes d'origine anthropique et de multiples sources de repas de sang (l'homme). *Ae. aegypti queenslandensis* de couleur très pâle était très répandue dans le bassin méditerranéen avant d'être éradiquée de la région (161). *Ae. ae. aegypti* serait issu d'un ancêtre zoophile, présent sous forme de populations sauvages inféodées aux forêts d'Afrique. L'assèchement du Sahara il y a 10 000 ans a conduit à l'isolement géographique puis génétique des deux espèces, *Ae. ae. formosus* au Sud (adapté aux environnements forestiers) et *Ae. ae. aegypti* au Nord. Suite à cet assèchement, les populations humaines se sont regroupées en communautés pastorales et ont instauré la pratique du stockage de l'eau. Ces gîtes artificiels ont été très vite colonisés par les populations rurales d'*Ae. ae. formosus* qui se sont différenciés en populations domestiques

donnant naissance à *Ae. ae. aegypti*. L'expansion d'*Ae. ae. aegypti* s'est déroulée en plusieurs vagues successives. À partir de l'Afrique du Nord, l'espèce s'est répandue à travers le monde : (i) en Afrique de l'Ouest et de l'Est grâce au commerce transsaharien d'or et de sel entrepris par les Arabes, (ii) vers le nouveau monde lors de la traite des esclaves entre le 15^{ème} et le 19^{ème} siècle, (iii) à partir de l'Afrique de l'Est vers l'Asie entre le 18^{ème} siècle et le 19^{ème} siècle favorisé par le développement du commerce maritime (cette espèce est devenue l'espèce la plus importante d'Asie) et (iv) lors de la 2^{ème} guerre mondiale de l'Asie vers le Pacifique à la faveur des déplacements des troupes (162). *Ae. ae. aegypti* a été présent dans le bassin méditerranéen au début 20^{ème} siècle (163) mais à la suite des mesures d'assainissement et d'épandage du DDT pour lutter contre le paludisme, l'espèce a disparu (Figure 17). *Ae. ae. aegypti* est une espèce invasive dont l'expansion est principalement liée aux activités humaines et à l'intensification des échanges entre pays. Grâce à une biologie adaptée aux trajets sur de longues distances (sous forme d'œufs), cette espèce a colonisé de nombreux habitats en privilégiant le milieu domestique. Les formes pré-imaginaires (larves et nymphes) s'adaptent à des conditions climatiques extrêmes et sont résistantes à des températures > à +40°C. Les larves peuvent également rester viables après congélation sur une très courte période (-17 °C pendant 1 h ou -2°C pendant 10 h ; (164). *Ae. ae. aegypti* est une espèce qui s'est fortement adaptée à l'homme en colonisant de petites collections d'eau d'origine domestique et en piquant exclusivement l'homme. De ce fait, elle est très souvent impliquée dans la transmission d'arbovirus tel le YFV, le DENV, le CHIKV et le ZIKV. Des études ont montré qu'un même moustique peut être coinfesté par différents virus et être capable de les transmettre lors d'un même repas de sang (165) ; (97). *Ae. ae. aegypti* est très endophage et endophile (piquent et se repose dans les maisons), et présente une activité de pique principalement dans la journée avec deux pics d'activité, le matin (aube) et le soir (crépuscule) (Figure 16A).

2.4. *Aedes (Stegomyia) albopictus*

Aedes albopictus (Skuse, 1894), aussi appelé « moustique tigre », est une espèce invasive originaire des forêts tropicales d'Asie du Sud-Est (166) ; (167). Elle fut décrite pour la première fois à Calcutta en Inde. Avant les années 1970, la répartition d'*Ae. albopictus* se limitait à l'Asie du Sud-Est et aux îles de l'Océan Indien et du Pacifique (168). A la fin des années 1970, *Ae. albopictus* a entamé sa phase d'expansion et fut signalé pour la première fois en Europe en 1979 (Albanie) probablement suite à une importation de pneus contaminés en

provenance de Chine (169). En 1983, il fut détecté pour la première fois aux Etats Unis (170) et s'est très vite propagé en Amérique Centrale avant d'atteindre le Brésil et l'Amérique du Sud en 1986 (171). Via le commerce de pneus, *Ae. albopictus* s'est ainsi propagé en Amérique du Sud et dans la Caraïbe à partir de 1993 (172). Par la suite, le moustique fut rapporté en Afrique dès 1989 dans les ports du Cap (173, 174) et a colonisé le Nigéria (175) et les pays voisins (Cameroun (176), le Gabon (177), la Guinée Equatoriale (178)). En 1990, *Ae. albopictus* finit par s'implanter en Europe ; l'espèce est aujourd'hui présente dans 20 pays d'Europe (179). Après de multiples introductions, le moustique finit par s'implanter dans le Sud-Est de la France en 2004, puis s'est propagé, il est actuellement présent dans 67 départements du pays. *Ae. albopictus* a ainsi connu une rapide expansion ces quatre dernières décennies grâce à l'intensification des échanges commerciaux entre pays et est aujourd'hui présent sur les cinq continents (Figure 17). Grâce à sa plasticité écologique et physiologique, *Ae. albopictus* est capable de coloniser les régions tropicales et tempérées voire les régions encore plus froides du globe. Les œufs d'*Ae. albopictus* sont capables d'entrer en diapause en régions tempérées pour survivre aux basses températures de l'hiver. *Ae. albopictus* est capable de coloniser aussi bien les gîtes naturels (trous d'arbres ...) que les gîtes artificiels (pots de fleurs etc....). Principalement diurne, il peut en l'absence d'humains comme source de sang, se nourrir sur les animaux. L'ensemble de ces caractéristiques font qu'*Ae. albopictus* est capable de jouer un rôle majeur dans la propagation d'arbovirus en agissant comme un vecteur secondaire (DENV, CHIKV, ZIKV) ou comme un vecteur relai (167) (Figure 16B).

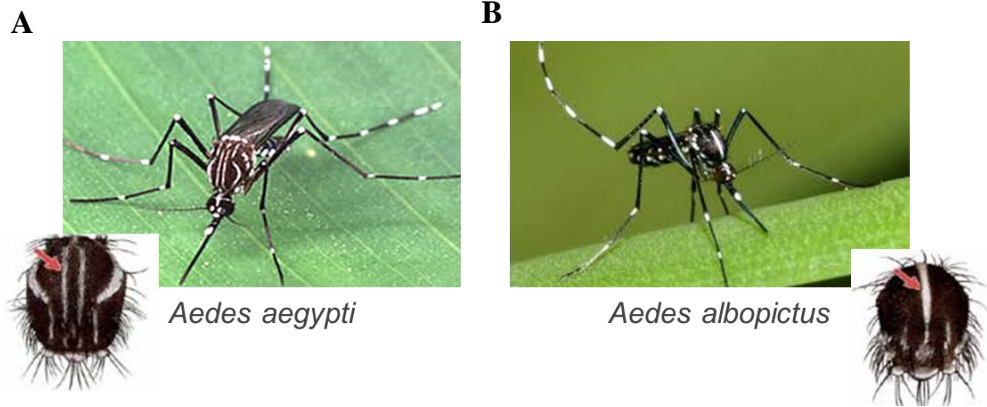


Figure 16 : Les deux espèces, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* se distinguent morphologiquement au stade adulte par une lyre (deux bandes médianes entourées de deux bandes courbées) pour *Ae. aegypti* (**A**) et une bande unique pour *Ae. albopictus* (**B**) au milieu du scutum du thorax.

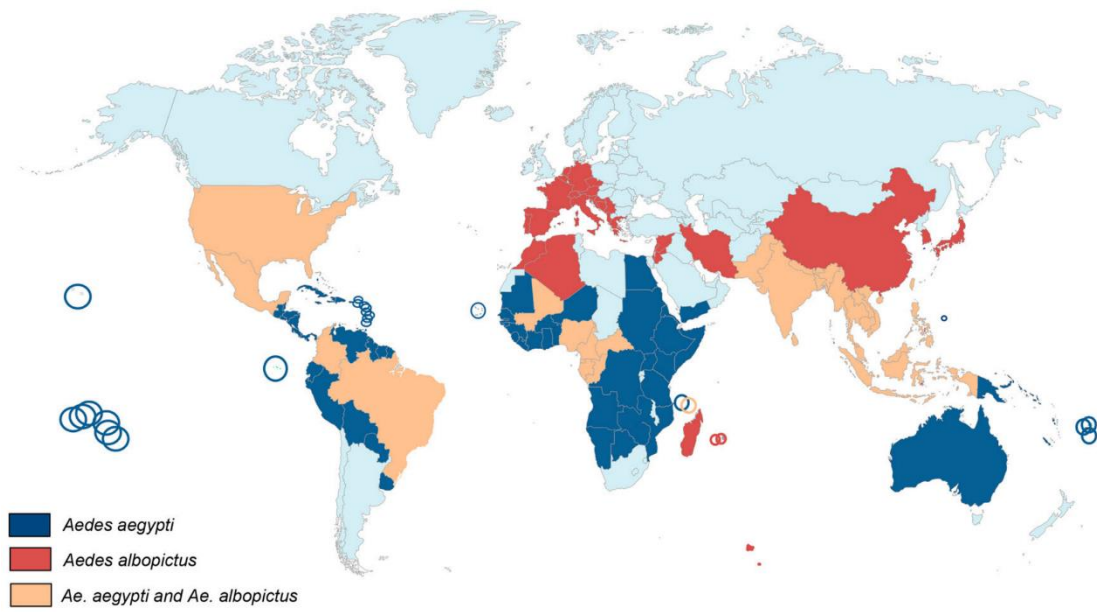
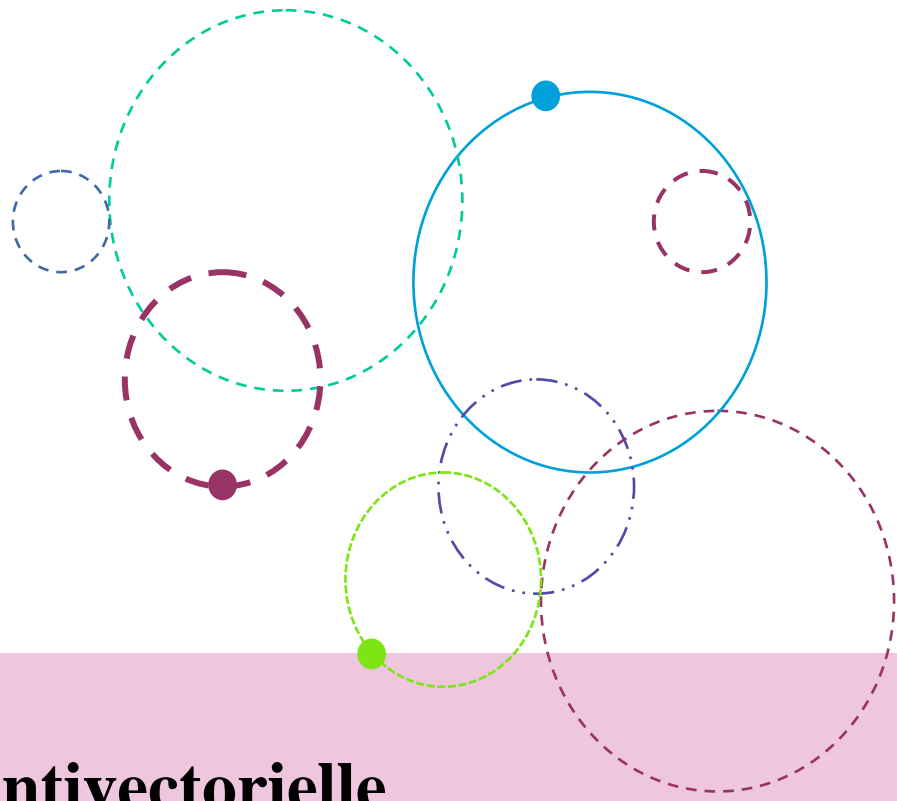


Figure 17 : Répartition mondiale d'*Aedes aegypti* et d'*Aedes albopictus* (tiré de (1))



Chapitre 3

Lutte antivectorielle

Ce chapitre établit un état des lieux sur les méthodes de lutte antivectorielle.

Dans ce chapitre, sont présentées les méthodes de lutte antivectorielle, la résistance aux insecticides qui résulte de l'utilisation abondante de tous ces produits. Enfin, sont présentées les nouvelles méthodes de lutte permettant de contrer la résistance aux insecticides.

Chapitre 3 : Lutte antivectorielle

La lutte antivectorielle (LAV) constitue le seul moyen de prévention contre les arboviroses pour lesquelles il n'existe pas de traitements antiviraux efficaces ou de vaccins à disposition. En effet, les traitements antiviraux actuels ne permettent qu'un traitement symptomatique des maladies. Bien qu'il existe des vaccins protégeant l'homme avec plus ou moins d'efficacité, des vaccins tels que ceux développés contre les virus de la dengue (180) et du chikungunya (181) sont encore en cours d'étude ou présentent des restrictions quant à leur utilisation (182). Dans le cas du YFV, des conditions de fabrications complexes et strictes entraînent des ruptures de stocks comme ce fut le cas en 2019 (183). La lutte antivectorielle consiste donc à agir sur les vecteurs plutôt que sur les virus. Elle a pour but ultime de diminuer les densités de vecteurs et réduire la transmission des agents pathogènes. La LAV s'appuie ainsi sur différentes méthodes d'action : physique, chimique et biologique variant en fonction du contexte épidémiologique, des moyens financiers et humains à disposition ainsi que de la bio-écologie du vecteur ciblé.

3.1. Lutte physique

La lutte physique permet de réduire le contact entre le vecteur et l'hôte vertébré. Elle inclut la réduction de la densité des vecteurs par la destruction ou la modification de gîtes larvaires (élimination des contenants susceptibles de recueillir de l'eau, couverture des réserves d'eau, nettoyage des gouttières, élimination des déchets tels que les pneus) ou encore l'utilisation de pièges (BG sentinelle, piège lumineux). Elle passe également par la mise en place de protection individuelle notamment par l'application de répulsifs (crèmes pour le corps, diffuseurs électriques), l'utilisation de moustiquaires (imprégnées ou non d'insecticides), la pose d'écrans de protection (type moustiquaire) aux portes et fenêtres des habitations, écoles ou lieux de travail ou encore le port de vêtements longs et de couleur claire imprégnés ou non d'insecticides. Ce mode de LAV nécessite des mesures d'hygiène publique et de gestion des déchets ménagers extrêmement contraignantes. L'implication de la population est nécessaire pour avoir un impact significatif sur la réduction de la densité des moustiques lors de campagnes d'élimination. (184) ; (185).

3.2. Lutte chimique

La lutte chimique est la méthode la plus largement utilisée depuis les années 40. Elle a notamment permis l'éradication de la fièvre jaune de la Caraïbe et de l'Amérique. Elle comprend l'utilisation d'insecticides d'origine chimique, bactérienne ou végétale regroupés en une trentaine de familles. Les insecticides diffèrent par leur formulation, leurs modes/mécanismes d'action sur la physiologie de l'insecte et leur efficacité. La majorité des insecticides actuellement utilisés sont d'origine chimique et incluent notamment les familles des organochlorés, des carbamates, des organophosphorés, des pyréthriinoïdes, et des régulateurs de croissance.

3.2.1. Les organochlorés et les pyréthriinoïdes

Ces deux familles d'insecticides agissent sur le système nerveux central et périphérique des insectes. Ces molécules affectent la transmission de l'influx nerveux en perturbant la cinétique d'inactivation de l'ouverture des canaux sodium voltage dépendant. Elles maintiennent l'hyperpolarisation de la membrane des cellules nerveuses la rendant insensible à tout nouveau stimulus par le sodium, entraînant ainsi la paralysie et la mort de l'insecte. Les organochlorés et les pyréthriinoïdes agissent par contact ou par ingestion de la molécule par l'insecte.

Parmi les organochlorés, on peut citer le dichlorodiphényltrichloroéthane ou DDT, le premier insecticide utilisé dans la LAV grâce à la découverte de ces propriétés insecticides en 1939 par Paul Hermann Müller (Prix Nobel en 1948). Dès 1942, il fut largement utilisé lors de campagnes d'éradication menées contre *Ae. aegypti* dans les Amériques et la Caraïbe. La lutte fut un franc succès ; de nombreux pays de la région annoncèrent avoir éradiqué le moustique en 1947 (186). Le DDT fut abondamment utilisé dans les programmes d'éradication du paludisme ou de la dengue. Cependant, malgré une remarquable efficacité et une toxicité relativement faible pour l'homme, son utilisation fut bannie dans la quasi-totalité des pays. En effet, cette substance possède des propriétés très stables et bioaccumulables dans l'environnement avec des produits de dégradation encore plus stables (3 à 7 mois voire 15 ans ; Ritter, 1995). Le DDT est peu soluble dans l'eau, s'accumule dans la chaîne alimentaire et possède une forte rémanence. Cependant, dans certaines régions, il reste utilisé en pulvérisation intra-domiciliaire quand il n'y a pas d'autres moyens de lutte comme ce fut le cas en Afrique lors de l'épidémie de paludisme en 2000 contre les anophèles (*An. funestus*)

devenus résistants aux insecticides à base de pyréthrinoïdes couramment utilisés, mais qui restaient sensibles au DDT (187).

Les pyréthrinoïdes (deltaméthrine, bifenthrine..) sont des insecticides dits « de troisième génération », commercialisés dans les années 1980 à la suite des problèmes liés au DDT. Les pyréthrinoïdes sont des dérivés synthétiques venant des pyréthrines naturelles extraites des fleurs d'une espèce de chrysanthème (*Chrysanthemum cinerariaefolium*). Ces molécules agissent par contact et ont un effet répulsif et neurotoxique quasi-immédiat provoquant la chute et la mort de l'insecte ; on parle de choc neurotoxique. Ces insecticides sont les plus largement utilisés dans la LAV en santé publique et vétérinaire en raison de leur faible toxicité pour les mammifères et leurs propriétés biodégradables. Ils sont cependant très toxiques pour les organismes aquatiques (e.g. poissons) et les auxiliaires de culture (e.g. abeilles) (188).

3.2.2. Les organophosphorés et les carbamates

Les organophosphorés et les carbamates sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, une enzyme intervenant dans la dégradation de l'acétylcholine, un neurotransmetteur des synapses cholinergiques. Ces insecticides neurotoxiques touchent le système nerveux central et bloquent la cholinestérase sous sa forme inactive. L'accumulation de l'acétylcholine dans la synapse qui en résulte bloque la transmission de l'influx nerveux et entraîne la mort de l'insecte par paralysie en bloquant les canaux nicotiques en position ouvert {champ 1985}. Ces molécules possèdent une faible rémanence dans l'environnement. Ces produits sont généralement transmis par contact et pénètrent facilement dans l'organisme grâce leur liposolubilité élevée. Les organophosphorés ont été largement utilisés durant la seconde guerre mondiale dans la LAV en remplacement des organochlorés. Toutefois, les organophosphorés (malathion, fénitrothion, chlorpyrifos, téméphos) en raison de leur mode d'action, possèdent une toxicité élevée pour l'homme et les vertébrés.

Les carbamates (carbaryl, propoxur, bendiocarbe, carbofuran, fenobucarb) dérivent de l'acide carbamique. Ils ont été commercialisés dans les années 1960 afin de remplacer les organophosphorés. Ils possèdent une plus grande toxicité et un coût énergétique plus important que les organophosphorés. Ils ont le même mode d'action que ces derniers et agissent principalement par contact. Cependant, les carbamates ont une rémanence généralement plus faible que celle des organophosphorés.

3.2.3. Les régulateurs de croissance

Les régulateurs de croissance sont des perturbateurs endocriniens agissant principalement sur les stades pré-imaginaux. Ces insecticides sont classés selon deux modes d'action :

- Les juvénoïdes (méthoprène, pyriproxifène) : ce sont des mimétiques de l'hormone juvénile qui perturbe le développement larvaire et inhibe la nymphose. La mort peut se produire au stade nymphal et dans de rares cas, au cours de l'émergence de l'adulte ;
- Les ecdysoïdes (diflubenzuron) : ils bloquent la synthèse de la chitine au moment de la mue. Ils inhibent la sclérisation du tégument de la larve après la mue larvaire ou nymphale. La mort survient indépendamment du stade de développement imaginal.

Les régulateurs de croissance sont très efficaces par leur mode d'action exclusif sur les stades immatures. Ils ont un délai d'action assez long pouvant aller jusqu'à 7 jours pour les ecdysoïdes (famille des benzoylurées). Les régulateurs de croissance n'ont pas d'analogues chez les mammifères et sont donc très peu toxiques pour eux, mais ils peuvent interférer avec le développement d'autres arthropodes. Ils possèdent une faible rémanence et pour certains, ils peuvent même être utilisés dans les réserves d'eau potable. Certains régulateurs de croissance peuvent jouer un rôle stérilisant ou agir sur le développement embryonnaire en inhibant l'hormone juvénile et l'ecdysone qui jouent un rôle important dans la fertilité et la reproduction des insectes (189).

3.2.4. Les produits biocides

Les bactéries *Bacillus thuringiensis serovar israelensis (Bti)* (souche H-14) ou *Bacillus sphaericus (Bs)* (souche 2362) (190) sont utilisées comme insecticides dans les gîtes larvaires. Une fois ingérées par les larves, les bactéries sous l'action du pH basique de l'intestin libèrent leur protoxines composées de cristaux protéiques toxiques (4 pour *Bti* et 1 pour *Bs*) au moment de la sporulation bactérienne, qui une fois activées par les enzymes digestives, altèrent les cellules épithéliales intestinales et entraînent la mort des larves (191-193).

3.3. Résistances aux insecticides

Il existe deux types de résistance aux insecticides faisant intervenir des mécanismes différents, la résistance génétique et la résistance métabolique (Figure 18). Ces deux modes de

résistance représentent un énorme frein à la LAV. La résistance est définie par l'OMS en 1957 comme : « La résistance d'une souche (ou race) d'un insecte vis-à-vis d'un insecticide correspond au développement d'une capacité à tolérer des doses de substances toxiques qui exerceraient un effet létal sur la majorité des individus composant une population normale de la même espèce ».

3.3.1. Résistance génétique

La résistance par modification de cible est un mécanisme très fréquent chez les insectes et résulte de mutations ponctuelles présentes sur les gènes codant pour les protéines ciblées par l'insecticide. La sélection de ces mutations fait principalement intervenir une diminution de l'affinité de l'insecticide pour ces protéines cibles (récepteurs ou enzymes) tout en maintenant au minimum une partie des fonctions biologiques de ces protéines. Les principales mutations retrouvées chez les moustiques ont été identifiées sur les protéines suivantes :

- L'enzyme acétylcholinestérase, elle permet une résistance aux carbamates et aux organophosphorés ; la mutation la plus fréquente est la mutation G119S présente dans le gène *ace-1* qui est présente chez six espèces de moustiques (*C. p. pipiens*, *C. p. quinquefasciatus*, *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Cx. tritaeniorhynchus* et *An. Gambiae*) (194) ; (195) ;
- Le canal sodium voltage dépendant qui est ciblé par les pyréthrinoïdes et le DDT. Ces mutations diminuent ou annihilent la fixation de l'insecticide à leur cible. La mutation la plus fréquente est la mutation du gène *kdr* «knockdown resistance» qui est retrouvée dans différentes populations d'*Ae. aegypti* (196) ; (197) ;
- Le récepteur de l'acide gamma-aminobutyrique qui diminue l'affinité des organochlorés pour ce récepteur, sont également retrouvés chez *Ae. aegypti* (198).

3.3.2. Résistance métabolique

La résistance métabolique ou mécanisme de détoxification est un mécanisme biochimique par lequel l'insecte synthétise des enzymes permettant la dégradation des insecticides en métabolites moins ou non toxiques. L'insecticide perdra alors de son efficacité car la quantité de produits insecticides atteignant la cible sera drastiquement réduite. Ce processus implique une surproduction d'enzymes estérases (carboxyestérases, glutathion-S-transférases et

monoxygénases dépendant du cytochrome P450) (199) ; (200) ; (201) par : i) amplification génique avec une augmentation du nombre de copies du gène, ii) mutation du promoteur du gène augmentant sa transcription, iii) mutations multiples augmentant les propriétés catalytiques de l'enzyme pour l'insecticide (202) ; (203). Ce mécanisme de résistance intervient principalement dans la résistance aux organophosphorés, aux carbamates, pyréthrinoïdes et au DDT.

D'autres types de résistance peuvent également intervenir comme la résistance comportementale permettant à l'insecte d'éviter les surfaces traitées en s'envolant rapidement suite à l'irritation que peut produire l'insecticide (204). La résistance cuticulaire (très lipophile) réduit la pénétration de l'insecticide (plutôt hydrophobe) dans l'organisme de l'insecte, ce qui conduit à une meilleure survie de ce dernier (205) ; (206).

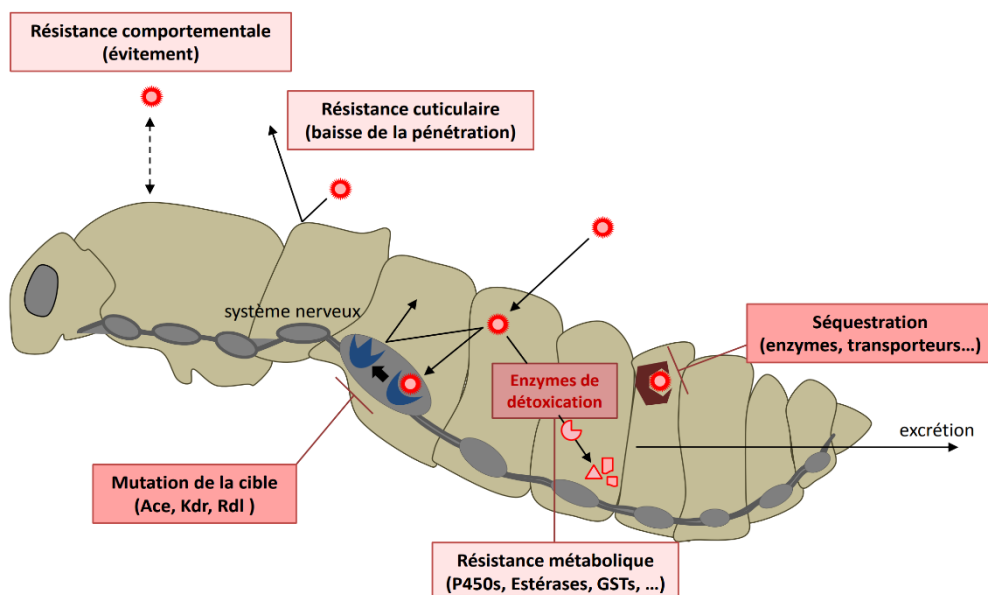


Figure 18 : Les principaux mécanismes impliqués dans la résistance aux insecticides (tiré de JP David, HM Ismail, MI Paine).

3.4. Lutte biologique

La lutte biologique fait appel aux prédateurs naturels des larves, à des parasites ou des agents pathogènes.

Les poissons de type *Gambusia affinis* et *Poecilia reticulata* ou guppy sont utilisés dans la lutte anti-larvaire. Ces poissons larvivores, peuvent être déposés dans de petites collections

d'eau et survivre dans des eaux pauvres en oxygène, des eaux chargées en matières organiques ou des eaux saumâtres.

Les copépodes du genre *Mesocyclops* sont utilisés dans la lutte contre les *Aedes*. Ce sont de petits crustacés pouvant être ensemencés dans l'eau à usage domestique. Ces crustacés sont capables de consommer 20 à 40 jeunes larves de moustique par jour.

Les champignons entomopathogènes (*Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae*) entraînent invariablement la mort des moustiques en 11 à 14 jours. Leur reproduction est indépendante de leur hôte. Les champignons se fixent à la surface du corps des insectes sous forme de spores microscopiques qui une fois germées, se développent en surface sur le tégument de l'insecte, pénètrent dans la cavité générale et y prolifèrent entraînant ainsi la mort avec ou sans émission de neurotoxines (207).

3.5. Les alternatives à la LAV

Suite à l'identification de la résistance aux divers insecticides proposés, des méthodes alternatives de lutte issues des biotechnologies ont été développées.

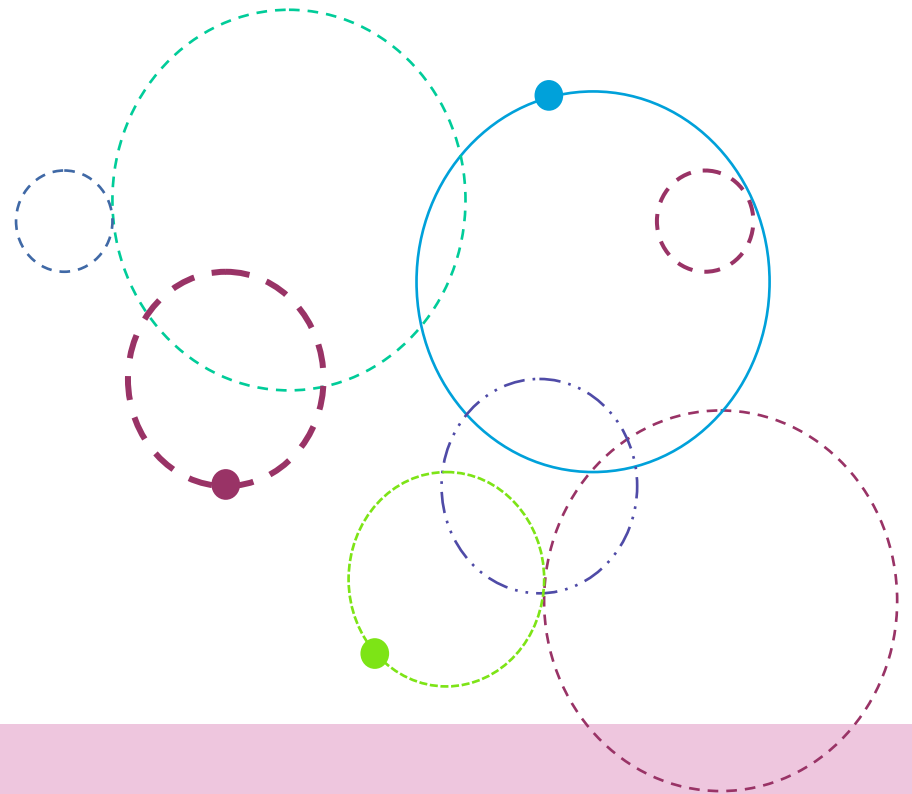
La technique de l'insecte stérile ou SIT pour *Sterile Insect Technique*, vise la réduction de la densité d'une population de moustiques *via* le lâcher massif de mâles stérilisés par irradiation aux rayons (X ou gamma). Les mâles stérilisés s'accoupleront avec des femelles sauvages induisant ainsi la stérilisation des femelles. Cette technique a été utilisée dans la lutte contre la lucilie bouchère (*Cochliomyia hominivorax*) au sein des élevages de bétail en Amérique du Nord et Centrale (208) (209). L'utilisation du STI a aussi permis l'élimination de la glossine (mouche tsé-tsé) qui transmet un trypanosome sur l'île de Zanzibar (210); (211). Enfin, le STI a été employé au Sénégal (212) et au Mexique (213) dans la lutte contre les glossines ; elle est en cours de développement contre les *Aedes* et les *Anophèles* (214). Une des limites de cette technique est la perte de compétitivité des mâles irradiés (215).

La technique du lâcher de moustiques portant un gène létal dominant ou RIDL (*Release of Insects Carrying a Dominant Lethal Gene*) vise également à réduire la densité de moustiques au sein d'une région donnée. Des moustiques génétiquement modifiés portant un gène létal sont relâchés massivement dans la nature. Leur accouplement avec des moustiques femelles sauvages engendre une progéniture non viable. Différentes techniques sont utilisées :

- Pour la souche OX513A d'*Ae. aegypti*, produite par la compagnie Oxitec (<https://www.oxitec.com/>), les mâles sont génétiquement modifiés par l'insertion d'un transposon exprimant le facteur de transcription tTAV (Tetracycline-controlled transactivator) qui permet la survie des moustiques et notamment des mâles dans un milieu contenant de la tétracycline. En milieux naturels, dépourvu de tétracycline, les mâles génétiquement modifiés transmettent lors de l'accouplement ce gène dominant létal à leur descendance induisant ainsi la mort des individus en l'absence de tétracycline (216). Cette technique a été notamment utilisée dans les îles Caïman en 2009 et au Brésil en 2012 avec des taux de réussite allant jusqu'à 95% (217) ; (218).

- Pour la souche OX3604C d'*Ae. aegypti*, les embryons sont génétiquement modifiés par un transgène régulé par la tétracycline incorporée dans le gène *actin4* (*Act-4*). Ce gène est exprimé lors du développement des muscles du vol chez la femelle moustique (219). Les femelles génétiquement modifiées portant le transgène et élevées en l'absence de tétracycline meurent en raison de leur incapacité à voler (220). Les mâles ne sont pas affectés par cette condition. En milieux naturels (dépourvus en tétracycline), les mâles génétiquement modifiés transmettent lors de l'accouplement ce gène dominant létal à leur descendance. La progéniture femelle qui en résulte est incapable de voler ou de se reproduire entraînant ainsi une diminution de la population de femelles (220). Cette technique a été utilisée dans le sud du Mexique, cependant aucune des populations traitées n'a été éliminée du fait de la faible compétitivité des mâles OX3604C pour l'accouplement par rapport aux mâles sauvage (221).

La modification de la flore bactérienne des moustiques, par infection avec des bactéries du genre *Wolbachia*. Contrairement à *Ae. albopictus* (*wAlbA* et *wAlbB*), *Ae. aegypti* est naturellement dépourvu de la bactérie intracellulaire *Wolbachia*. La transfection de *wMelPop* issus de *Drosophila melanogaster* chez *Ae. aegypti* (155) et de *wAlbB* chez *Ae. albopictus* rendu aposymbiotique (156) a pour effet : (i) la diminution des densités de populations dû au phénomène d'incompatibilité cytoplasmique se traduisant par une stérilité produite lors de l'accouplement (une femelle et un mâle infectés par des souches de *Wolbachia* différentes) (222) ; (223), (ii) la diminution de la compétence vectorielle pour différents arbovirus (DENV, CHIKV et YFV) sans altération de la durée de vie (224) ; (225) ; (226) ; (157), (iii) la diminution de la compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* (*wMelPop*) pour différents arbovirus avec réduction de la durée de vie du moustique (155).



Chapitre 4

La fièvre jaune

La fièvre jaune est la première maladie à arbovirus à avoir été identifiée. Ce nom a été attribué en raison de l'apparence jaunâtre des patients qui était due à un ictère.

Ce chapitre présente, dans un premier temps, les aspects cliniques et épidémiologiques de la maladie, puis les traitements et enfin, le contexte historique de la découverte de la maladie et son mode de transmission.

Chapitre 4 : La fièvre jaune

4.1. Pathogénèse et épidémiologie

4.1.1. Symptômes de la maladie

La fièvre jaune est une fièvre hémorragique mortelle à large spectre clinique, allant des formes asymptomatiques (entre 5 et 85% des cas) aux formes les plus graves, en passant par les formes de type syndrome grippal (Figure 19). Elle se divise en trois phases :

- Après une période d'incubation de 3 à 6 jours (pouvant atteindre 10-15 jours), la maladie apparaît soudainement avec une forte fièvre (39°C), des maux de tête, des frissons, des myalgies, des vomissements, de l'arthralgie, de la virémie, des douleurs lombo-sacrées. Une conjonctivite, une neutropénie, et un érythème facial important avec un cou, un thorax et une langue rouge vif donnant ainsi son nom à cette première phase dite phase rouge (ou masque de fièvre jaune) ou phase aiguë (ou phase virémique) sont observés. Il est également décrit lors de cette phase, une leucopénie et des urines rares et foncées (oligurie).

- Au bout de 3 à 4 jours, les symptômes diminuent. Lors de cette courte phase de rémission de 2 à 24 heures, une amélioration clinique du patient est constatée. La majorité des cas s'arrêtent à cette phase et évoluent favorablement vers une guérison complète des patients (227); (228). Cependant dans 20% à 60% des cas, la maladie évolue vers une forme plus sévère appelée phase aiguë ou toxique irréversible.

- La phase toxique est caractérisée par une recrudescence des symptômes (fièvre élevée, aggravation des maux de tête et de la myalgie, nausées, douleurs abdominales, asthénie sévère, douleurs épigastriques, somnolence, oligurie). Au cours de cette phase, les malades développent les symptômes spécifiques de la fièvre jaune, de multiples hémorragies causant des saignements au niveau de la bouche, du nez, des yeux ou de l'estomac (hémorragies digestives) marqués par l'apparition de sang dans les vomissures (vomito negro) et les fèces. Cette phase est aussi marquée par des défaillances multiviscérales, une insuffisance rénale et un ictère du foie donnant une couleur jaune au patient (donnant ainsi son nom à la maladie), de l'hypertension artérielle, de l'acidose métabolique, une instabilité cardiovasculaire, une arythmie cardiaque (collapsus cardiovasculaire), une confusion, des convulsions et le coma, indiquant généralement la phase terminale de la phase toxique.

Selon Santé Publique France (SPF) et la Haut Conseil de Santé Publique (HCSP), 20 à 60 % des cas graves évoluent vers une forme mortelle. Le décès des patients survient généralement

entre 7 et 14 jours ((227) ; (229) ;(230)) après l'apparition des premiers symptômes. Les patients qui survivent à la fièvre jaune, peuvent présenter des effets secondaires tels que des signes de fatigue persistante et des complications dues à des infections bactériennes secondaires comme la pneumonie ou la septicémie suite à un affaiblissement du système immunitaire.

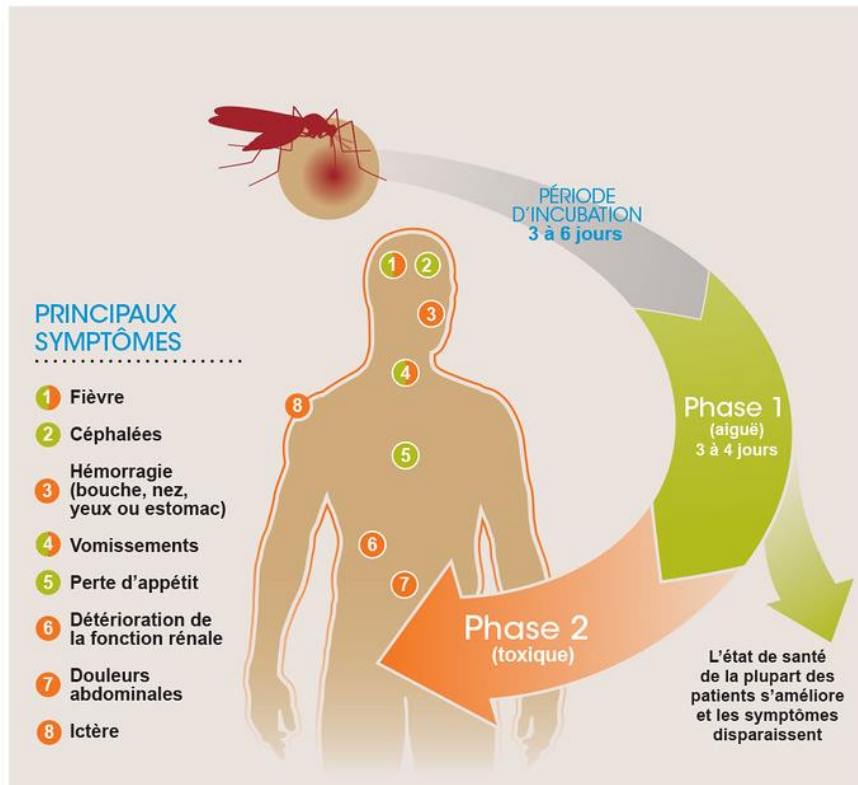


Figure 19 : Les différentes étapes de la fièvre jaune (tiré de Sanofi, 2019).

4.1.2. Diagnostic

Les symptômes non spécifiques de début d'infection rendent le diagnostic différentiel de la fièvre jaune particulièrement difficile en l'absence d'isolement du virus chez le patient. Des pathologies tropicales telles que les fièvres hémorragiques (dengue, fièvres hémorragiques virales, fièvres récurrentes ou encore les hépatites) présentent des symptômes similaires à ceux de la fièvre jaune. De plus, d'autres affections à prédominances rénale, hépatique ou encore cardiaque telles que les hépatites virales ou la leptospirose peuvent également être confondues avec des symptômes caractérisant la phase sévère de la fièvre jaune. Le virus peut

être détecté par RT-PCR, dès 1 jours après le début des symptômes, dans le sang, le liquide céphalo-rachidien, les urines ou d'autres organes (231). Une sérologie permettant la recherche d'IgM peut être réalisée par ELISA à partir de 6 jours après le début des symptômes. Cette technique est d'ailleurs recommandée par la Pan American Health Organization (PAHO) comme outils de référence pour la détection du virus (232). La recherche d'IgG peut confirmer le diagnostic. Des biopsies post-mortem montrant l'abondance de cellules inflammatoires peuvent également être réalisées sur les victimes (233). Afin de faciliter le diagnostic de la fièvre jaune, l'OMS a mis en place un guide de diagnostic et un classement où la définition de la maladie a été afin d'établir des critères stricts de diagnostic. Les cas sont répartis en « cas présumé », « cas probable » et « cas confirmé » avec des critères établis pour chaque catégorie. Les sérodiagnostics sont réalisés afin de confirmer la dernière catégorie (234), (235).

4.1.3. Traitements et vaccins

4.1.3.1. Traitements

Il n'existe actuellement aucun traitement spécifique contre la fièvre jaune. Il n'existe pas d'antiviraux spécifiques, on ne peut que traiter les symptômes et non éliminer la maladie. Cependant, plusieurs composés avec une action antivirale ont été décrits comme la ribavirine et les interférons alpha. Les interférons alpha utilisés sur des singes infectés étaient peuvent ralentir l'évolution de la maladie et réduire la virémie mais n'ont aucun effet sur la survie du singe qui mourrait tout de même des suites de la maladie. Des essais utilisant la ribavirine sur des singes infectés ont montré des résultats très controversés.

4.1.3.2. Vaccins

Suite à l'isolement du virus en 1937, deux vaccins contre la fièvre jaune ont été élaborés, à partir de deux isolats viraux différents, le vaccin « French Neurotropic Vaccine » (FNV) français et le vaccin 17D américain.

Le FNV, un vaccin vivant atténué a été élaboré à partir de la souche française de YFV isolée par l'Institut Pasteur de Dakar en 1927 au Sénégal. Ce virus fut atténué par passages successifs (128 fois) sur des cellules de cerveau de souris ((77)). Entre 1950 et 1960, ce sont près de 40 millions de personnes qui furent vaccinées dans les pays francophones d'Afrique.

Cependant, bien que les cas de fièvre jaune diminuaient significativement, ce vaccin a été associé à des encéphalites diagnostiquées chez les enfants. Cela a eu pour conséquence l'arrêt de la vaccination avec le FNV en 1961 et la fermeture des usines de production en 1980.

Le vaccin 17D a été développé par Theiler et Smith en 1937 à partir de la souche de virus isolé en 1927 au Ghana par l'équipe américaine. Ce vaccin fut obtenu par passages successifs du virus sur des cellules de souris et des embryons de poulet (200 fois) conduisant à une atténuation avec réduction des complications viscérotropes et une perte de la capacité du moustique à transmettre le virus tout en gardant, la capacité à induire une réponse immunitaire protectrice chez le singe et l'homme. Il est considéré comme l'un des vaccins les plus sûrs et efficaces. Il confère une protection de longue durée (environ 10 ans voire toute la vie). Actuellement, deux souches du vaccin (17D-204 et 17DD) sont utilisées lors des campagnes de vaccination et près de 500 millions doses ont déjà été distribuées à l'heure actuelle. Il existe quatre sites de fabrication du vaccin dans le monde qui produisent entre 20-25 millions de doses par an. L'OMS recommande, dès l'enfance, la vaccination dans les pays endémiques pour la fièvre jaune. Une dose de vaccin contient environ 10^5 pfu/ml de virus et fournit une immunité sur au moins 10 ans ; les anticorps anti-YFV restent même détectables dans le plasma après plus de 35 ans.

4.1.4. Épidémiologie

La fièvre jaune est une maladie décrite pour la première fois en Afrique, il y a environ 1500-3000 ans. En dépit de son origine africaine, les premières épidémies sont décrites à la Barbade en 1647 puis à Saint Christophe dans la Caraïbe (236). L'épidémie se répandit ensuite sur le continent américain en 1648 au Yucatan avant d'atteindre l'Afrique (Sénégal) en 1778. Depuis, la fièvre jaune est endémique sur les deux continents, dans 44 pays d'Afrique Sub-saharienne et d'Amérique du Sud. Les régions à risque concernent les pays qui hébergent le vecteur *Ae. aegypti*, ce qui représente environ 900 millions de personnes d'après les estimations de l'OMS. Ainsi, 508 millions de personnes dans 32 pays d'Afrique et 392 millions dans 12 pays d'Amérique du Sud et d'Amérique Centrale sont donc à risque. L'OMS recense environ 200 000 cas d'infections et 30 000 morts par an dont environ 90% se produisent en Afrique (237). Le taux de mortalité de la fièvre jaune est compris entre 20% et 60% avec un nombre de cas sévères compris entre 51 000 et 380 000 par an (238, 239). En Afrique, le taux de mortalité parmi les personnes symptomatiques atteint 40-60%. Le virus y

circule selon trois cycles (forestier, savane et urbain). En Amérique, des épidémies ont été historiquement rapportées du Nord du Panama jusqu'au Nord de l'Argentine. Aujourd'hui, l'activité du virus est rapportée majoritairement dans le bassin amazonien. Dans cette partie du monde, le virus est seulement maintenu dans un cycle forestier, le cycle urbain n'intervenant que de manière sporadique. Les cas de fièvre jaune se produisent généralement durant la saison des pluies au moment où la densité de populations de moustiques du genre *Haemagogus* est importante. Depuis 1985, le nombre de cas de fièvre jaune en milieu urbain est en augmentation (Bolivie, Pérou, Paraguay et Brésil). L'intensification des voyages augmente les risques de diffusion du virus au-delà de son aire de distribution actuelle. Depuis 1964, neuf cas de fièvre jaune ont été recensés en Europe, en Amérique du Nord et en Guyane française. Il s'agissait, dans tous les cas, de touristes revenant d'Afrique de l'Ouest et d'Amérique du Sud, ayant développé la maladie une fois rentrés dans leur pays. Bien heureusement, aucun n'a généré de cas secondaires (83, 240-242) (Figure 20).



Figure 20 : Carte de répartition du virus de la fièvre jaune (tiré du CDC, 2021).

4.2. Contexte historique

4.2.1. Emergence de la fièvre jaune dans la Caraïbe et en Amérique

Du 17^{ème} siècle jusqu'au début du 20^{ème} siècle, la fièvre jaune représentait une menace majeure pour la Caraïbe et les Amériques avec des épidémies meurtrières principalement urbaines. Elle a engendré des pertes économiques majeures et a joué un rôle significatif sur la géopolitique à l'ère coloniale dans cette région. L'arrivée en Amérique de ce virus originaire d'Afrique semble étroitement liée à la traite des esclaves (15^{ème} et le 19^{ème} siècle) (78). Avec l'installation de plantations cannes à sucre aux Antilles créant le besoin d'une importante main d'œuvre, près de 12,5 millions d'esclaves ont été déportés d'Afrique de l'Ouest vers les Amériques et la Caraïbe. Le virus fut introduit à partir de moustiques et d'hommes infectés embarquant sur les navires négriers (236). Durant la traversée depuis les côtes d'Afrique de l'Ouest, les hommes et le vecteur *Ae. aegypti* étaient confinés dans les cales des bateaux avec de grandes quantités d'eau potable créant ainsi des conditions idéales pour et la prolifération des moustiques et donc la transmission du virus.

Les premières épidémies dans la Caraïbe ont commencé en 1640 en Guadeloupe et se sont étendues à la Barbade (1647), Cuba (1649), la Jamaïque (1655), Sainte-Lucie (1665), la Martinique (1682), la Guyane Française (1762) et Saint Kits (1648). La Caraïbe connut diverses épidémies dévastatrices, notamment celle de Cuba en 1762 qui fit 8 000 victimes sur les 15 000 soldats britanniques, et celle de Saint-Domingue (Haïti) en 1803-1804 où l'armée française perdit 50000 à 55000 hommes durant la bataille pour l'indépendance de l'île. Cette dernière épidémie sera répertoriée à postériori comme étant la plus meurtrière dans la Caraïbe (77, 243).

En Amérique du Nord, la fièvre jaune est arrivée en 1648 au Yucatan puis des épidémies ont fait rage dans la région entre le 17^{ème} et le 19^{ème} siècle. En 1668, elle est arrivée à Philadelphie et New York. La ville de Philadelphie a connu 20 épidémies, New York 15, Boston 8 et Baltimore 7 (243). En 1878, la Vallée du Mississippi subit une épidémie de grande ampleur causant 13000 cas de fièvre jaune dont 5000 morts. L'Amérique du Sud fut touchée par l'arrivée du virus en Colombie, en 1741 ; avec près de 13000 soldats morts de la fièvre jaune sur les 20000 engagés dans l'attaque de Carthagène. L'une des épidémies majeures que connut l'Amérique est celle qui se déroula durant la première tentative de construction du canal du Panama entre 1880 et 1888 par Ferdinand de Lesseps causant 52000 cas de fièvre jaune et malaria dont plus 22000 morts (77, 243).

La fièvre jaune a atteint l'Europe pour la première fois en 1730 à Cadix en Espagne suite aux échanges entre l'Amérique, la Caraïbe et l'Europe où elle causa 2200 décès en deux mois (septembre, octobre). La fièvre jaune atteignit de multiples villes d'Europe causant des épidémies sur son passage, montrant ainsi que la transmission du virus pouvait avoir lieu dans des régions tempérées avec la présence d'un vecteur compétent pour le virus. C'est ainsi que la fièvre jaune affecta l'Espagne avec 100 000 victimes, la France, le Portugal à Lisbonne (en 1857, plus de 6000 décès), l'Angleterre et l'Italie (77) (243).

En Afrique, la première épidémie de fièvre jaune fût décrite en 1768 par Lind au Sénégal ; elle aurait décimé les troupes britanniques qui se trouvaient à Saint-Louis.

C'est à cette période, à Cuba que Carlos Finlay (1881) et plus tard, Walter Reed (1900) ont confirmé le rôle du moustique *Ae. aegypti* dans la transmission du YFV (8, 77).

4.2.2. Découverte du vecteur de la fièvre jaune

4.2.2.1. Carlos Finlay

Carlos Finlay était un médecin cubain qui fut le premier en 1881 à avoir émis l'hypothèse que la fièvre jaune était véhiculée par le moustique *Ae. aegypti* (qu'il appelait *Culex fasciatus*). Ce ne sont pas les "miasmes" c'est-à-dire l'environnement ni les fourmis vivant dans les maisons qui serait la cause des épidémies de fièvre jaune mais plutôt les moustiques présents en fortes densités durant les mois humides et chauds de l'été. La présentation de cette théorie sur la propagation de la maladie dans "The Annals of the Academy of Medical, Physical, and Natural Sciences of Havana" a été catégoriquement rejeté en 1881. Finlay passa ensuite les 20 années suivantes à essayer de démontrer sa théorie. Pour cela, il mena diverses expériences sur l'homme. L'une d'entre elles consistait à infecter 102 personnes volontaires avec des moustiques préalablement infectés par la fièvre jaune. Dans un premier temps, une centaine de moustiques ont été infectés en les présentant aux patients atteints de fièvre jaune. Les moustiques potentiellement infectés ont ensuite été présentés à des volontaires non malades ; certains volontaires tombaient malades et pas d'autres. Ces observations ont conduit Finlay à établir que le moustique était le vecteur de la maladie. Cependant le fait que tous les volontaires n'avaient pas développé la maladie, a posé un problème au conseil qui a examiné ses travaux ; Finlay n'a pu expliquer cette disparité ne sachant pas que les patients restaient infectés durant les 3 à 5 premiers jours de la maladie avant une rémission. Le conseil a

souligné d'autres biais comme le fait que les volontaires n'ont pas été suffisamment isolés du reste de la population pendant l'expérience, ce qui entachait la fiabilité des résultats. Finlay abandonna ses travaux sur la fièvre jaune et devint officier chef de la santé de Cuba ; il mena des travaux sur le tétanos infantile et mis en place des mesures sanitaires afin d'enrayer cette maladie.

4.2.2.2. Walter Reed et la validation des travaux de Finlay

L'hypothèse d'une transmission par un moustique ne fut finalement admise qu'en 1900 quand Walter Reed prouva la théorie de Finlay. Reed ne fut pas immédiatement convaincu par la théorie de Finlay. C'est Jesse William Lazear, jeune chirurgien de la « Yellow Fever Commission » dirigé par Reed qui fût l'instigateur de ce travail. En effet, il reproduisit l'expérience de Finlay mais fût lui-même infecté *via* la pique d'un moustique et mourut 13 jours plus tard avant d'avoir pu finir ses travaux. À la suite de ces événements, Reed décida de mener lui-même les expériences de confirmation de la théorie de Finlay en l'honneur de Lazear. Pour cela, Finlay lui fournit des moustiques et Reed fit la même expérience en modifiant le protocole d'isolement des volontaires non immunisés (Camp de Lazear). Après six tentatives, les travaux de Reed mirent en évidence l'implication direct du moustique dans la transmission du YFV en tant qu'hôte « intermédiaire ». Les moustiques femelles (*Culex fasciatus*) avaient été gorgés sur des patients atteints de fièvre jaune modérée, sévère ou fatale. Puis, 14 à 24 jours plus tard, ces mêmes moustiques ont été mis en présence des volontaires qui développèrent par la suite la maladie. Ces travaux ont eu de nombreuses répercussions notamment sur la mise en place de moyens de lutte contre le vecteur (le programme Rockefeller) .

A cette même période, le concept de période d'incubation extrinsèque (PIE) fut mis en évidence. En effet, les volontaires piqués par des moustiques ayant été gorgés sur des malades 2 à 10 jours plus tôt ne développaient pas la maladie alors que ceux infectés avec des moustiques plus âgés, développaient la maladie. Les membres de l'équipe en déduirent que la PIE minimale pour la transmission du virus par le moustique était de 12 jours après l'infection (12 jours en été et 18 jours en hiver). Ces observations avaient été mises en lumière par Henry Carter de la «Yellow Fever Commission» lors de tentatives indépendantes de mise en évidence du mode de transmission de la maladie (Figure 21) (8, 244). D'autres expériences montrèrent que le moustique était capable de transmettre la maladie même 57 jours après

infection et donc restait infecté toute sa vie. Par la suite, Reed émit l'hypothèse que l'agent de la fièvre jaune était filtrable et donc assimilable à un virus (245) en utilisant le filtre de Chamberland qui permit la découverte du premier virus en 1898.



Figure 21 : Les membres ayant participé à la découverte du vecteur de la fièvre jaune avec Henry Rose Carter (a), William C. Gorgas (b), Carlos Finlay (c) et les membres de la Yellow Fever commission en 1900, Walter Reed (d), Aristides Agramonte (e), Jesse Lazear (f) et James Carroll (g) (tiré de Chaves-Carballo (2005)).

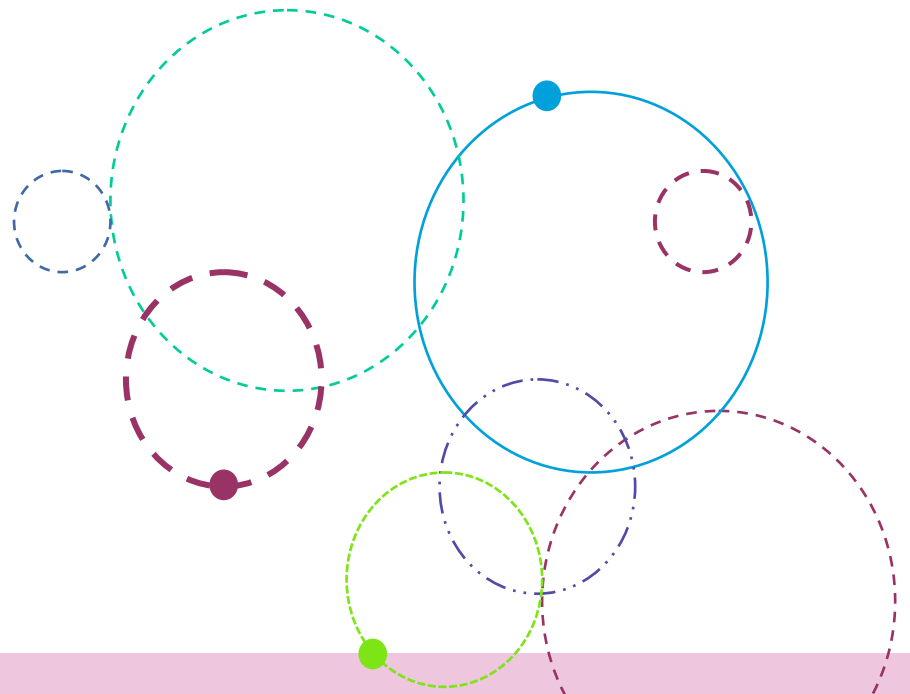
4.2.3. Eradication du vecteur de la Caraïbe et d'Amérique puis ré-infestation

Cette découverte a mené à des mesures de lutte antivectorielle mises en place par William C. Gorgas. La destruction des moustiques (adultes et stades larvaire) et la mise en quarantaine des malades de fièvre jaune ainsi que la surveillance des mouvements portuaires, a permis d'éliminer les cas de fièvre jaune de l'île de Cuba en cinq mois. Ces mesures et leur contrôle par W. C. Gorgas permirent également de limiter les épidémies qui frappaient les troupes américaines qui construisaient le canal de Panama en 1904. Cependant, la surveillance du moustique n'ayant pas été maintenue, a conduit à la recolonisation progressive du moustique dans les îles de la Caraïbe et en Amérique latine. Suite au programme d'éradication du vecteur de la fièvre jaune, l'Amérique enregistra sa dernière épidémie en 1905 à la Nouvelle-Orléans, qui avait causé environ 1000 morts. La Martinique connut sa dernière épidémie en 1908 comptabilisant 19 morts (246).

4.2.3.1. 1908, date de la dernière épidémie à la Martinique

La Martinique connut sa dernière épidémie de fièvre jaune en 1908. Au même moment, différentes épidémies se sont déclenchées dans plusieurs îles de la Caraïbe (Trinidad, Barbade, Surinam) et l'on pensa que cette épidémie était liée à une importation de la maladie

par bateau. Cependant, des données concernant la mise en quarantaine des bateaux ainsi que les données sur les cas recensés à la Martinique indiquaient que cette affirmation était inexacte. La Martinique connut de multiples épidémies entre 1850 et 1907 indiquant que l'épidémie de 1908 tirerait son origine de l'île elle-même. Durant les années 1895 à 1900, il a été recensé environ 120 cas dont 70 décès. Cette période fut entrecoupée de périodes dite inter-épidémiques qui durèrent jusqu'en 1907-1908, pendant lesquelles, des cas de fièvre jaune n'étaient pas observés mais on observait des fièvres « inflammatoires ». En fait, ces fièvres correspondraient dans les pays endémiques pour la fièvre jaune, et en particulier à la Martinique, à une forme bénigne dite « inflammatoire » et aux formes moins sévères de fièvre jaune retrouvées surtout chez les enfants. Les formes graves ou mortelles de la maladie seraient une exception parmi la population autochtone et séviraient principalement chez les étrangers et les Européens. L'épidémie de 1908 aurait pris sa source dans la ville de Fort-de-France (avec un plus grand nombre de cas) et se serait propagée à toutes les communes, bourgs et colonies situés au Sud de l'île. Au total, environ 1128 cas suspects auraient été recensés dont environ 206 cas confirmés (100 européens et 106 créoles) et environ 37 morts (19 européens, 11 créoles et 7 cas indéfinis probablement des créoles). Les cas probables représentaient surtout des enfants, pour lesquels le diagnostic était plus compliqué. Aucun cas ne fut recensé dans la partie Nord de l'île au cours de l'épidémie de 1908. Cela était peut-être dû à l'immunité acquise par la population lors de l'épidémie de 1895 qui ne toucha que la partie Nord de l'île (Saint-Pierre, Basse-Pointe), Fort-de-France et d'autres bourgs de la colonie. Au cours de l'épidémie de 1908, il n'y eut que peu de cas de fièvre jaune répertoriés même avec la présence d'*Ae. aegypti* en fortes densités. Des méthodes de lutte antivectorielle consistant à détruire les gîtes larvaires avaient été mises en place en préventif dès le mois de novembre 1908 par une « mission d'étude », prouvant ainsi leur efficacité sur le faible nombre de cas observés et la disparition progressive de l'épidémie. De plus, on peut supposer que les personnes ne développant que les formes bénignes de fièvre jaune lors des épidémies précédentes, pourraient avoir acquis une immunité face au virus contribuant ainsi à la réduction considérable du nombre de cas (246),(247).



Chapitre 5

Le virus de la fièvre jaune

Le virus de la fièvre jaune fût le premier arbovirus identifié et le premier *Flavivirus* isolé et caractérisé.

Dans ce chapitre, sont présentées les caractéristiques du virus, ainsi que son cycle de réplication, sa phylogénie, sa distribution et son cycle de transmission.

Chapitre 5 : Le virus de la fièvre jaune

5.1. Caractéristiques (isolement, structure et organisation du génome)

Le virus de la fièvre jaune (YFV) est un prototype du *genre Flavivirus* ; il a été isolé pour la première fois en 1927 au Ghana par Adrien Stokes à partir du sérum d'un patient atteint de fièvre jaune modéré (la souche Asibi) suite à l'infection successive de 30 singes (*Macacus rhesus*) via la récupération puis l'injection de fluides corporels filtrés. Le YFV est un virus enveloppé sphérique avec une capsidie icosaédrique de 50 nm de diamètre (Figure 22). Son génome est constitué d'une molécule d'ARN monocaténaire de polarité positive, qui se réplique dans le cytoplasme des cellules infectées. Les hépatocytes sont le principal site de réplication du virus et l'infection virale est directement responsable du dysfonctionnement hépatique, rénale et cardiaque. Le génome contient un seul cadre ouvert de lecture d'environ 10233 nucléotides. Il est flanqué de régions non traduites riche en structures secondaires : une coiffe à l'extrémité 5' mais pas de queue poly-A en 3'. Cet ARN code une polyprotéine composée de trois protéines structurales : la protéine C (capsidie), la protéine membranaire M, la glycoprotéine d'enveloppe E (les protéines E et M constituent l'enveloppe du virus) et sept protéines non-structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5) (Figure 22).

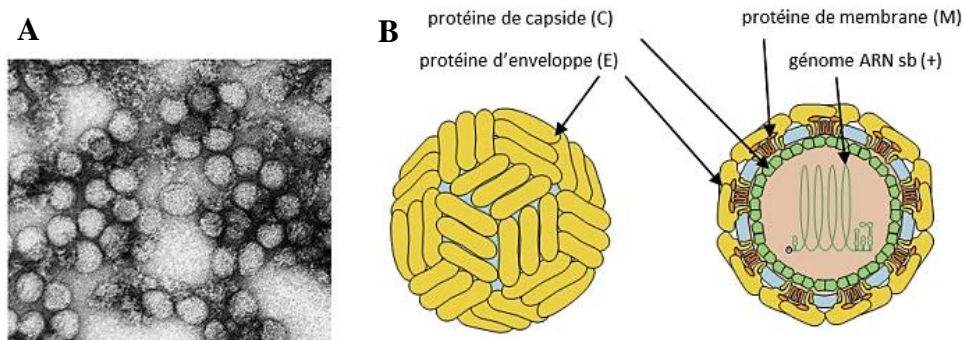


Figure 22 : Structure du virus, au microscopie électronique (A) et schématisée (B).

5.2. Cycle de réplication du virus de la fièvre jaune

L'entrée du virus dans la cellule se fait par endocytose clathrine-dépendante suite à la liaison de la protéine E virale à son récepteur DC-SIGN, récepteur au mannose (il n'existe pas de

récepteurs spécifiques). Dans l'endosome, l'enveloppe virale sous l'action du faible pH fusionne avec l'enveloppe cellulaire suite au changement de conformation de la protéine E, libérant ainsi le génome viral dans le cytoplasme de la cellule. L'ARN viral est traduit en une polyprotéine qui, une fois clivée, codera pour les trois protéines structurales et les sept protéines non structurales. Grâce au complexe de réplication formé par le génome virale, l'hélicase virale NS3 (et ces co-facteurs) et l'ARN polymérase ARN dépendante NS5, celui-ci réplique le génome viral au sein de la membrane du réticulum endoplasmique en utilisant le brin de polarité négative comme matrice pour répliquer le génome viral de polarité positive qui sera ensuite encapsidé dans le virion. Les particules virales immatures vont ensuite acquérir leur capsid dans le réticulum endoplasmique et subir un processus de maturation par clivage du complex prM-E par la protéase furine sous l'action du pH dans l'appareil de Golgi. Les virions sont libérés des cellules par exocytose où ils vont acquérir certaines des protéines d'enveloppe de la cellule. Afin de permettre ce cycle, les protéines non structurales codées par l'ARN viral possèdent différents rôles. La protéine NS1 est une glycoprotéine impliquée dans la pathogénicité et la virulence en inhibant l'activité de la cascade du complément. Pour cela, elle s'associe à la surface des cellules. La protéine NS3 est une enzyme centrale pour le fonctionnement du cycle viral des *Flavivirus*. Son extrémité N-terminale a une activité sérine protéase et joue un rôle dans le traitement de la polyprotéine avec son cofacteur NS2B tandis que son extrémité C-terminale permet la séparation du brin d'ARN pendant le processus de réplication grâce à son activité NTPase/hélicase. La protéine NS5 possède deux activités enzymatiques très importantes dans le cycle viral, une activité permettant la formation de la coiffe de l'ARN, située à l'extrémité N-terminale de NS5 et une activité enzymatique ARN polymérase ARN-dépendante permettant la réplication du génome viral située à son extrémité C-terminale. Les autres protéines NS2A, NS2B, NS4A et NS4B, semblent jouer un rôle dans l'assemblage du virus, même si leurs fonctions ne sont pas encore totalement comprises (Figure 23).

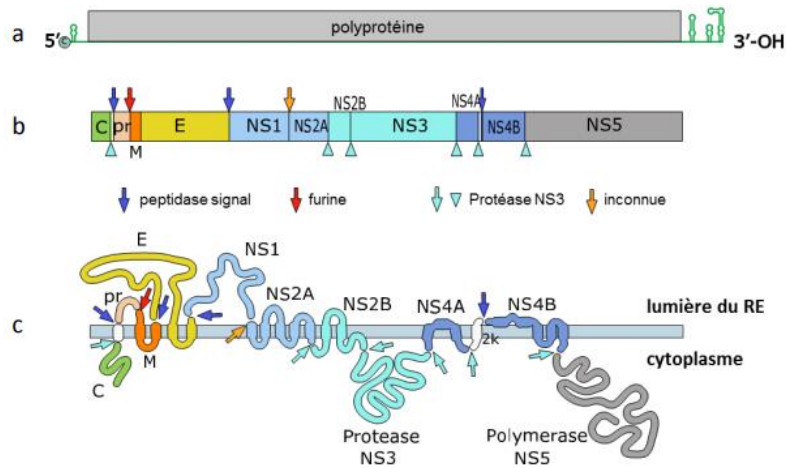


Figure 23 : Organisation du génome viral (tiré de <https://viralzone.expasy.org/>).

5.3. Distribution et phylogénie de YFV

Un seul sérotype de YFV a été mis en évidence à ce jour, et sept génotypes de YFV ont été identifiés sur deux continents : 5 génotypes circulant en Afrique (Ouest Afrique I, Ouest Afrique II, Est/Centre Afrique, Angola, Afrique de l'Est) et 2 génotypes circulant en Amérique (Amérique du Sud I et Amérique du Sud II) (248) (Figure 23). Toutes ces souches sont homologues mais présentent néanmoins jusqu'à 21,5 % de divergence nucléotidique et 5,2% de différences en séquences d'acides aminés (249). Des études montrent une grande hétérogénéité entre les cinq souches de YFV africaines. En effet, les génotypes Africains présentent jusqu'à 25,8% de divergence nucléotidique et 9,1% de variations au niveau acides aminées (248). De plus, les génotypes Afrique de l'Ouest II et Afrique de l'Est/Centrale sont des virusenzootiques alors que le génotype Afrique de l'Ouest I pourrait circuler parmi les populations humaines, même si les séquences nucléotidiques et d'acides aminés entre les génotypes I et II d'Afrique de l'Ouest sont proches (248). De manière intéressante, il a été montré par une approche phylogénétique que le génotype Angola est le plus divergent des autres lignées africaines : on retrouve une différence de séquences nucléotidiques de 15,7-18,5% et une divergence d'acides aminés de 0,4%-0,9% avec les lignées d'Afrique Est/Centre suggérant une probable divergence de la souche Angola d'un ancêtre commun YFV d'Afrique Est/Centrale de nombreuses années avant la séparation des souches Est/Centre Afrique et Est

Afrique (248) ; (249) ; (78). Ces études estiment également que l'ancêtre commun de toutes ces lignées aurait émergé en Afrique entre 700 et 1200 ans avant que le premier génotype de YFV n'émerge (78).

Les souches de YFV d'Amérique du Sud sont phylogénétiquement très proches de celles d'Afrique de l'Ouest suggérant ainsi leur origine africaine ; elles ont été probablement introduites durant la traite des esclaves (78); (249). En Amérique du Sud, les données phylodynamiques du virus suggèrent que les récentes épidémies de fièvre jaune ont été initiées par différents génotypes provenant de différentes régions. Les dernières épidémies ont été principalement causées par le génotype d'Amérique du Sud I, qui aurait été importé au Nord du Brésil depuis Trinidad et Tobago et serait responsable des épidémies des années 1980 ainsi que de plusieurs épidémies durant le 21^{ème} siècle. Cette lignée semble être à l'origine des sous-lignées actuelles du génotype Amérique du Sud I (1D et 1E) (250). Le génotype le plus récent appartient au génotype Amérique du Sud II qui date de 1956 ; il serait remonté du Pérou vers les pays voisins de la Bolivie, de l'Equateur, du Nord du Brésil, de Trinidad et Tobago, où seules des transmissions selvatiques du YFV ont été signalées. Il serait responsable de l'épidémie urbaine de 2006 survenue en Bolivie (250) (Figure 24).

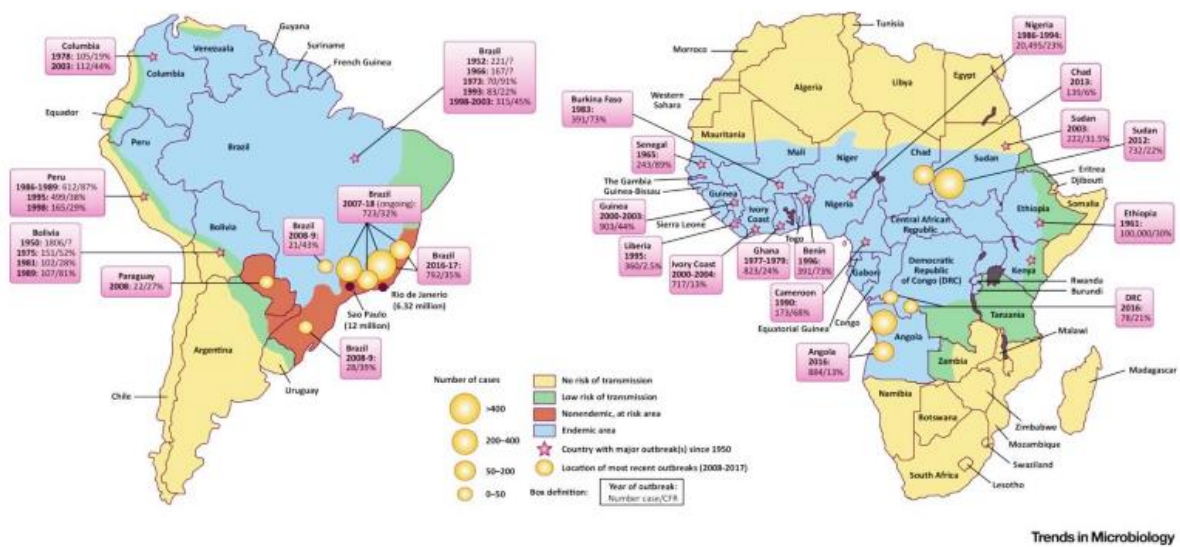


Figure 24 : Régions endémiques pour la fièvre jaune et zones épidémiques depuis 1950 (tiré de (3)).

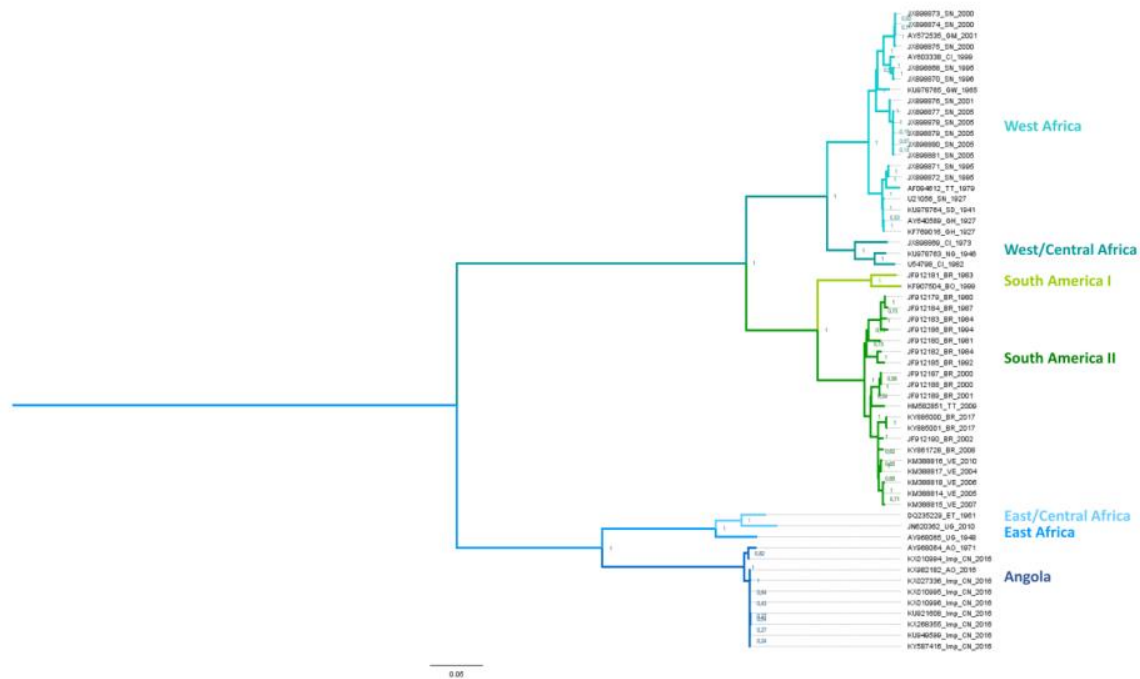


Figure 25 : Représentation phylogénétique des différentes souches de YFV. Les 7 génotypes sont représentés par des couleurs différentes. Les deux souches américaines sont proches des souches d’Afrique Centrale/Ouest et distantes des souches d’Afrique Centrale/Est et d’Angola indiquant que les génotypes américains proviennent des souches d’Afrique de l’Ouest (tiré de (251)).

5.4. Cycles de transmission en Afrique et Amérique

La majorité des arbovirus circulent dans un cycle enzootique impliquant des animaux sauvages ; il est également appelé « jungle cycle » ou cycle selvatique. L’implication de l’homme et des animaux domestiques dans ce cycle est accidentelle et est souvent due à des vecteurs relai qui font le lien entre le cycle selvatique et le cycle urbain. Comme présenté précédemment, la transmission du YFV peut se faire selon trois cycles de transmission différents en Afrique et en Amérique avec leurs propres vecteurs, leurs propres hôtes vertébrés et leur propre écosystème. Le **cycle selvatique** (ou zone d’endémicité) implique une transmission entre les primates non humains (PNH) et les moustiques zoophiles : du genre *Aedes* (e.g. *Ae. africanus*) présents dans la canopée des forêts en Afrique et des genres *Haemagogus* et *Sabethes* (e.g. *Haemagogus janthinomys*, *Haemagogus leucolaenus*, *Sabethes chloropterus*) en Amérique. Contrairement aux PNH d’origine africaine (*Colobus spp.*, *Cercopithecus spp.*, *Gorilla spp.*), les singes d’Amérique (*Alouatta spp.*) peuvent mourir après une infection par le YFV. Les humains peuvent être contaminés par des moustiques anthropo-

zoophiles (*Haemagogus* et *Sabethes spp.*) aux abords ou dans les forêts ; c'est la zone d'émergence. En Afrique, le **cycle intermédiaire** (savane ou émergence) implique les moustiques anthro-zoophiles du genre *Aedes* (*Aedes bromeliae*, *Aedes furcifer*, *Aedes taylori*, *Aedes africanus*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes metallicus*, *Aedes opok*, *Aedes vittatus*, *Aedes simpsoni*) qui sont responsables de la transmission du virus aux humains vivant ou travaillant aux abords de la jungle ou en zone rurale. En Amérique, le cycle intermédiaire n'existe pas, cependant des études montrent que le moustique *Ae. albopictus* compétent pour le YFV peut jouer le rôle de vecteur relai (28). En raison de son caractère à la fois anthropophile et zoophile, ce dernier pourrait être impliqué dans les épidémies au Brésil. Ce vecteur a été retrouvé naturellement infecté jusqu'à 300 mètres à l'intérieur de la forêt (252). Le **cycle urbain** (ou épidémique) décrit la transmission du virus entre hommes ; il est principalement réalisé par le moustique urbain anthropophile *Ae. aegypti* (Figure 26 et 27). Ce cycle est initié lorsqu'un homme en phase virémique, infecté par un moustique de la jungle ou de la savane, se fait piquer par un moustique urbain qui une fois infecté, va transmettre le virus à d'autres personnes et ainsi déclencher l'épidémie. *Ae. albopictus* pourrait jouer un rôle important dans la transmission urbaine du YFV au Brésil. Pendant la saison sèche ou pendant les périodes trop froides, le YFV peut être maintenu par le mécanisme de transmission verticale dans les œufs de moustiques avec un taux d'environ 1.4%, ce qui contribuerait à son maintien dans la nature.

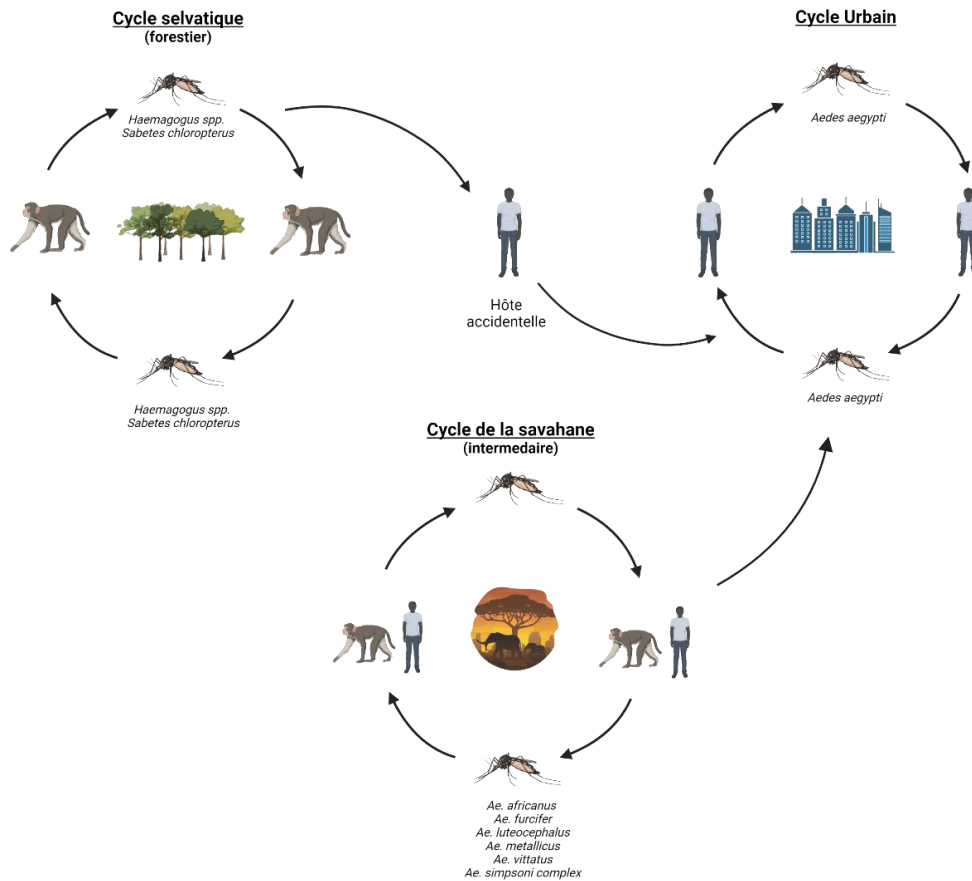
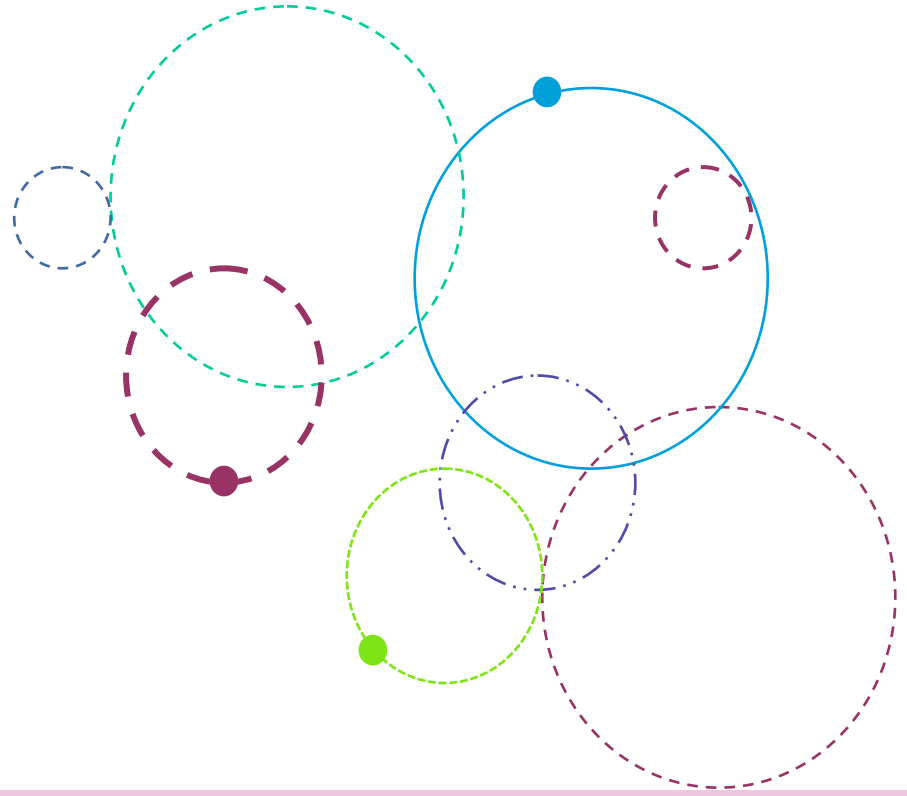


Figure 26 : Cycle de transmission du virus de la fièvre jaune. En Amérique, le virus est présent au sein d'un cycle selvatique dans les forêts. Il n'y a pas de cycle urbain. Cependant lors d'une infection accidentelle de l'homme, ce dernier est alors capable d'initier un cycle urbain. En Afrique, le virus est présent dans un cycle selvatique, toutefois la contamination de l'homme se fait lors du cycle intermédiaire de la Savane où ce dernier est en contact avec le moustique et les animaux. L'homme ainsi contaminé sera alors capable d'initier un cycle urbain.



Figure 27 : Vecteurs du virus de la fièvre jaune, *Haemagogus sp.* (a), *Sabethes sp.* (b) et *Aedes aegypti* (c)
(photos extraites de internet).



Chapitre 6

Le contexte de la Caraïbe

Ce chapitre établit un état des lieux des maladies à transmission vectorielle au sein de la Caraïbe.

Ce chapitre présente les vecteurs et les arbovirus présents dans les îles et les méthodes de lutte employées. On abordera le cas de l'île de Trinidad où le virus de la fièvre jaune circule au sein d'un cycle selvatique.

Chapitre 6 : Contexte de la Caraïbe

6.1. Les arbovirus d'importance médicale présents dans la Caraïbe

Dans la Caraïbe, on dénombre depuis quelques années la présence de trois arbovirus d'importance médicale : le DENV et le ZIKV qui sont des représentants du genre *Flavivirus* comme le YFV et le CHIKV du genre *Alphavirus*. Tous sont transmis à l'homme par le moustique *Ae. aegypti*, vecteur dominant dans cette région.

Les virus de la dengue

Décrite depuis la fin du 18^{ème} siècle, la dengue est l'arbovirose la plus répandue dans le monde. Sévissant principalement dans les zones tropicales et subtropicales, on estime à 2,5 milliards le nombre d'individus vivant en zone endémique et à 50 millions le nombre d'infections annuelles (12) ; (13). Les quatre sérotypes du virus (DENV-1, DENV-2, DENV-3 et DENV-4) sont antigéniquement proches et transmis par la piqûre du moustique *Ae. aegypti*. Ce moustique est le principal vecteur et principal réservoir notamment grâce au mécanisme de transmission verticale (253) ; (254). Quant à *Ae. albopictus*, il est un vecteur potentiel de la dengue (85). A la Martinique, la transmission de la dengue est marquée par une transmission quasi permanente du virus sur l'ensemble du territoire, et par la survenue régulière d'épidémies de forte ampleur. Au cours des vingt dernières années, l'île a subi au moins une épidémie par an. On distingue deux périodes : une période épidémique correspondant à une augmentation des foyers de dengue de manière importante dans l'île, et une période inter-épidémique pendant laquelle, la dengue se transmet sporadiquement de manière plus ou moins importante. Des données montrent que 1 à 4 sérotypes du DENV peuvent circuler en même temps, conférant à la dengue un caractère hyper-endémique dans certaines régions (22) ; (255). La dernière grosse épidémie de DENV en Martinique dates de 2010 et a totalisé 43 990 cas, la Guadeloupe totalisait environ 17 000 cas.

Le virus du chikungunya

Le CHIKV est arrivé en 2013 sur le continent américain au Brésil (256), aux États-Unis (257) et dans certaines îles de la Caraïbe, à la Martinique, en Guadeloupe et en Guyane. Le 5 décembre 2013, le premier cas autochtone d'infection par le CHIKV dans la zone des Amériques, a été confirmé sur l'île de Saint-Martin. Ce virus appartient à la lignée asiatique

(Lanciotti & Valadere, 2014 ; Leparc-Goffart et al., 2014 ; Cassadou et al., 2014). Le virus s'est rapidement propagé aux îles voisines et arriva à la Martinique (confirmation du premier cas autochtone le 18 décembre 2013), en Guadeloupe (24 décembre 2013), à Saint-Barthélemy (30 décembre 2013) et a atteint la Guyane Française le 19 février 2014. De décembre 2013 à janvier 2015, 72520 cas suspects dont 83 décès liés à l'infection par le CHIKV ont été répertoriés à la Martinique (PAHO, 2016) et 81 200 pour la Guadeloupe.

Le virus du Zika

Originaire d'Afrique, Le ZIKV a été identifié pour la première fois en 1947, dans la forêt de ZIKA en Ouganda. En 2013, ce virus se propage de manière épidémique dans les îles du Pacifique atteignant l'île de Pâques en 2015. Le ZIKV, est rapidement arrivé en Amérique (Chili, Brésil, Colombie, Salvador, Guatemala, Mexique, Paraguay, Suriname et Vénézuéla (258), et dans la Caraïbe en 2015. Ainsi, la Martinique a connu son premier cas de Zika en décembre 2015. Au cours des 10 premiers mois de l'année 2016, 36 590 cas de Zika cumulé ont été recensés dont trois cas de microcéphalie et 28 patients présentant le syndrome de Guillain-Barré. En Guadeloupe et à Saint Martin, 30 775 cas et 2 670 cas cumulés respectivement ont été déclaré durant la même période. A saint Barthélemy s'il s'agissait de 820 cas.

6.2. Répartition de *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* dans la Caraïbe

6.2.1. *Aedes aegypti*

Le moustique *Ae. aegypti* comme nous l'avons montré dans la section 3.1. est originaire d'Afrique et fût transporté dans les îles de la Caraïbe lors de la traite des esclaves entre 15^{ème} et le 19^{ème} siècle en même temps que le YFV. *Ae. aegypti* a été le premier vecteur d'arbovirus identifié et le seul vecteur de la fièvre jaune identifié. Après de multiples tentatives d'éradication menées contre ce vecteur, *Ae. aegypti* est toujours présent dans toutes les îles de la Caraïbe. Il y est le vecteur majeur de DENV (149), CHIKV (259) ; (260) et ZIKV (105).

6.2.2. *Aedes albopictus*

Comme souligné dans la section 3.2., le moustique *Ae. albopictus* a subi une rapide expansion durant ces 50 dernières années. Depuis l'Asie du Sud-Est, il a pu envahir tous les continents grâce à la grande plasticité écologique de ses œufs, la capacité d'entrer en diapause et la capacité à résister à la dessiccation pendant des mois. Grâce à cette dernière caractéristique biologique, *Ae. albopictus* a pu envahir les Amériques à partir de 1985 *via* le commerce de pneus (167). Dans la Caraïbe, *Ae. albopictus* fait doucement son entrée dans les îles où *Ae. aegypti* reste pour le moment le vecteur prédominant. Ainsi, *Ae. albopictus* a été rapporté pour la première fois en République Dominicaine (172), puis aux îles Cayman en 1997 (261). Ce n'est qu'en 2012 qu'il a été rapporté dans six des 10 états en Haïti (262). *Ae. albopictus* a été détecté, par la suite, dans plusieurs îles de la Caraïbe notamment à Cuba (263), la Barbade (264), la Jamaïque (265) et même, à Trinidad (266). Il n'est pour l'instant pas présent en Martinique.

6.3. Contexte de la surveillance et de la lutte antivectorielle contre *Ae. aegypti* dans la Caraïbe

6.3.1. Lutte antivectorielle

En Martinique, la lutte antivectorielle (LAV) passe avant tout par la destruction des gîtes et la sensibilisation de la population. Quand la destruction des gîtes larvaires est impossible, l'utilisation du *Bti* est alors privilégiée étant le seul larvicide utilisé sur l'île depuis la suspension de l'utilisation du téméphos en 2010 par le ministère de la Santé. La LAV comprend également la pulvérisation spatiale ou intra domiciliaire de la deltaméthrine, qui est le seul adulticide utilisé depuis 1986 dans la Caraïbe et en Martinique (267). Les moustiques sont soumis depuis 1947, date de la première utilisation du DDT, à l'utilisation d'une large gamme d'insecticides en Martinique. Les fréquents emplois des insecticides ainsi que la surutilisation d'insecticides à usage agricole a conduit à la sélection de moustiques résistants aux pesticides et aux insecticides. Les études réalisées sur les populations de la Martinique ont décrit que toutes les populations testées présentaient la mutation Kdr (V1016I) impliquée dans la résistance à la deltaméthrine (*e.g.* 71% des moustiques du Vauclin présentent la mutation). De plus, une résistance métabolique avec la surexpression des gènes codant pour les enzymes de détoxification (CYP6M, CYP9J, CYP6Z, GSTe et CCEae3A), capables de dégrader

l'insecticide (CYP, GST et CCE) ainsi que des mutations d'acétylcholinestérase (G119S et F290V) suggèrent également des résistances à la deltaméthrine et au téméphos (268)

Cette résistance est constamment évaluée par des tests de résistance aux insecticides réalisés dans les laboratoires du Centre de Démoustication et de Recherche Entomologique - Lutte antivectorielle (CEDRE-LAV) sur les populations de moustiques récoltées sur le terrain.

6.3.2. Surveillance épidémiologique et entomologique

La surveillance des arboviroses à la Martinique s'inscrit dans le cadre du programme de surveillance, d'alerte et de gestion des épidémies (PSAGE) mis en place en 2006 (pour la dengue), puis en 2013 (pour le chikungunya) par l'Agence Régionale de Santé (ARS) et repose sur trois axes : (i) la surveillance épidémiologique (incluant la surveillance clinique, sérologique et virologique) ; (ii) la surveillance entomologique (incluant la LAV) et (iii) l'éducation sanitaire (sensibilisation de la population et mobilisation sociale).

La surveillance épidémiologique

Elle fait intervenir (i) la surveillance clinique, (ii) la surveillance sérologique et (iii) la surveillance virologique :

- **La surveillance clinique** : il s'agit d'un réseau sentinelle de médecins présents dans toutes les communes de Martinique signalant chaque semaine à l'ARS le nombre de cas suspectés d'infection par un arbovirus, ces cas devant être confirmés par analyse sérologique ;

- **La surveillance sérologique** : il s'agit de l'analyse sérologique des cas suspects. Une fois la confirmation effectuée, les laboratoires transmettent les résultats à la cellule de veille sanitaire (CVS) de l'ARS, qui sera alors chargée du déclenchement des alertes épidémiques et de l'information au CEDRE-LAV. Le CEDRE-LAV aura alors la charge de l'intensification de la LAV en menant notamment des actions de pulvérisations intra-domiciliaires ou spatiales (en cas de forte épidémie) ;

- **La surveillance virologique** : elle permet de déterminer les sérotypes viraux impliqués dans les infections constatées. Elle comprend différents acteurs locaux (Centre Hospitalier Universitaire de la Martinique) et nationaux (les Centres Nationaux de Référence de Cayenne et de Marseille).

La surveillance entomologique

Elle est assurée par le CEDRE-LAV dans toutes les communes de l'île. Cette structure est sous la direction conjointe de l'ARS et de la Collectivité Territoriale de Martinique (CTM). La structure est constituée de quatre unités : l'unité stratégique, l'unité de communication sociale, l'unité opérationnelle et l'unité recherche et d'innovation. Elle fait intervenir différents spécialistes (entomologistes médicaux, ingénieurs territoriaux, techniciens sanitaires, techniciens de laboratoire, rédacteurs, adjoints sanitaires, techniques et administratifs). Cette structure a pour mission l'information de la population (unité de communication sociale), l'assainissement du milieu individuel et collectif (unité opérationnelle), le développement d'approches participatives (unité stratégique) et l'utilisation rationnelle des produits biocides et/ou des agents biologiques dans la LAV (unité de recherche et d'innovation).

L'éducation sanitaire permet l'information de la population sur les risques que représente le vecteur moustique pour l'homme *via* la transmission des arbovirus (DENV, ZIKV, CHIKV). Cette éducation se fait en expliquant le processus de transmission des arbovirus, les moyens de lutte contre les moustiques (identification et destruction de gîtes) et les moyens de protection individuelle et collective existants et mis en place par la collectivité. Ce processus est effectué lors de visite à domicile, d'animations scolaires, de réunions publiques d'information, de spots télévisés ou radiodiffusés, d'affiches, de bandes dessinées, de panneaux d'exposition ou des campagnes d'opérations exceptionnelles (*e.g.* « opération Toussaint », « opération déCHIKtaj »..etc..). Ces programmes et opérations sont menés en étroite collaboration avec l'éducation nationale, les mairies, et les structures d'accueil.



Figure 28 : Situation géographique des îles de la Caraïbe et l'île de Martinique représentant les caractéristiques démographique et climatiques des quatre zones de la Martinique (tiré de CAESM, Communauté d'agglomération de l'espace sud de la Martinique)

6.4. Trinidad : maintenance et risque d'émergence au sein de la Caraïbe

6.4.1. Vecteurs

Les moustiques du genre *Haemagogus* font partie de la tribu *Aedini*. Il existe 28 espèces regroupées dans deux sous-genres, *Conopostegus* (4) et *Haemagogus* (24). Le genre *Haemagogus* est strictement néotropical, comprenant des moustiques principalement retrouvés dans les forêts tropicales humides, les canopées et parfois dans les mangroves. Les gîtes larvaires sont principalement les creux d'arbres, les végétaux de type broméliacées, les bambous coupés. Ce sont de très bons vecteurs selvatiques d'arbovirus (comme le YFV). Les moustiques du genre *Haemagogus* sont principalement zoophiles. Cependant, certaines espèces peuvent être aussi anthropophiles permettant la transmission du virus de l'animal à l'homme en milieu forestier.

6.4.2. La fièvre jaune à la Trinidad et à l'extérieur de la Trinidad

Située au sud de l'archipel Caraïbéen, la Trinidad est la seule île qui présente un cycle selvatique de la fièvre jaune (Figure 28) ; elle y est maintenue entre les primates non-humain (notamment le singe hurleur rouge *Alouatta*) et les moustiques du genre *Haemagogus* (269) ; (270). Comme pour le cycle selvatique au Brésil, la contamination des personnes se fait de manière accidentelle aux abords des forêts. La première épidémie de fièvre jaune à la Trinidad

date de 1793 (décrit par Wilbur George Downs de l'Université de Yale). De 1793 à 1989, la Trinidad a subi au moins 15 épidémies de fièvre jaune. Ces épidémies avaient une durée variable allant jusqu'à 10 ans (comme ce fut le cas de l'épidémie de 1905-1915) et survenaient de manière irrégulière, parfois plusieurs fois dans l'année. Jusqu'en 1828, les épidémies étaient plutôt à dominance urbaine et à partir de 1838, on a commencé à recenser des singes morts suggérant l'existence d'un cycle selvatique. En 1913-1914, lors d'une épidémie à caractère rural, l'évocation du singe comme hôte amplificateur du virus a commencé à émerger. Lors de la grande épizootie de 1954-1955, plusieurs singes ont été retrouvés morts et quatre cas humains fatals ont pu être diagnostiqués. Le virus a été isolé des singes *Alouatta* (7 fois dans le foie), des moustiques du genre *Haemagogus* (22 fois) et de l'homme (42 fois). Lors de la dernière sortie du virus du cycle selvatique (« spillover ») en 1978-1980 (isolement du virus des moustiques (19 pools d'*Haemagogus*) et des singes (6 *Alouatta*);), le virus a réussi à atteindre le continent américain en passant par le Nord du Brésil (1989) et le Venezuela (1992) où il a été à l'origine des épidémies observées en Amérique du Sud (génotype Amérique du Sud I, lignée 1D et 1E) (250) (271). Lors de cette épidémie, un programme de vaccination de masse fut entrepris pour lutter contre le virus à Trinidad. Ceci a eu pour effet une diminution des cas de fièvre jaune lors de l'épidémie de 1988-1990. Aujourd'hui, il n'y a plus de fièvre jaune circulant en cycle urbain mais on observe encore des épizooties. La vaccination reste encore actuellement le seul moyen de lutter contre la fièvre jaune. Les populations humaines vivant aux abords des forêts doivent être vaccinées dès l'âge de 1 an. Paradoxalement, les voyageurs entrant à Trinidad n'ont pas l'obligation de se faire vacciner (site du CDC, <https://www.cdc.gov/yellowfever/vaccine/vaccine-recommendations.html>). Avec les échanges entre les îles de la Caraïbe et l'omniprésence du vecteur *Ae. aegypti*, une nouvelle sortie du virus du cycle selvatique de Trinidad n'est donc pas à exclure.

6.5. Transferts du virus des zones endémiques vers les zones non endémiques pour la fièvre jaune

Les dernières épidémies urbaines en Amérique et en Afrique de l'Ouest semblent dater de 1928 (Brésil) et de 2015 (Afrique de l'Ouest) (83). Le cycle de transmission enzootique ne se prête pas à des interventions de contrôle, conduisant ainsi à des débordements récurrents dans la population humaine. En Afrique, le cycle rural et le cycle urbain s'ajoutent au cycle

selvatique. Ces débordements ont conduit à des épidémies de fièvre jaune dans des zones ne présentant pas de cas de fièvre jaune ou des zones avec une faible couverture vaccinale.

En Amérique, une réémergence des épidémies de fièvre jaune au Brésil provenant du cycle selvatique (272) a eu lieu entre 2016 et 2019 dans des zones avec une faible couverture vaccinale et où la vaccination n'est pas obligatoire causant ainsi 2166 cas confirmés et 751 morts. Cette épidémie serait partie des états du Nord du Brésil et ce serait propagé vers le Sud du Brésil où le virus ne s'était jamais manifesté (272).

De même, une épidémie a émergé en Angola en 2016 et en République Démocratique du Congo où la vaccination n'est pas obligatoire (273) causant 884 cas confirmés et 381 morts. Des campagnes de vaccination ont été organisées provoquant des ruptures de stocks de vaccins à trois reprises (274) et l'administration de doses fractionnées de vaccin au 1/5^{ème} au lieu d'une dose complète permettent ainsi de vacciner un plus grand nombre de personnes. Il semble que 1/50^{ème} de la dose de vaccin était suffisant pour induire une protection (275). Ces événements ont conduit à repenser le processus de production du vaccin anti-YFV afin d'anticiper les épidémies à venir. En 2017, une épidémie de fièvre jaune s'est déclarée au Nigéria, un pays bénéficiant pourtant d'une forte couverture vaccinale causant 341 cas suspects dont 45 décès

Toutes ces récentes épidémies ont eu pour conséquence le transport du virus par des voyageurs des zones endémiques vers des zones où la fièvre jaune n'est pas endémique. Lors des épidémies de 2016-2019 au Brésil, sept pays d'Europe dont la France ont dénombré des cas de fièvre jaune importés du Brésil (83). Durant l'épidémie d'Angola en 2016, 11 travailleurs chinois atteints de fièvre jaune ont introduit le virus d'Angola en Chine, en Asie jusqu'ici indemne de fièvre jaune (276) ; (26).

Dans les Antilles, des cas importés de fièvre jaune ont également été recensés en Guyane Française où depuis 1967, la vaccination est obligatoire pour les enfants à partir d'un an. En 1998, le premier cas de fièvre jaune a été observé depuis 1902 Il s'agissait d'une amérindienne qui a été admise à l'hôpital de Cayenne avec des symptômes manifestes de fièvre jaune ; le diagnostic fut confirmé par un test sérologique (242) (241). Deux autres cas de fièvre jaune en 2017 et 2018 ont été confirmés en Guyane Française ; il s'agissait d'une brésilienne admise à l'hôpital de Kourou en 2017 où elle mourut des suites de la maladie et d'un travailleur Suisse en 2018 qui mourut à Paris après avoir subi une transplantation du foie. Aucun n'était vacciné contre la fièvre jaune (240).

Cette augmentation dramatique de l'incidence de la fièvre jaune ces dernières décennies, montre que le virus se propage des zones endémiques vers les zones non endémiques pour la fièvre jaune, faisant craindre ainsi l'établissement de cycles de transmission en Asie ou dans les Antilles.

Objectif de la thèse

Comme nous l'avons vu au cours de cette introduction, l'étude des maladies à transmission vectorielle représente un intérêt majeur pour la Caraïbe en raison de la présence du moustique vecteur *Ae. aegypti* en très fortes densités et de l'arrivée progressive du moustique *Ae. albopictus* dans certaines îles depuis 1993. La Caraïbe et en particulier la Martinique sont, depuis des décennies, soumises à de régulières épidémies de dengue, au moins une par an avec une durée comprise entre 5 et 6 mois. La fréquence de survenue des épidémies de dengue est en augmentation ainsi que le nombre de décès avec des formes secondaires plus fréquentes et une co-circulation de plusieurs sérotypes du DENV. L'arrivée et l'établissement successif de deux nouveaux arbovirus, le CHIKV en 2013, et le ZIKV en 2015, a de nouveau mis en lumière l'importance de l'étude des maladies à transmission vectorielle et réveillé la crainte de l'émergence d'un autre arbovirus, le YFV, dans la Caraïbe.

Dans une optique de prévention et d'évaluation de ce risque, le but de ce projet de thèse est d'évaluer le risque d'émergence ou de ré-émergence du YFV dans la Caraïbe, principalement en Martinique en se basant sur un indicateur entomologique, celui de la compétence vectorielle. Nous avons ainsi mesuré la compétence vectorielle de populations d'*Ae. aegypti* ; 9 populations de la Martinique, 2 de la Caraïbe et 2 du continent américain, vis-à-vis de cinq souches du YFV (1 américaine et 4 africaines). Nous avons également examiné quelques populations d'*Ae. albopictus* qui commence à s'établir dans les îles.

Au cours de l'infection du moustique par un arbovirus comme le YFV, le virus est ingéré par le moustique lors d'un repas de sang pris sur une personne en phase virémique et doit se multiplier et passer différentes barrières tissulaires du moustique (tube digestif et glandes salivaires) afin de pouvoir atteindre les glandes salivaires et être libéré dans la salive du moustique. Après le passage de chaque barrière, la population virale est soumise à un goulot d'étranglement réduisant la diversité virale.

Ainsi, pour déterminer l'impact de ces deux barrières sur la propagation du virus, nous avons mesuré le seuil de charges virales à partir duquel, le passage des différentes barrières était possible.

De plus, en déterminant la diversité des populations virales dans les différents compartiments du moustique (tube digestif, carcasse et salive), nous avons pu définir les capacités de chaque

population de moustiques à « trier » certains variants viraux qui seront ultérieurement transmis et ceci pour les différents génotypes de YFV.



Partie II

Mémoire expérimental

Chapitre 7

Matériels et Méthodes

Chapitre 8

Risque potentiel d'émergence du virus de la fièvre jaune dans la Caraïbe

Partie 1 : Détermination de la compétence vectorielle des populations de Martinique pour les 5 souches de YFV

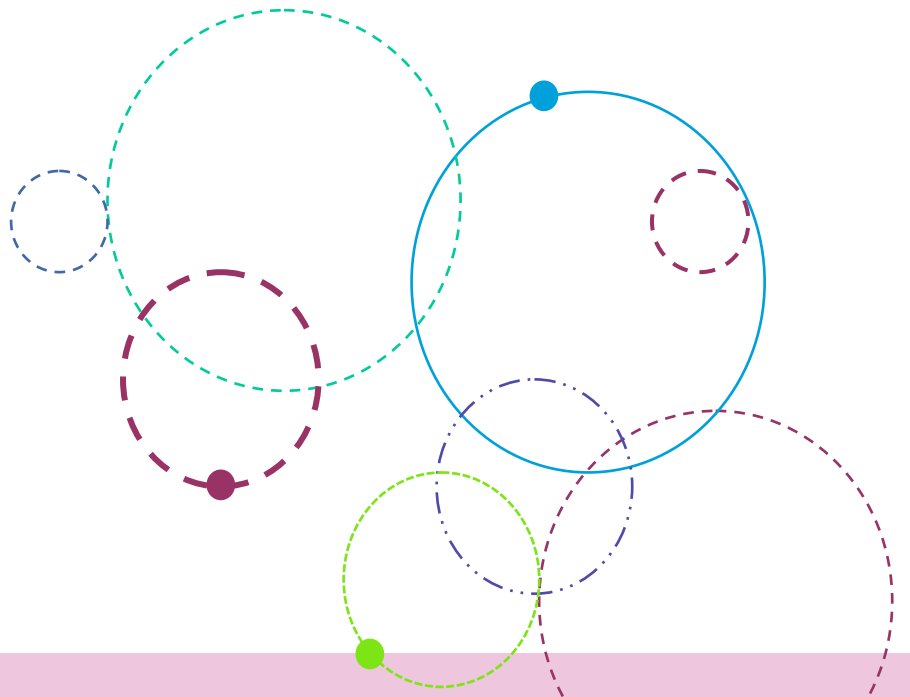
Partie 2 : Détermination de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe et d'Amérique pour les 5 souches de YFV

Partie 3 : Différence de compétence vectorielle entre *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*

Chapitre 9

Impact des barrières anatomiques du moustique sur la diversité virale du YFV

Partie 4 : Analyse des populations virales des moustiques Morne-Rouge (Martinique) infectés avec 5 souches de virus de la fièvre jaune



Chapitre 7

Matériels et Méthodes

Ce chapitre présente le matériel biologique et les techniques utilisées au cours de la thèse.

Chapitre 7 : Matériels et Méthodes

7.1. Matériels

7.1.1. Population de moustiques

Les populations du moustique *Ae. aegypti* provenant de la Martinique ont été prélevées sur le terrain en Mars, Décembre 2019 et Janvier 2020 en collaboration avec les membres du Centre de Démoustication de la Martinique (CEDRE-LAV) (<https://www.martinique.ars.sante.fr/index.php/lutter-contre-les-maladies-transmission-vectorielle-en-martinique>). Les populations proviennent des communes de Tartane (La Trinité), Sainte-Thérèse (Fort-de-France), Lareinty (Le Lamentin), Anse Maroquet (Le Vauclin), Bois lézard (Gros Morne), Cap Chevalier (Sainte-Anne), Macouba, Le Diamant et Morne-Rouge. Ces populations essentiellement composées de larves (stades 1-4) et de quelques nymphes sont élevées localement en insectarium afin d'obtenir environ 2000 œufs. Ces œufs pondus sur papier buvard ont été envoyés à l'Institut Pasteur Paris et constituent la génération F1. Des œufs provenant de Haïti ont été récoltés à l'aide de pondoirs pièges posés dans les villes de Port- au-Prince et de Port-à-Piment en collaboration avec la société VECCOTRA (Dr. André Yébakima). Des œufs provenant du bourg Les Abymes en Guadeloupe (génération F1) et de la Havane à Cuba (génération F2) ont été envoyés par l'Institut Pasteur de Guadeloupe (Dr. Anubis Vega-Rua). La population Nor-Oriental de Colombie a été collectée à l'aide de pondoir pièges par la Fundación INFOVIDA (Rosa Margarita Gélvez Ramírez) et acheminée à l'Institut Pasteur. Un lot de 512 œufs a été récolté à Gainesville en Floride par l'Université de Floride (Dr. Rhoel Dinglasan, Emerging Pathogens Institute) et la génération F1 a été envoyée à l'Institut Pasteur. Les œufs réceptionnés sont immergés dans un litre d'eau déchlorée à 25°C ±1°C. Après 24 h, les larves sont réparties par lots de 200 par cuvette contenant un litre d'eau et une pastille de levure de bière renouvelée tous les 3 jours. Les nymphes sont quotidiennement prélevées à la pipette et placées dans des pots à émergence contenant de l'eau, qui sont mis dans des cages en chambre chaude. Les moustiques adultes sont maintenus dans des conditions contrôlées de température (28°C ±1°C), d'humidité (70% Humidité Relative), de photopériode (cycles jour:nuit de 12 h:12h) et de nourriture (eaub sucrée à 10%). Les générations F1 à F5 sont utilisées pour les infections expérimentales (Tableau 1).

Tableau 1 : Descriptif des populations d'*Aedes aegypti* utilisées.

Population	Localité	Coordonnées GPS (latitude, longitude)	Localisation	Espèce de moustiques	Stades capturés	Climat
Anse Maroquet	Le Vauclin	14.561472 -60.830520	Martinique	<i>Aedes aegypti</i>	larves et nymphe	Tropical
Bois lézard	Gros Morne	14.7062 -61.0085	Martinique	<i>Aedes aegypti</i>	larve et nymphe	Tropical
Cap Chevalier	Sainte-Anne	14.46848 -60.83177	Martinique	<i>Aedes aegypti</i>	larves et nymphe	Tropical
CTU	Port-au- Prince ; Haïti	18.5311964506 -72.36251840387	Haïti	<i>Aedes aegypti</i>	oeufs	Tropical
Diamant	Le Diamant	14.4667 -61.0333	Martinique	<i>Aedes aegypti</i>	larves	Tropical
Gainesville	Gainesville	Site 1: 3rd + 3rd: 29.654221, - 82.328180 Site 2: 8th+4th: 29°39'33.01"N, 82°19'43.26"W Site 3: Barber: 29°39'20.75"N, 82°19'43.71"W	Floride	<i>Aedes aegypti</i>	oeufs	Sub- tropical
La Havane	La Havane	23.094494 82.365780	Cuba	<i>Aedes aegypti</i>	œufs	Tropical
Lareinty	Le Lamentin	14.595308 -60.990728	Martinique	<i>Aedes aegypti</i>	larves	Tropical
Les Abymes	Les Abymes	658148.06 1799373.99	Guadeloupe	<i>Aedes aegypti</i>	œufs	Tropical
Macouba	Macouba	14.8667 -61.1398	Martinique	<i>Aedes aegypti</i>	larves	Tropical
Morne-Rouge	Le Morne- Rouge	14.7667 -61.1333	Martinique	<i>Aedes aegypti</i>	larves	Tropical
Nor-Oriental	Santa Cruz	836648.16 -1188945.97	Colombie	<i>Aedes aegypti</i>	oeufs	Sub - tropical

Papin	Port-à-Piment	18.25473835366 -74.09941549354	Haïti	<i>Aedes albopictus</i>	œufs	Tropical
Papin	Port-à-Piment	18.25473835366 -74.09941549354	Haïti	<i>Aedes aegypti</i>	œufs	Tropical
Sainte-Thérèse	Fort-de-France	14,602973 -61,059533	Martinique	<i>Aedes aegypti</i>	larves	Tropical
Tartane	La Trinité	14.759160 -60.916930	Martinique	<i>Aedes aegypti</i>	larves et nymphes	Tropical

7.1.2. Génotypes de virus

Les différentes souches de fièvre jaune (YFV) provenant de Bolivie, Ghana, Nigéria, Soudan et Ouganda ont été obtenues *via* le consortium EVAg (<https://www.european-virus-archive.com/>) (Tableau 2).

Tableau 2 : Description des souches virales utilisées.

Génotype	Lieu de récolte	Année d'isolement	Organisme	Production sur cellules	Référence EVAg	Référence GenBank
Américain II	Bolivie	1999	Homme	HEK-293 > passage P3	UVE/YFV/1999/ BO/BOL88_1999 Référence échantillon 15963	MF004382
Ouest Africain I	Nigeria	1970	Homme	1 passage sur C6/36, 2 passages sur HEK-293	UVE/YFV/1970/ NG/A-Adeoye TVP 3223 Référence échantillon 30966	-
Ouest Africain II	Ghana	1927	Homme	BHK-21 Passage P5	UVE/YFV/1927/ GN/Asibi Référence échantillon 37014	MF405338

Est Africain	Ouganda	1948	Moustique	1 passage sur C6/36, 2 passages sur HEK-293	UVE/YFV/1948/ UG/MR896 TVP 3236 Référence échantillon 30706	-
Est/Centre Africain	Soudan	1940	Homme	1 passage sur C6/36, 2 passages sur HEK-293	UVE/YFV/1940/ SD/M90-5 TVP3230 Référence échantillon 31031	MF004383

7.2. Méthodes

7.2.1. Production des stocks viraux

Les lyophilisats des cinq souches virales reçus de EVAg sont réhydratés par ajout de 200 µL d'eau. Les suspensions virales sont amplifiées après 1 à 3 passages sur cultures cellulaires d'*Aedes albopictus*, clone C6/36 (ATCC ®, VA, USA) (Igarashi, 1978) maintenues à 28°C. Les surnageants sont collectés 8 à 10 jours après l'infection selon la souche de YFV, centrifugés à 3 000 rpm, puis ajustés à 10% final de sérum foetal de bovin (SVF) (Life Technologies, CA, USA) et ~10% de bicarbonate de sodium (Gibco ThermoFisher Scientific, MA, USA). Les stocks viraux sont répartis en aliquots puis stockés à -80 °C jusqu'à leur utilisation pour les infections de moustiques. Les titres viraux sont exprimés en FFU/mL (focus-forming units/mL).

7.2.2. Infections orales des moustiques

Cette technique d'infection orale des moustiques vise à mimer la prise d'un repas de sang par le moustique sur une personne en phase virémique en proposant aux femelles une préparation contenant du sang et du virus à un titre donné. La veille du repas sanguin, les femelles de moustiques âgées de 10 à 15 jours sont anesthésiées par le froid, triées et placées dans des boîtes de gorgement à fond amovible (65 femelles par boîte) (Figure 29A). Les boîtes contenant les femelles de moustiques sont ensuite transportées dans l'insectarium du

laboratoire de confinement P3/I3 et placées à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et 80% d'humidité. Parallèlement, le sang de lapin est prélevé à l'oreille et lavé dans du tampon PBS (Phosphate Buffered-Saline) 1X afin d'éliminer la fraction sérique du sang et de conserver uniquement les érythrocytes. Après trois lavages au PBS 1X, les globules rouges sont re-suspendus dans un volume de PBS 1X reconstituant le volume de sang prélevé. Pour augmenter le taux de gorgement des moustiques, les femelles sont mises à jeun 24 h avant la prise du repas de sang. Pour chaque combinaison population de moustiques - souche virale, 4 à 6 boîtes de 65 femelles sont exposées à un repas infectieux proposé dans une capsule. Chaque capsule contient un mélange de 1,4 mL d'érythrocytes de lapin et 700 μL de suspension virale, auquel est ajouté un phagostimulant, l'adénosine triphosphate (ATP) à une concentration finale de 10 mM. Le titre du repas de sang est de 10^5 ou 10^7 FFU/mL. La base de chaque capsule est recouverte d'un morceau d'intestin de porc (Figure 29B) et chaque capsule est fixée à un bloc chauffant maintenu à 37°C (système Hemotek®, Blackburn, UK) (Figure 29C). Le fond amovible des boites de gorgement contenant les moustiques est relevé afin de concentrer les moustiques dans la partie supérieure des boites. Les boites sont placées sous les gorgeurs afin de permettre l'alimentation des moustiques au travers de l'intestin de porc (Figure 29D). Dans le but de préserver l'infectiosité des particules virales, le repas sanguin n'excède pas une heure (à 37°C). A la fin du repas sanguin, les femelles sont anesthésiées par le froid. Seules les femelles gorgées sont conservées et transférées dans des boites en carton à raison de 30 femelles maximum par boîte (Figure 29E). Ces boites sont maintenues à $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 80% d'humidité et les moustiques alimentés avec un coton imbibé d'eau sucrée à 10% pendant la durée d'incubation définie par le schéma expérimental de l'expérience.

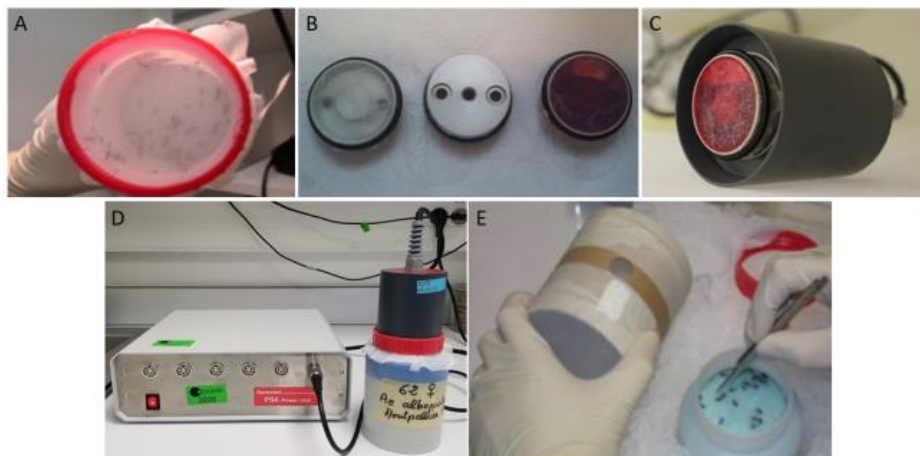


Figure 29 : Différentes étapes de l'infection expérimentale des moustiques en P3/I3. (A) Tri de 65 femelles par boîte de gorgement. (B) Capsule couverte à la base avec un morceau d'intestin de porc et recevant le mélange infectieux. (C) Capsule fixée au bloc chauffant à 37°C. (D) Boîte de gorgement placée sous la capsule et le bloc chauffant. (E) Tri sur glace des femelles gorgées.

7.2.3. Analyse de la compétence vectorielle

Des lots de moustiques sont analysés à 14 et 21 jours post-infection (jpi). Après une anesthésie par le froid, les moustiques sont soumis à une salivation forcée, une méthode décrite par Dubrulle et al. (2009). Les pattes et les ailes de chaque moustique sont retirées, ce qui induit un stress du moustique qui par réflexe, émet de la salive. Le proboscis a été inséré dans un cône de 20 µL contenant 5 µL de SVF. Après 30 min, le contenu du cône est transféré dans un tube contenant 45 µL de milieu Leibovitz's L-15 (Gibco ThermoFisher Scientific, MA, USA) et conservé à -80°C jusqu'à analyse. Les moustiques sont ensuite disséqués afin d'isoler l'intestin de la carcasse. Les intestins et les carcasses sont homogénéisés individuellement dans 300 µL de milieu Leibovitz L-15 complété par 3 % de SVF et centrifugés à 10 000 rpm pendant 5 min. La présence et le nombre de particules virales dans chaque échantillon sont estimés par titrage. La compétence vectorielle (CV) est déterminée en mesurant trois paramètres : (i) le taux d'infection (IR) qui est la proportion de moustiques présentant un tube digestif infecté parmi les moustiques analysés ; les moustiques sont capables de répliquer le virus dans les cellules épithéliales de l'intestin, (ii) le taux de dissémination (DR) qui est la proportion de moustiques présentant une carcasse infectée parmi les moustiques ayant un tube digestif infecté ; les moustiques ayant un tube digestif infecté sont capables de disséminer le virus au-delà de l'intestin et d'infecter des organes ou tissus secondaires, et (iii) le taux de transmission (TR) qui est la proportion de moustiques ayant une salive infectée parmi les moustiques ayant une carcasse infectée ; les moustiques disséminer le virus sont susceptibles d'avoir les glandes salivaires infectées et d'excréter le virus avec la salive. Chacun de ces trois paramètres mesure l'efficacité des barrières anatomiques, tube digestif et glandes salivaires, dans la progression du virus dans le moustique. Ils doivent être considérés ensemble. Néanmoins, deux autres paramètres peuvent être pris indépendamment et mesurent l'efficacité de dissémination (DE) et l'efficacité de transmission (TE). DE correspond à la proportion de moustiques présentant une carcasse infectée sur l'ensemble des moustiques analysés et TE, la proportion de moustiques ayant une

salive infectée sur l'ensemble des moustiques analysés. TE est égal au produit de DE par TR. TE reflète la compatibilité de la combinaison virus-moustique estimant la proportion de femelles capables de transmettre le virus et estime, de ce fait, le risque épidémique associé à la transmission du virus par les moustiques testés. La mesure de la charge virale des salives permet d'évaluer le potentiel de transmission de chaque femelle en fonction du virus considéré. En effet, le nombre de particules virales excrétées par la femelle est déterminant pour la transmission ; on estime que plus la charge virale est forte, plus les chances de transmission à l'hôte vertébré sont élevées.

7.2.4. Détection des particules virales

Des plaques de 96 puits sont ensemencées de cellules C6/36 dans du milieu Leibovitz L-15 supplémenté de 10 % de SVF, à raison de $1,5 \times 10^6$ cellules par puits puis incubées 48h à 28°C. Les échantillons sont dilués dans du milieu Leibovitz L-15 supplémenté de 2 % de SVF. 50 µL de cette dilution sont inoculés sur les monocouches de cellules C6/36 et incubés pendant 1h à 28°C. Après incubation, l'inoculum est retiré et 150 µL d'un mélange (1:3) de carboxymethylcellulose (CMC) à 4% et de milieu Leibovitz L-15 additionnée de 8 % de SVF sont déposés sur les tapis cellulaires, le tout incubant pendant 5 jours à 28°C. Pour les échantillons de moustiques naturellement contaminés par des champignons et des bactéries, un mélange antifongique-antibactérien (Life technologies®) est ajouté pour une concentration finale de 1,5X. Après incubation, les cellules sont fixées avec une solution de formaldéhyde (3,4%) (Sigma Aldrich, MO, USA) pendant 20 min à température ambiante. Les tapis cellulaires sont ensuite rincés trois fois avec du PBS 1X puis incubés durant 15 min dans une solution de Triton™ 100X (Sigma Aldrich®) à 0,5 %. Après 3 lavages avec du PBS 1X, les tapis cellulaires sont marqués avec une solution d'anti-YFV (0G5) NB100-64510 (Life technologies®) diluée au 400^{ème} dans du PBS 1X contenant 1% d'albumine de sérum bovin (BSA) (Uptima, interchim, Montluçon, France) pendant 1 h à 37°C sous agitation. Après incubation, le tapis cellulaire est rincé 3 fois avec du PBS 1X puis un anticorps secondaire dilué au 1/500^{ème}, Alexa fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, MA, USA) est déposé sur les cellules. Après une incubation de 30 min à 37°C, les cellules sont rincées 3 fois avec du PBS 1X. Les titres des échantillons sont déterminés par visualisation des foyers viraux au microscope à fluorescence et les titres sont exprimés en ffu (focus forming unit)/ml.

7.2.5. Extractions des ARN viraux et séquençage

Les ARN viraux sont extraits des intestins, des carcasses et des salives des moustiques infectés par les différentes souches virales à 21 jpi (jours post-infection). Pour chaque combinaison virus-moustique, deux moustiques sont traités individuellement selon les différents statuts présentés dans le tableau 3.

Pour les intestins et les carcasses, les échantillons sont broyés pendant 30 sec avec un homogénéisateur (Precellys 24, Bertin Instruments, France) dans des tubes contenant des billes de verre en silice. L'ARN viral est extrait en utilisant le kit Nucleospin® RNA II (Macherey-Nagel, Hoerd, France) selon les instructions du fabricant et quantifié au nanodrop. L'ARN est élué dans 40 µL d'eau RNAase-free et conservé à -80°C. L'intégrité de l'ARN est évaluée sur le bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies, CA, USA). Les génomes viraux sont amplifiés en utilisant la transcriptase reverse Platinum® Taq High Fidelity polymerase enzyme (Thermo Fisher Scientific) et des amorces couvrant le génome viral (Annexe 1). Les produits PCR sont mélangés en proportions équimolaires. Les amplicons sont quantifiés en utilisant le kit Qubit® dsDNA HS et un fluoromètre Qubit 4.0 (ThermoFisher Scientific, MA, USA) puis sont coupés par sonication en fragments de 200 pb. Les banques sont construites en ajoutant des barcodes pour identifier les échantillons, et des amorces en utilisant le AB Library Builder System (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Pour mélanger de façon équimolaire les échantillons barcodés, une étape de quantification par real-time PCR est réalisée en utilisant le kit Ion Library TaqMan™ Quantitation (ThermoFisher Scientific, MA, USA). Le séquençage est effectué à l'aide de la technologie S5 Ion torrent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) en suivant les instructions du fabricant.

Pour les échantillons de salives, une phase d'amplification de l'ARN viral est d'abord réalisée avec la méthode MALBAC (Multiple annealing and looping-based amplification cycles). Cette méthode utilise un mode d'amplification linéaire qui permet de détecter de faible quantité d'ARN viral mais limite le biais de l'amplification. L'ARN viral est extrait en utilisant le kit Nucleospin® RNA II. Une reverse transcription (SuperScript IV Reverse Transcriptase) (Invitrogen) utilisant des amorces aléatoires couplées à une séquence connue de 27 nucléotides est réalisée. La phase de pré-amplification est faite avec le kit MALBAC Single Cell WGA (Yikon Genomics; Proteigene, St-Marcel, France) en deux phases : une amplification quasi-linéaire puis une amplification par PCR exponentielle classique. Les

banques sont préparées à l'aide du kit NEBNext® Ultra™ II DNA Library Prep (New England Biolabs, Evry, France). Les extraits sont coupés en fragments par sonication (Covaris M220 Focused-Ultrasonicator) (Covaris Ltd, Brighton, UK). Le contrôle de qualité a été effectué avec High Sensitivity Kit ADN (Agilent Technologies, CA, USA) sur le bioanalyseur Agilent 2100. Le séquençage est effectué sur un séquenceur Illumina de type NextSeq 2000 pour obtenir des reads pairés de 150 pb. .

Tableau 3 : Description du statut des moustiques infectés et séquencés, 21 jours après infection virale.

Population	Infection	Dissémination	Transmission
AA Morne Rouge	+	+	+
	+	+	-
	+	-	-

7.2.6. Analyse des séquences virales

L'analyse porte sur l'ensemble du génome viral à l'exclusion des 18 premiers nucléotides de la région 5'-UTR et des 88 nucléotides en amont de la queue polyA. Les variants à haute fréquence (jusqu'à 0,1) et les variants à basse fréquence (inférieur à 0,005) des populations virales sont caractérisés à l'aide du pipeline ViVan (Isakov et al., 2015) par P Lechat (Hub). Ce logiciel va comparer les séquences des populations virales de plusieurs échantillons avec la séquence Sanger du de référence (Table 2).

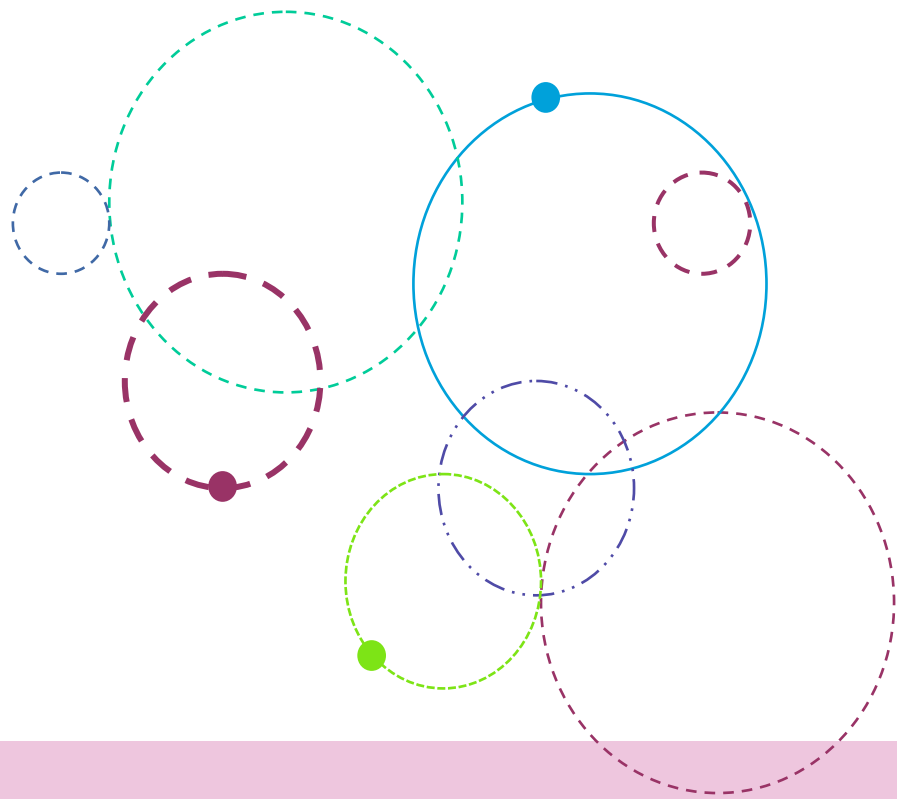
Pour chaque échantillon, nous obtenons les mutations ou “single nucleotide variants” (SNV) avec la position, la couverture et l'annotation des résidus (nucléotide de référence, changement de nucléotide et acide aminé alternatif, le cas échéant).

La phylogénie des séquences virales de référence et celle des séquences consensus de chaque population virale sont réalisées dans Seaview 4 (Gouy et al. 2010). Après alignement par Muscle, le logiciel PhyML permet d'obtenir un arbre phylogénétique de maximum de vraisemblance.

7.2.7. Statistiques descriptives et comparaisons

Tous les tests statistiques sont réalisés à l'aide du logiciel STATA (StataCorp LP, Texas, USA). Les valeurs $P > 0,05$ sont considérées comme non significatives. Les comparaisons de proportions déterminent le taux d'infection, le taux de dissémination et le taux de transmission et sont réalisées avec le test exact de Fisher. Les comparaisons de moyennes des quantités de particules virales sont déterminés avec le test de Kruskal-Wallis.

Résultats



Chapitre 8

Risque potentiel d'émergence du virus de la fièvre jaune dans la Caraïbe

Dans ce chapitre, nous analysons la compétence vectorielle de 14 populations d'*Ae. aegypti* et une population d'*Ae. albopictus* pour cinq souches de YFV.

Ce chapitre comprend 3 parties :

- Partie 1 : Détermination de la compétence vectorielle des populations de Martinique pour les 5 souches de YFV
- Partie 2 : Détermination de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe et d'Amérique pour les 5 souches de YFV
- Partie 3 : Différence de compétence vectorielle entre *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*

Chapitre 8 : Risque potentiel d'émergence du virus de la fièvre jaune dans la Caraïbe

Contexte

Depuis 2016, les épidémies de fièvre jaune rapportées en Amérique du Sud et en Afrique se succèdent. Entre 2016 et 2018, l'Amérique du Sud a connu deux grandes épidémies de fièvre jaune. L'Afrique a subi une grosse épidémie en 2016 et depuis, de nombreuses épidémies se succèdent. Au cours de cette épidémie de 2016 en Angola, des cas de fièvre jaune ont été importés en Chine. Les voyageurs ont développé la maladie une fois arrivés sur le territoire chinois, mais aucun cas autochtone n'a été détecté. Au cours des deux épidémies qui se sont déroulées en Amérique du Sud, de nombreux cas importés ont été recensés en Europe, indiquant un déplacement des cas de fièvre jaune des zones endémiques pour le virus vers les zones non endémiques. A la Caraïbe, il n'y a plus d'épidémies de fièvre jaune depuis presque un siècle. Toutefois, les arrivées successives du CHIKV en 2013 et du ZIKV en 2015, font craindre l'arrivée de YFV dans les îles. En effet, plusieurs éléments indiquent que la Caraïbe est une région propice au développement du YFV, comme ce fut le cas par le passé et comme ce fut le cas pour le CHIKV et le ZIKV. De plus, la Caraïbe possède plusieurs caractéristiques essentielles pour une propagation rapide des arbovirus : i) la région caribéenne est située dans les régions tropicales du globe offrant ainsi des conditions environnementales et climatiques adéquates pour favoriser le développement du virus et du vecteur, ii) la présence du vecteur principal du YFV *Ae. aegypti* à très forte densité dans toutes les îles, iii) l'arrivée d'*Ae. albopictus* qui est compétent pour la transmission du virus et qui tend à envahir les îles depuis 1983, iv) la présence du virus dans un cycle selvatique sur l'île de Trinidad, et v) la population immunologiquement naïve pour le YFV dans une région où la vaccination n'est pas recommandée, à l'exception de l'île de Trinidad. Ainsi il est primordial d'évaluer le **risque de réémergence de la fièvre jaune dans les îles de la Caraïbe.**

L'objectif de la première partie de cette thèse est d'évaluer la capacité des populations de moustiques de la Caraïbe pour la transmission du YFV. Pour cela, nous avons évalué la compétence vectorielle, un paramètre clé pour mesurer les risques d'émergence. La compétence vectorielle étant un paramètre complexe qui diffère en fonction du couple moustique-virus utilisé, les populations de moustiques appartenant à une même espèce

peuvent ainsi posséder des compétences vectorielles différentes pour un même agent pathogène donné.

Afin d'évaluer le risque de réémergence de la fièvre jaune dans la Caraïbe, 14 populations provenant de la Martinique, de la Guadeloupe, de Haïti, de Cuba, de Floride et de Colombie ont été évaluées pour cinq souches de YFV (Ouganda, Bolivie, Ghana, Soudan et Nigéria). Le protocole utilisé est décrit dans les paragraphes 8.2 et 8.3 de ce manuscrit.

Ce chapitre comprend 4 parties correspondant à l'évaluation de la compétence vectorielle pour : i) les populations de la Martinique, ii) les populations de la Caraïbe, iii) les populations d'Amérique, iv) pour les espèces *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*.

Partie 1 : Détermination de la compétence vectorielle des populations de Martinique pour les 5 souches de YFV

Détermination des paramètres d'analyse de la compétence vectorielle

La population d'*Ae. aegypti* de Trinité - Tartane a été infectée avec une souche du YFV provenant de la Bolivie (Référence Genbank : MF004382) afin de définir deux paramètres qui influent sur la compétence vectorielle (CV) : (i) le titre viral du repas de sang qui sera fourni aux moustiques et (ii) le jour post infection (jpi) où les paramètres de la compétence vectorielle (CV) seront mesurés. Les repas infectieux ont été réalisés avec deux doses de virus (10^5 et 10^7 ffu/mL) et les paramètres décrivant la CV (IR, DR, TR et le nombre de particules virales dans le tube digestif, la carcasse et la salive) ont été mesurés à quatre jpi (7, 14, 21 ou 28) (Figure 30).

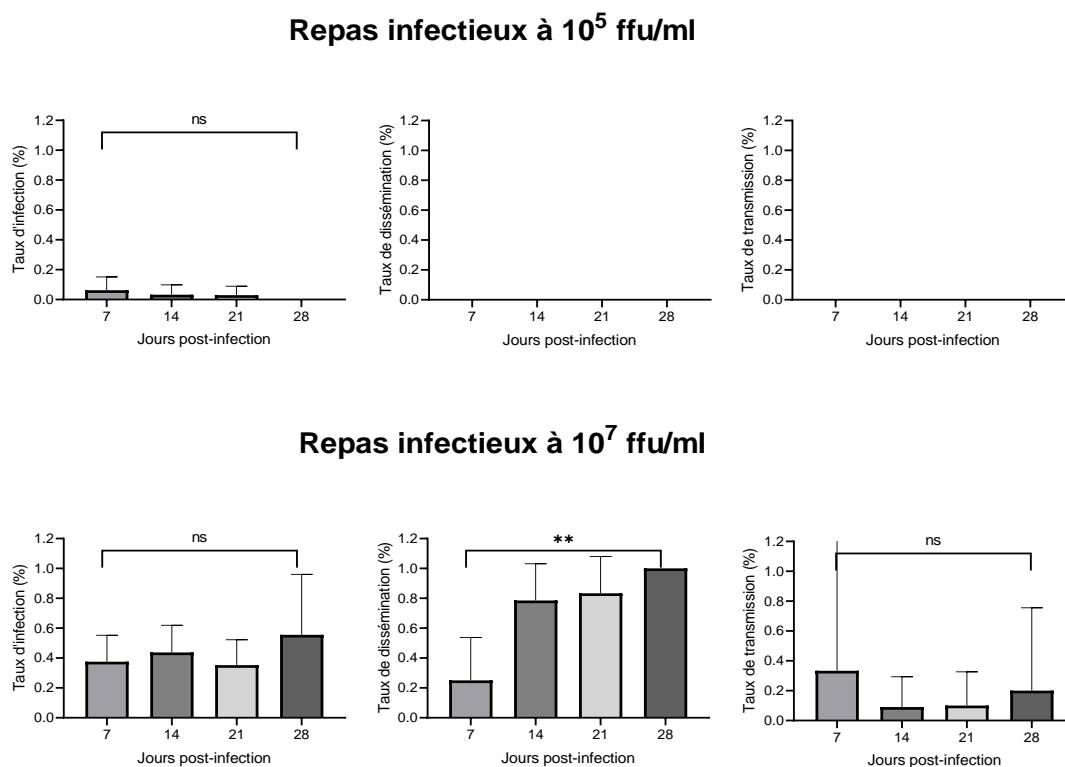


Figure 30 : Taux d'infection, dissémination et transmission d'*Ae. aegypti* Tartane (Martinique), examinés 7, 14, 21 et 28 jours après un repas infectieux contenant YFV Bolivie, fourni à deux titres, 10^5 et 10^7 ffu/mL. Test exact de Fisher : ns non significatif, ** $0,001 \leq p < 0,01$.

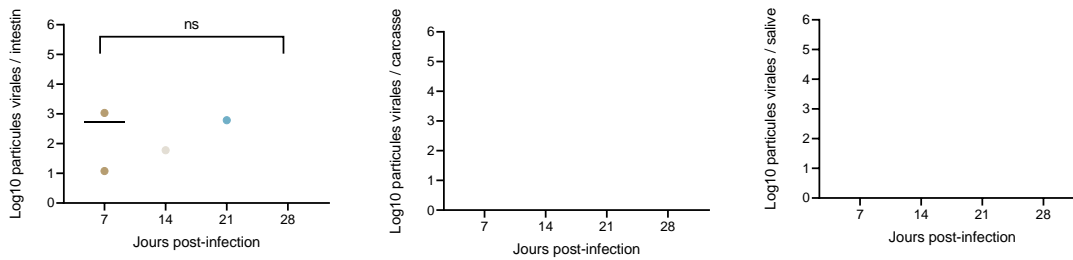
Les résultats montrent que pour un repas de sang contenant 10^5 ffu/mL, seuls 4 moustiques sur 125 moustiques analysés (3,2%) avaient un tube digestif infecté avec IR égal à: 6,25% (2/32) à 7 jpi, 3,12% (1/32) à 14 jpi, 2,94% (1/34) à 21 jpi et 0% (0/27) à 28 jpi ; les IR ne sont pas significativement différents entre eux (Test exact de Fisher : $p>0,05$).

En augmentant le titre du repas de sang à 10^7 ffu/mL, 43 moustiques sur 107 (40,18%) possédaient un tube digestif infecté avec IR égal à : 37,5% (12/32) à 7 jpi, 43,75% (14/32) à 14 jpi, 35,29% (12/34) à 21 jpi, 55,55% (5/9) à 28 jpi. Le IR à 28 jpi est le plus élevé mais aucune différence significative n'est observée entre les IR aux 4 jpi (Test exact de Fisher : $p>0,05$).

Après franchissement du tube digestif, le virus parvient dans la cavité générale où il se réplique dans les organes et tissus internes. L'examen de la carcasse permet de mesurer la dissémination virale. Au titre de repas de sang à 10^5 ffu/mL, aucune dissémination (DR=0) n'a été observé quel que soit le jpi. En revanche à 10^7 ffu/mL, 29 moustiques sur 43 (67,44%) étaient capables d'assurer la dissémination du virus avec DR égal à : 25% (3/12) à 7 jpi, 78,57% (11/14) à 14 jpi, 83,33% (10/12) à 21 jpi, 100% (5/5) à 28 jpi, avec une différence significative entre les DR aux 4 jpi (Test exact de Fisher : $p<0,01$).

Après répllication dans la cavité générale, le virus parvient aux glandes salivaires et est excrété dans la salive émise par le moustique. L'examen de la salive permet de mesurer la transmission virale. Au titre de repas de sang à 10^5 ffu/mL, aucune transmission (TR=0) n'a été observé quel que soit le jpi. Par contre, à 10^7 ffu/mL, 4 moustiques sur 29 (13,79%) étaient capables d'assurer la transmission du virus avec TR égal à : 33,33% (1/3) à 7 jpi, 9,09% (1/11) à 14 jpi, 10% (1/10) à 21 jpi, 20% (1/5) à 28 jpi. On détecte une différence significative entre les TR aux 4 jpi (Test exact de Fisher : $p<0,01$).

Repas infectieux à 10^5 ffu/ml



Repas infectieux à 10^7 ffu/ml

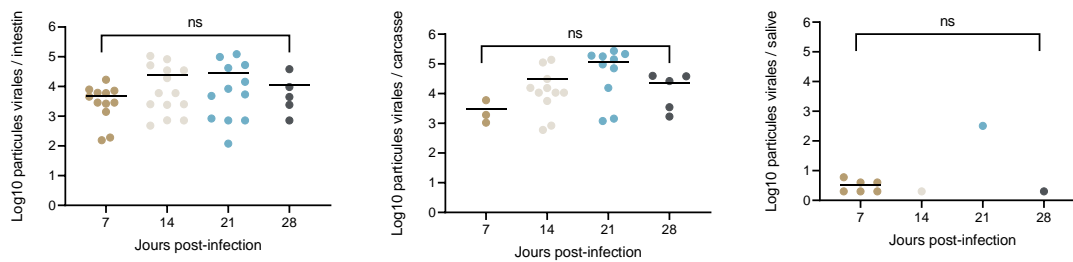


Figure 31 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen, la carcasse et la salive des moustiques *Aedes aegypti* Tartane (Martinique), examinés 7, 14, 21 et 28 jours après un repas infectieux contenant YFV Bolivie, fourni à deux titres, 10^5 et 10^7 ffu/mL. Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif.

En parallèle à l'estimation des proportions de moustiques ayant franchi les différentes étapes de réplication dans le moustique (IR, DR, et TR), le nombre de particules virales dans le tube digestif, la carcasse et la salive a été mesuré (Figure 31)

Au repas de sang à 10^5 ffu/mL, le nombre de particules virales détectées dans le tube digestif est en moyenne de 546 (N=2 moustiques analysés) à 7 jpi, 60 (N=1) à 14 jpi, 612 (N=1) à 21 jpi. Au titre de 10^7 ffu/mL, le nombre de particules virales dans le tube digestif est en nette augmentation, en moyenne de 4895 (N=12 moustiques analysés) à 7 jpi, 25097 (N=14) à 14 jpi, 29250 (N=12) à 21 jpi et 11112 (N=5) à 28 jpi. Aucune différence significative n'est détectée entre les jpi (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$).

Les particules virales dans la carcasse et la salive ne sont détectées qu'avec un repas de sang à 10^7 ffu/mL. A 10^7 ffu/mL, la moyenne de particules virales dans la carcasse est de : 2992 (N=3) à 7 jpi, 31832 (N=11) à 14 jpi, 118344 (N=10) à 21 jpi et 21912 (N=5) à 28 jpi, sans

différence significative détectée entre jpi (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). A 10^7 ffu/mL, la moyenne de particules virales dans la salive est de : 3 (N=6) à 7 jpi, 2 (N=1) à 14 jpi, 320 (N=1) à 21 jpi et 2 (N=1) à 28 jpi ; aucune différence significative n'est détectée entre jpi (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$).

L'ensemble de ces données indiquent que : (i) Seul le titre du repas de sang de 10^7 ffu/mL permet d'observer une transmission du virus (ii) La transmission peut être observée à 14, 21 et 28 jpi mais la mortalité pouvant être très élevée à 28 jpi (50% - Tableau 4), les jours 14 et 21 seront choisis pour l'analyse de la CV des différentes populations de moustiques.

Tableau 4 : Suivi de la mortalité d'*Ae. aegypti* Tartane (Martinique) à 14, 21 et 28 jour après un repas infectieux contenant YFV Bolivie fourni à 10^7 ffu/mL.

	Nombres de moustiques gorgés	Mortalité à 14 jpi	Mortalité à 21 jpi	Mortalité à 28 jpi
Nombre de morts	215	21	77	108
Pourcentage de mortalité (%)	-	9,76	35,81	50,23

Les populations d'*Ae. aegypti* de la Martinique

Neuf populations d'*Ae. aegypti* de Martinique ont été infectées avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL. Les moustiques ont été examinés à 14 et 21 jpi.

8.1. Taux d'infection

A 14 jpi, les 9 populations de Martinique présentent des IR qui varient en fonction du génotype de YFV utilisé (Figure 32). Avec YFV Bolivie, IR varie de 53,12% (17/32) pour Morne-Rouge à 93,75% (30/32) pour Macouba. Avec YFV Ghana, IR varie de 3,03% (1/33) pour Bois lézard à 43,75% (14/32) pour Sainte Thérèse. Avec YFV Nigeria, IR varie de 12,5% (4/32) pour Bois lézard à 93,75% (30/32) pour Macouba. Avec YFV Soudan, IR varie

de 31,25% (10/32) pour Sainte Thérèse à 95,83% (23/24) pour Tartane. Avec YFV Ouganda, IR varie de 50% (16/32) pour Morne-Rouge à 100% (32/32) pour Macouba. Une différence significative de IR est détectée entre les 9 populations infectées par chacun des 5 YFV (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$).

A 14 jpi, YFV Bolivie et Ouganda infectent mieux les 9 populations que YFV Ghana, YFV Nigeria et YFV Soudan présentant des taux intermédiaires.

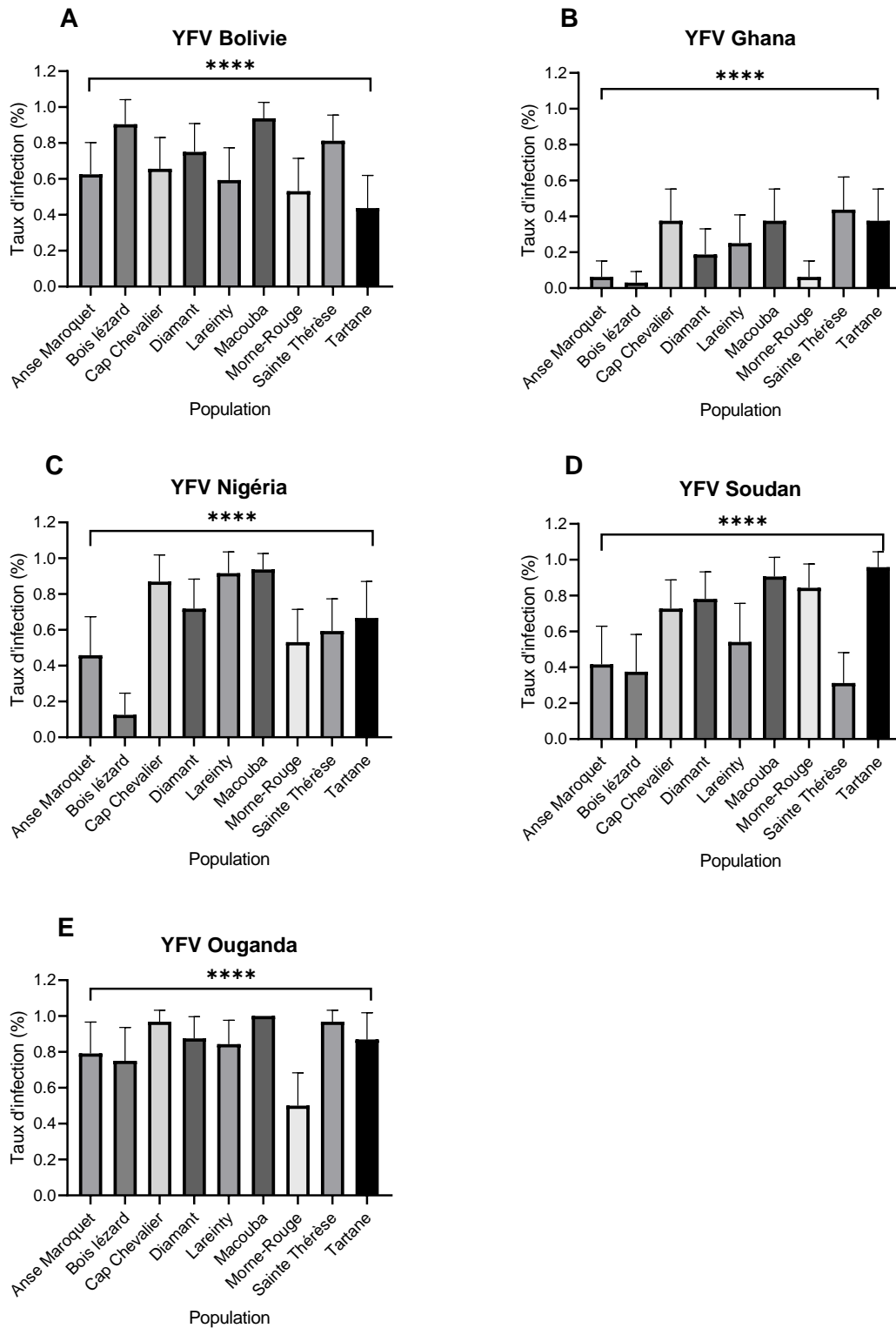


Figure 32 : Taux d'infection de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigéria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ****p<0,0001.

A 21 jpi, les 9 populations de Martinique présentent des IR qui varient en fonction du YFV utilisé, YFV Ghana infectant moins les moustiques que les 4 autres YFV (Figure 33). Avec YFV Bolivie, IR varie de 35,29% (12/34) pour Tartane à 90% (36/40) pour Sainte Thérèse, avec une différence significative de IR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$). Avec YFV Ghana, IR varie de 3,12% (1/32) pour Bois lézard à 51,85% (14/27) pour Sainte Thérèse, avec une différence significative de IR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,01$). Avec YFV Nigeria, IR varie de 31,25% (10/32) pour Morne-Rouge à 84,84 (28/33) pour Macouba, avec une différence significative de IR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$). Avec YFV Soudan, IR varie de 29,16% pour Anse Maroquet (7/24) et Bois lézard (7/24) à 97,14 (34/35) pour Macouba, avec une différence significative de IR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$). Avec YFV Ouganda, IR varie de 66,66 (16/24) pour Bois lézard à 100% (33/33) pour Macouba, avec une différence significative de IR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,01$).

Les IR sont plus élevés à 21 jpi, YFV Ghana demeurant le virus qui infecte le moins les moustiques de Martinique.

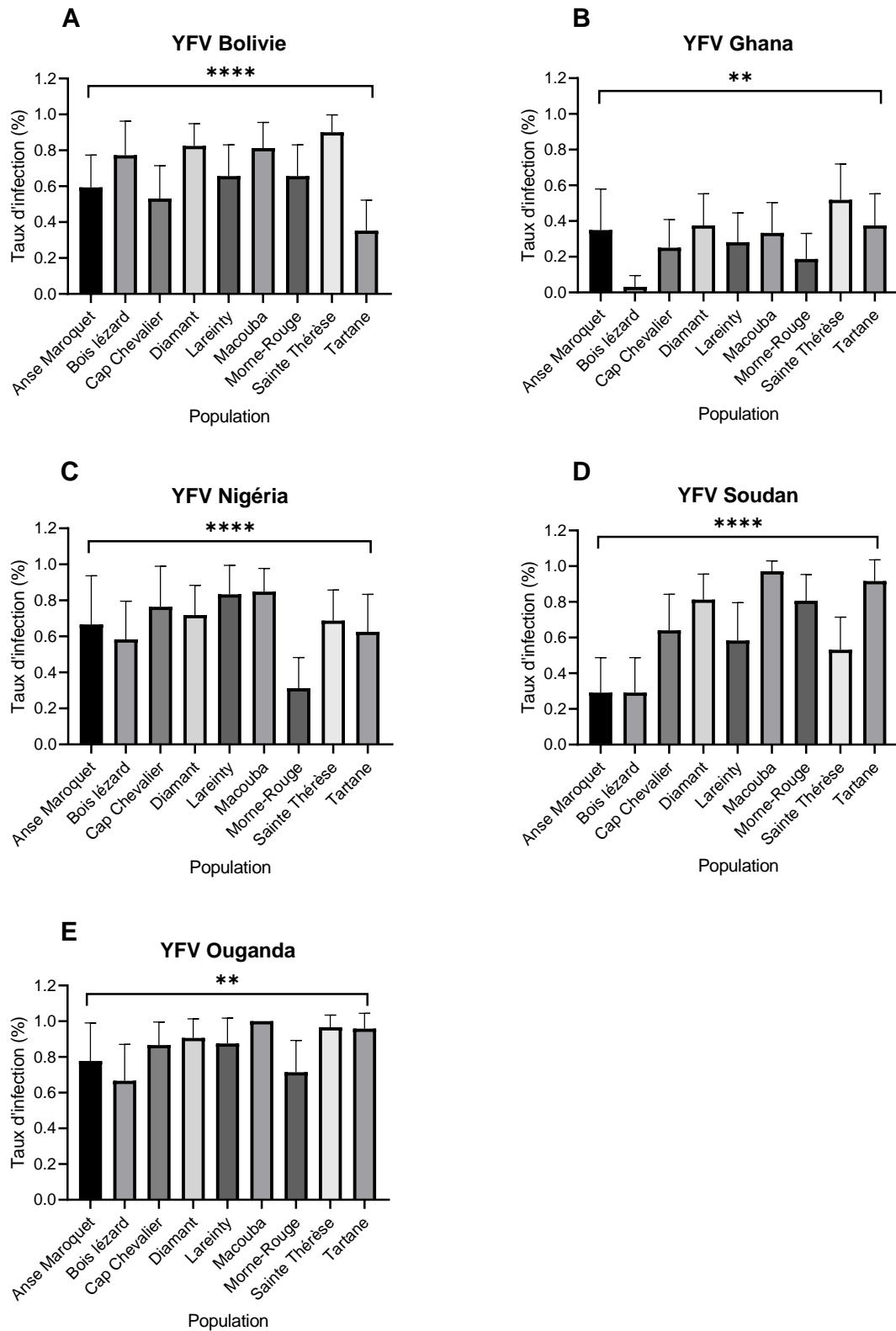


Figure 33 : Taux d'infection de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ** $0,001 \leq p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Globalement, les résultats de IR indiquent que : (i) les 9 populations de la Martinique s'infectent avec les 5 YFV, (ii) elles s'infectent aussi bien à 14 jpi qu'à 21 jpi, (iii) elles s'infectent moins avec YFV Ghana (IR<50%) et très bien avec YFV Ouganda (IR>50% à 14 jpi et IR>66% à 21 jpi) et (iv) la population de Macouba s'infecte le mieux parmi les 9 populations testées (IR maximum avec : YFV Bolivie à 14 jpi, YFV Nigeria à 14 et 21 jpi, YFV Soudan à 21 jpi et YFV Ouganda à 14 et 21 jpi).

8.2. Taux de dissémination

A 14 jpi, les DR varient en fonction du YFV utilisé (Figure 34). Avec YFV Bolivie, DR varie de 19,23% (5/26) pour Sainte Thérèse à 90% (18/20) pour Anse Maroquet, avec une différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p<0.0001$). Avec YFV Ghana, DR varie de 0% (0/2) pour Anse Maroquet à 100% (1/1) pour Bois lézard, sans différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p>0,05$). Avec YFV Nigeria, DR varie de 0% (0/4) pour Bois lézard à 90% (18/20) pour Cap Chevalier, avec une différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p<0.0001$). Avec YFV Soudan, DR varie de 0% (0/10) pour Sainte Thérèse à 75,86 (22/29) pour Macouba, avec une différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p<0,01$). Avec YFV Ouganda, DR varie de 32,25% (10/31) pour Sainte Thérèse à 100% (31/31) pour Cap Chevalier, avec une différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p<0,0001$).

A 14 jpi, YFV Bolivie et Ouganda se disséminent mieux dans les populations de moustiques de Martinique que les 3 autres YFV.

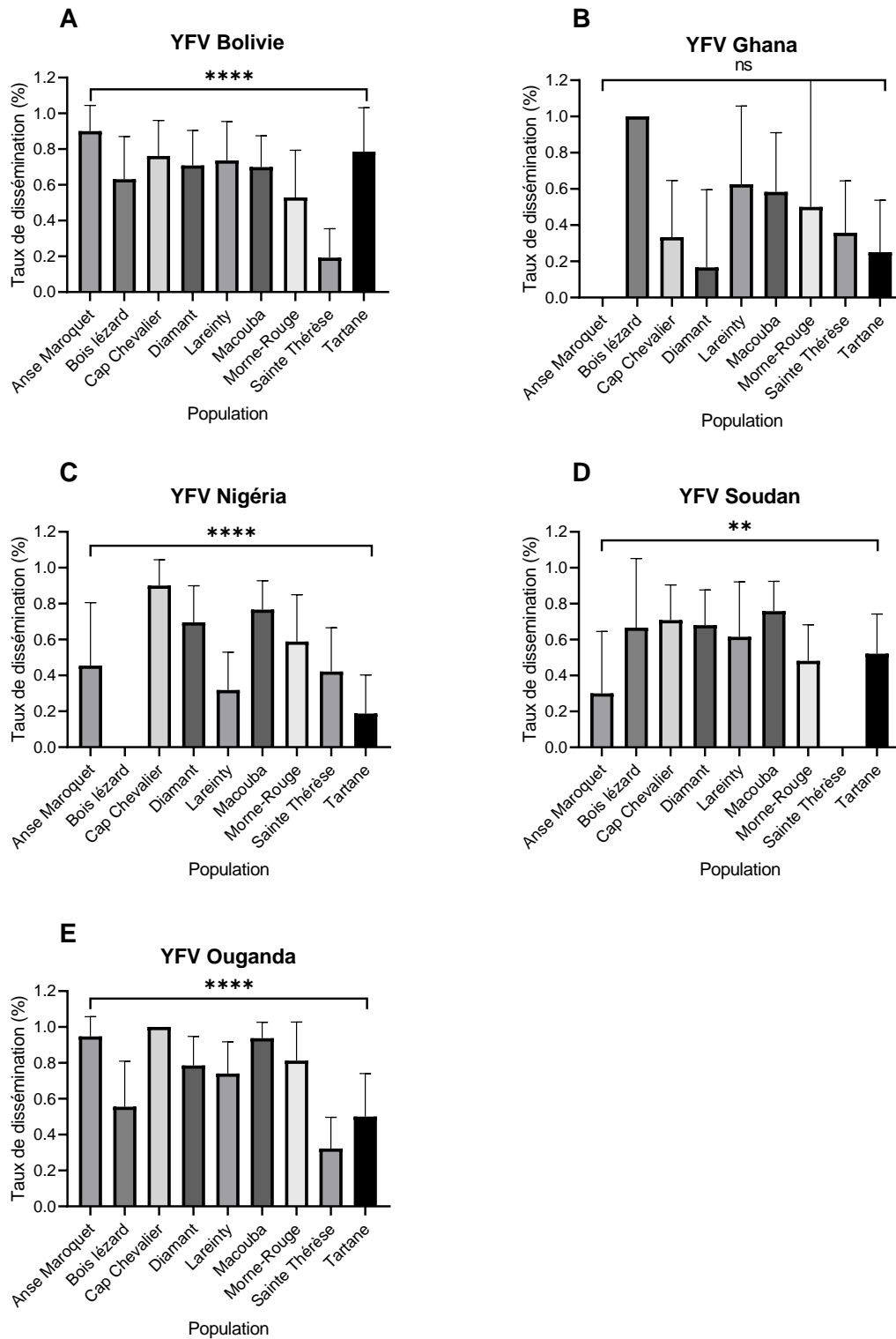


Figure 34 : Taux de dissémination de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, ** $0,001 \leq p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

A 21 jpi, les 5 YFV disséminent mieux qu'à 14 jpi (Figure 35). Avec YFV Bolivie, DR varie de 66,66% (24/36) pour Sainte Thérèse à 83,33% (10/12) pour Tartane, sans différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). Avec YFV Ghana, DR varie de 0% (0/1) pour Bois lézard à 71,42% (5/7) pour Anse Maroquet, avec une différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,05$). Avec YFV Nigeria, DR varie de 36,36% (8/22) pour Sainte Thérèse à 100 (13/13) pour Cap Chevalier, avec une différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$). Avec YFV Soudan, DR varie de 35,29% pour Sainte Thérèse (6/17) à 100% (7/7) pour Bois lézard, avec une différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$). Avec YFV Ouganda, DR varie de 64,28% (9/14) pour Anse Maroquet à 100% pour Bois lézard (16/16) et Cap Chevalier (26/26), avec une différence significative de DR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,01$).

A 21 jpi, YFV Ghana ne se dissémine pas mieux qu'à 14 jpi dans les moustiques de Martinique.

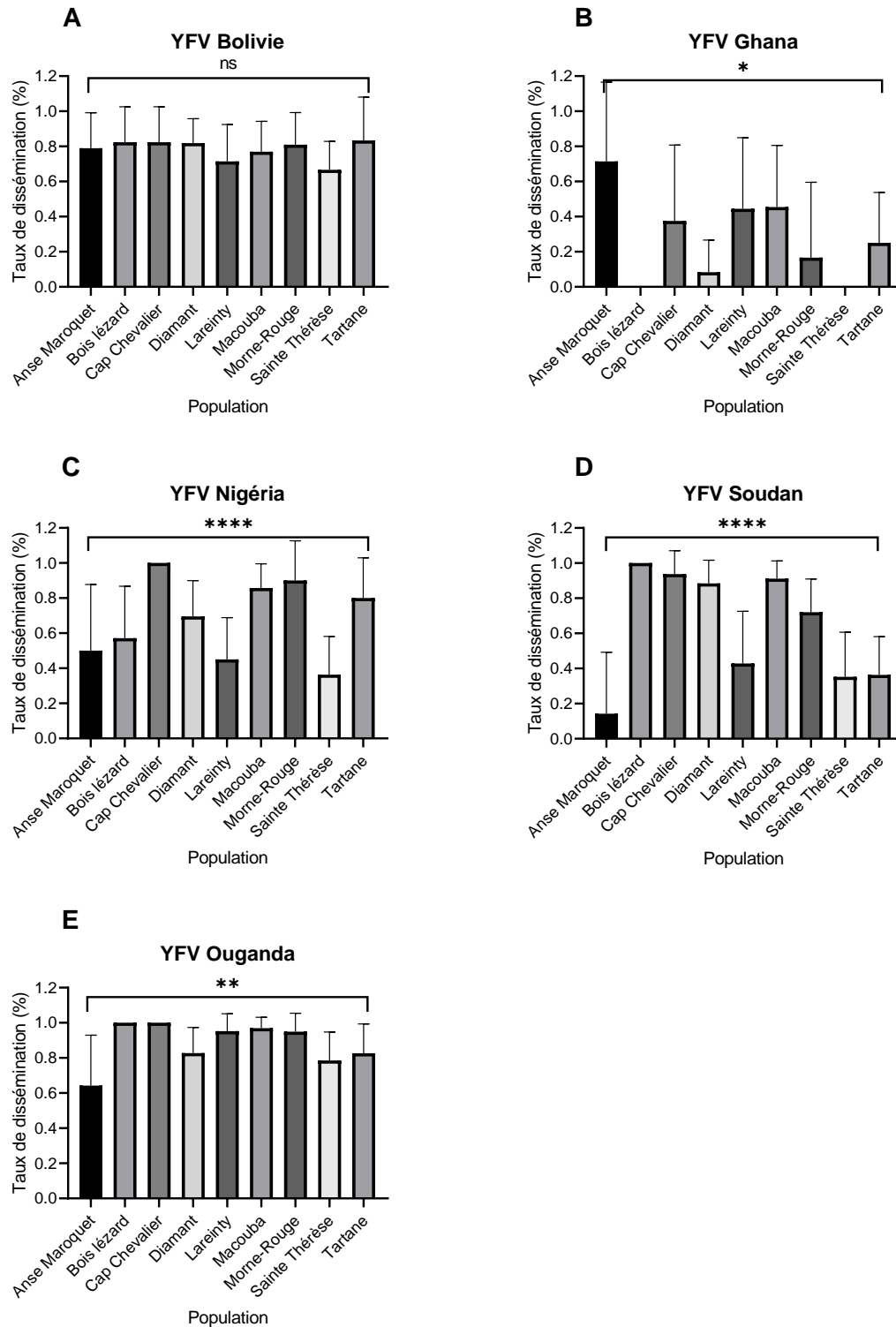


Figure 35 : Taux de dissémination de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, * $0,01 \leq p < 0,05$, ** $0,001 \leq p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Les résultats de DR montrent que : (i) les 5 YFV se disséminent dans le moustique, (ii) les moustiques de Martinique disséminent le virus aussi efficacement à 14 jpi qu'à 21 jpi, (iii) les moustiques de Martinique disséminent bien YFV Bolivie et Ouganda et moins bien YFV Ghana.

8.3. Taux de transmission

A 14 jpi, les TR sont inférieurs à 50% (Figure 36). Avec YFV Bolivie, TR varie de 0% (Anse Maroquet, Bois lézard, Morne-Rouge) à 20% (1/5) pour Sainte Thérèse, sans différence significative de TR entre les populations (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). Avec YFV Ghana, tous les TR sont égaux à 0%. Avec YFV Nigeria, TR varie de 0% (Sainte Thérèse, Tartane) à 38,88% (7/18) pour Cap Chevalier, sans différence significative de TR entre les populations (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). Avec YFV Soudan, TR varie de 0% (Anse Maroquet, Bois lézard, Cap Chevalier, Morne-Rouge, Tartane) à 37,5% (3/8) pour Lareinty, avec une différence significative de TR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,05$). Avec YFV Ouganda, TR varie de 0% (Diamant, Sainte Thérèse) à 50% (5/10) pour Bois lézard, avec une différence significative de TR entre les populations (Test exact de Fisher : $p < 0,01$). A 14 jpi, YFV Ghana n'est pas transmis et Ouganda est le mieux transmis (7/9 populations de Martinique).

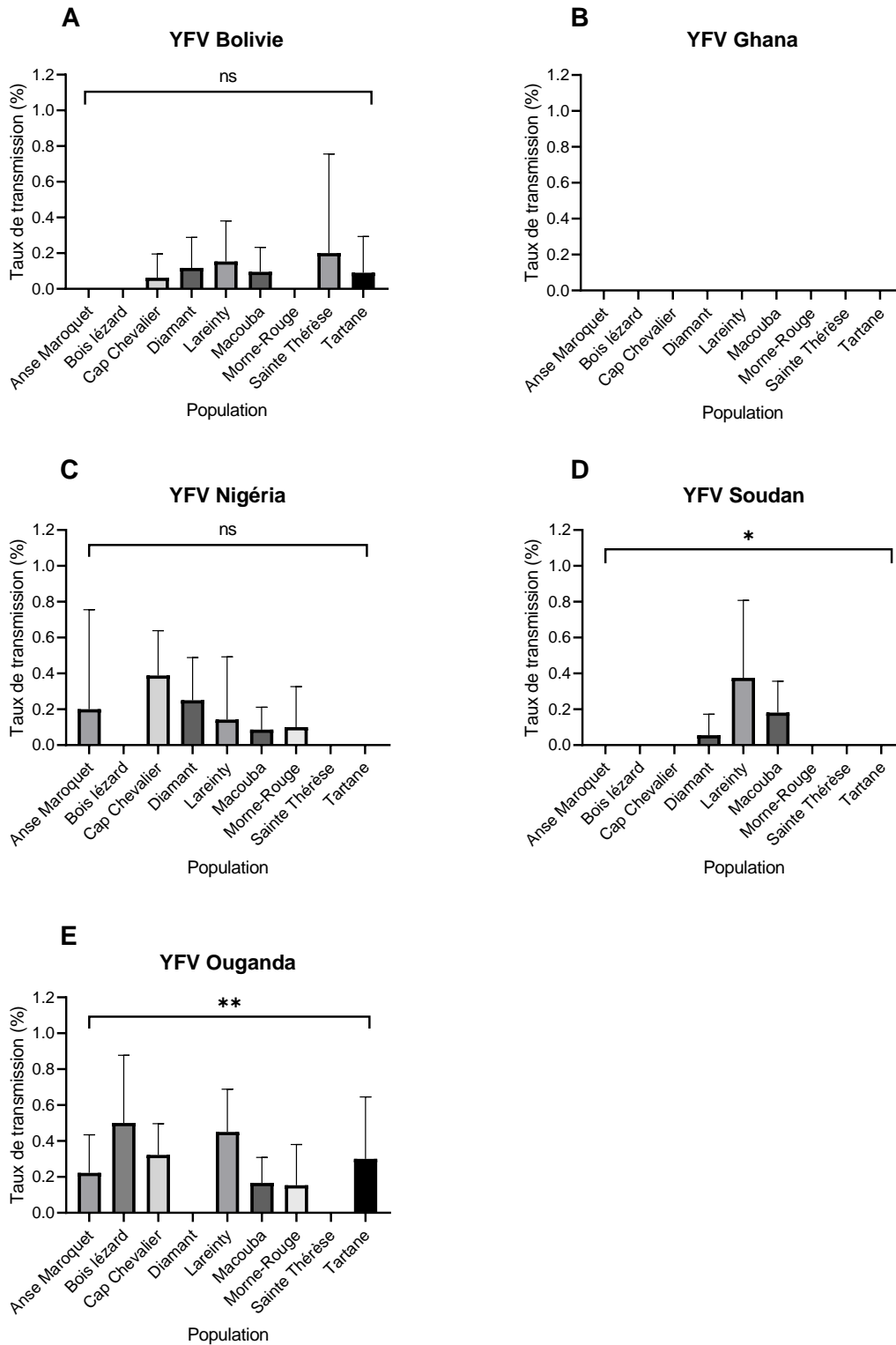


Figure 36 : Taux de transmission de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, * $0,01 \leq p < 0,05$, ** $0,001 \leq p < 0,01$.

A 21 jpi, les 5 YFV sont mieux transmis qu'à 14 jpi (Figure 37). Avec YFV Bolivie, TR varie de 4,16% (1/24) pour Sainte Thérèse à 25% (5/20) pour Macouba. Avec YFV Ghana, TR varie de 0% (Anse Maroquet, Cap Chevalier, Macouba, Morne-Rouge, Tartane) à 33,33% (1/3) pour Diamant. Avec YFV Nigeria, TR varie de 0% (0/5) pour Anse Maroquet à 37,5% (3/8) pour Bois lézard. Avec YFV Soudan, TR varie de 12,5% pour Tartane (1/8) à 100% (1/1) pour Anse Maroquet. Avec YFV Ouganda, TR varie de 15% (3/20) pour Morne-Rouge à 50% pour Bois lézard (8/16). La différence entre TR des 9 populations infectées par chacun des 5 YFV est non significative (Test exact de Fisher : $p > 0,05$).

A 21 jpi, YFV Ghana reste le virus le moins bien transmis par les moustiques de Martinique. De plus, YFV Bolivie, Soudan, et Ouganda sont transmis par les 9 populations de Martinique.

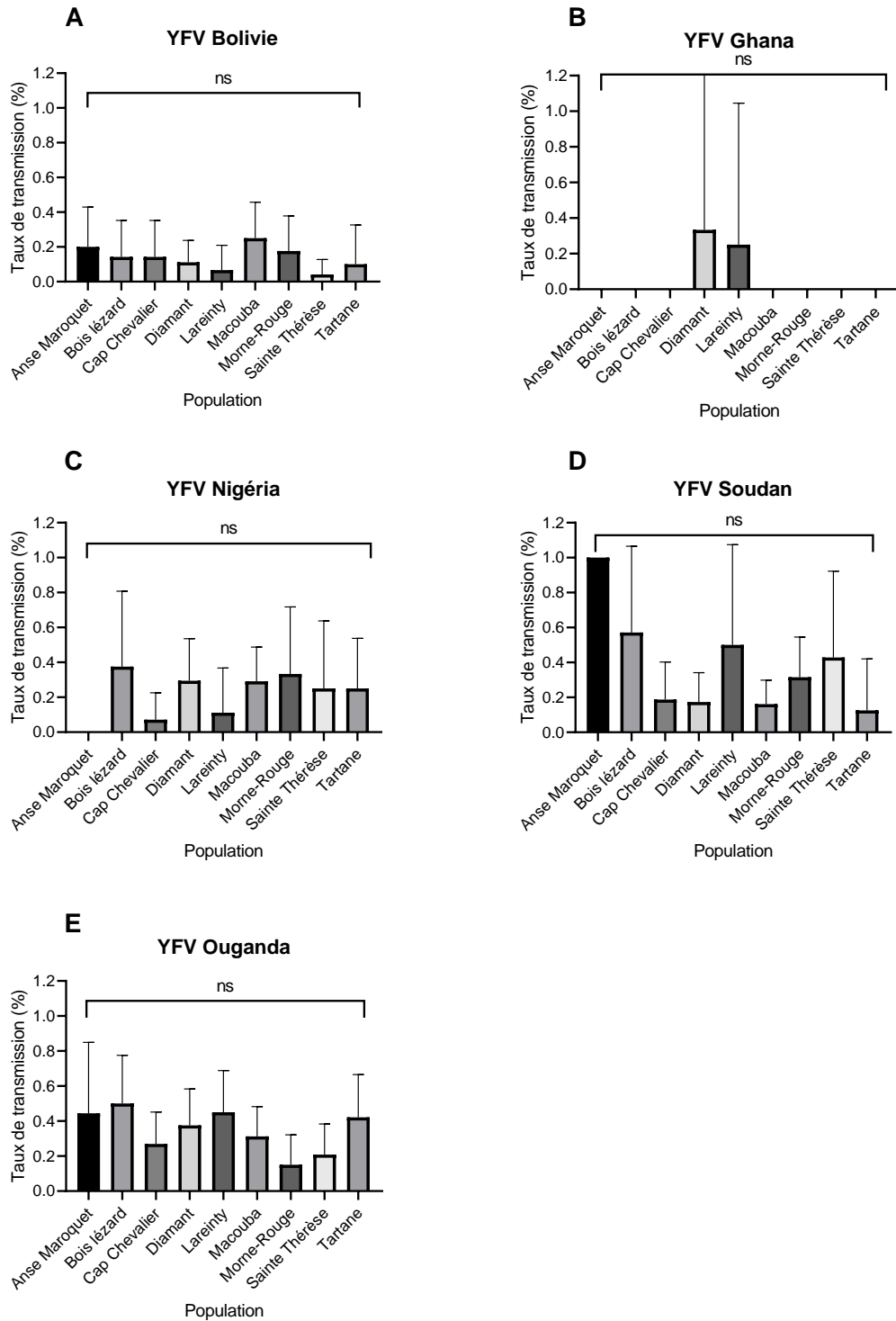


Figure 37 : Taux de transmission de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif.

Globalement, les résultats de TR montrent que : (i) YFV Ghana n'est pas transmis à 14 jpi mais à 21 jpi pour quelques populations de Martinique, et (ii) YFV Ouganda est le virus le mieux transmis à 14 et 21 jpi par les populations de Martinique.

En résumé, l'examen de la CV des 9 populations d'*Ae. aegypti* de Martinique infectées avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL montrent que :

- les 9 populations de la Martinique s'infectent avec les 5 YFV à 14 jpi comme à 21 jpi ;
- la majorité des populations (7-9) sont capables de disséminer le YFV ;
- Peu de populations sont capables de transmettre le YFV à 14 jpi (22) et davantage de populations le sont à 21 jpi (37) ;
- YFV Ghana est le moins performant des 5 virus : infecte moins, se dissémine moins et n'est pas transmis à 14 jpi et seulement par les 2 populations, Diamant et Lareinty, à 21 jpi ;
- YFV Bolivie et Ouganda sont les plus performants des 5 virus : infecte bien, se dissémine bien et est bien transmis ;
- les valeurs de TR sont plus faibles que celles des DR alors que celles des DR restent proches de celles des IR, indiquant que les glandes salivaires jouent un rôle de barrière au virus plus important que le tube digestif.

8.4. Comparaisons des 9 populations d'*Ae. aegypti* de Martinique

En calculant IR, DE, TE, il est possible de préciser l'infection, la dissémination et la transmission sur l'ensemble des moustiques testés. La figure 38 montre que :

- toutes les populations s'infectent avec les 5 virus à 14 et 21 jpi ;
- les 5 YFV disséminent dans les moustiques à l'exception de YFV Soudan pour Sainte Thérèse, YFV Nigéria pour Bois lézard et YFV Ghana pour Anse Maroquet à 14 jpi, et YFV Ghana pour Sainte-Thérèse et Bois lézard à 21 jpi ;
- la transmission des 5 virus est possible mais faible, plus faible à 14 jpi qu'à 21 jpi ;
- Aucune population ne transmet YFV Ghana à 14 jpi et seulement 2/9 le transmettent à 21 jpi ;
- Macouba est la population qui s'infecte bien, dissémine et transmet les 5 YFV à l'exception de YFV Ghana.

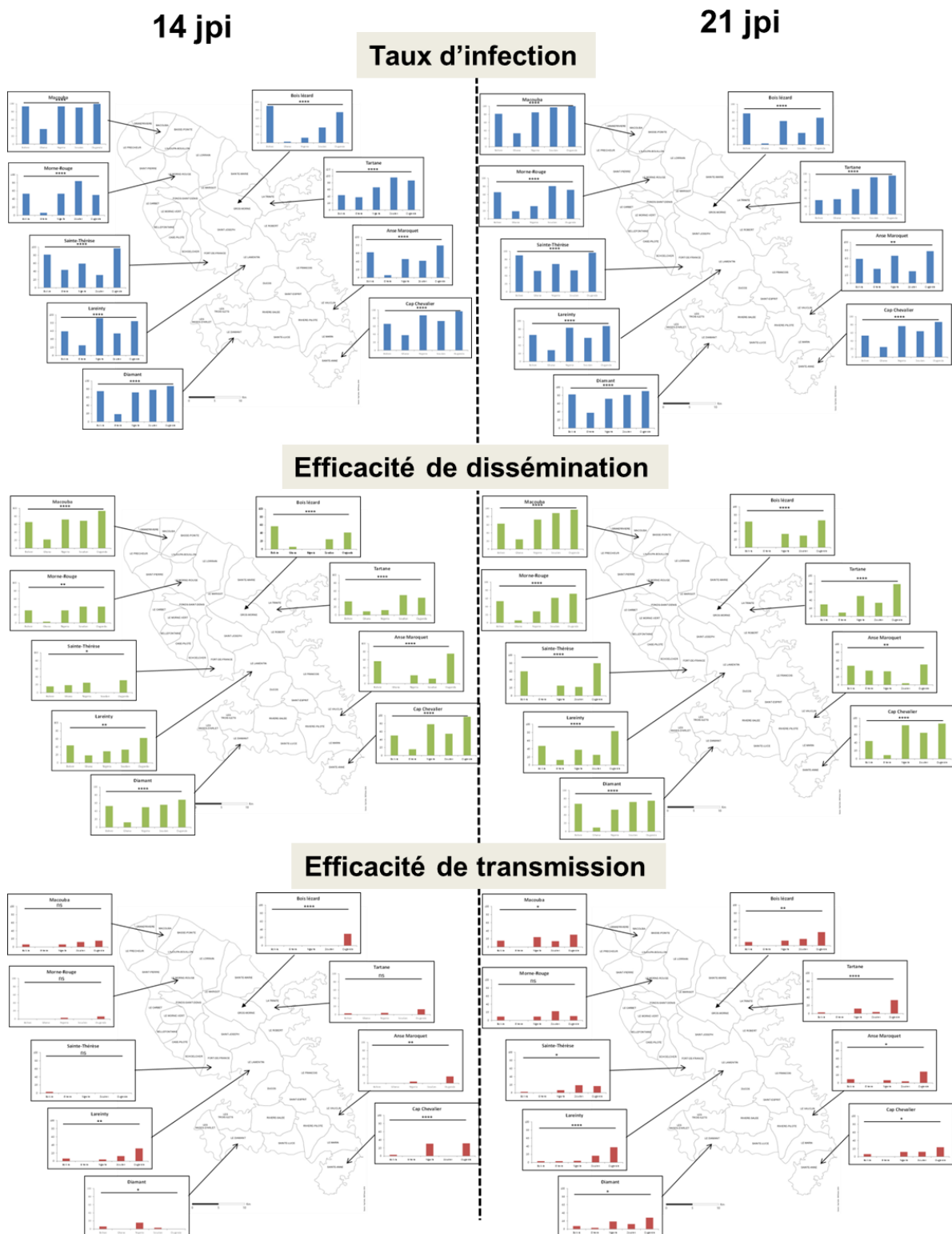


Figure 38 : Taux d'infection, efficacité de dissémination et efficacité de transmission de 9 populations d'*Ae. aegypti* de Martinique vis-à-vis de 5 YFV (Bolivie, Ghana, Nigéria, Soudan, Ouganda). Les moustiques sont examinés 14 jours et 21 jours et après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Test exact de Fisher : ns non significatif, * $0,01 \leq p < 0,05$, ** $0,001 \leq p < 0,01$, *** $p < 0,0001$.

Le nombre de particules virales détectées dans différents compartiments du moustique, *Ae.aegypti* de Martinique

En déterminant le nombre de particules virales dans le tube digestif, la carcasse et la salive, il est possible de préciser l'intensité de l'infection, la dissémination et la transmission pour chaque moustique des 9 populations d'*Ae. aegypti* infectées avec les 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL. Les moustiques ont été examinés à 14 et 21 jpi.

8.5. Le nombre de particules virales dans le tube digestif

A 14 jpi, les 9 populations de Martinique présentent un nombre moyen de particules virales dans le tube digestif qui varient en fonction du YFV utilisé (Figure 39). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen varie de 8433 (sur N=26 moustiques infectés) pour Sainte-Thérèse à 43086 (N=20) pour Anse Maroquet, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen varie de 18 (N=2) pour Anse Maroquet à 5673 (N=26) pour Sainte Thérèse, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen varie de 24 (N=4) pour Bois lézard à 13924 (N=30) pour Macouba, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen varie de 75 (N=10) pour Sainte-Thérèse à 4954 (N=22) pour Tartane, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen varie de 553 (N=31) pour Sainte Thérèse à 17832 (N=20) pour Tartane, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

A 14 jpi, YFV Ghana présente les nombres de particules virales les plus faibles dans le tube digestif alors que YFV Bolivie, les plus élevés. La population Tartane présente les nombres de particules virales les plus élevés, 14 jours après infection avec YFV Soudan et Ouganda.

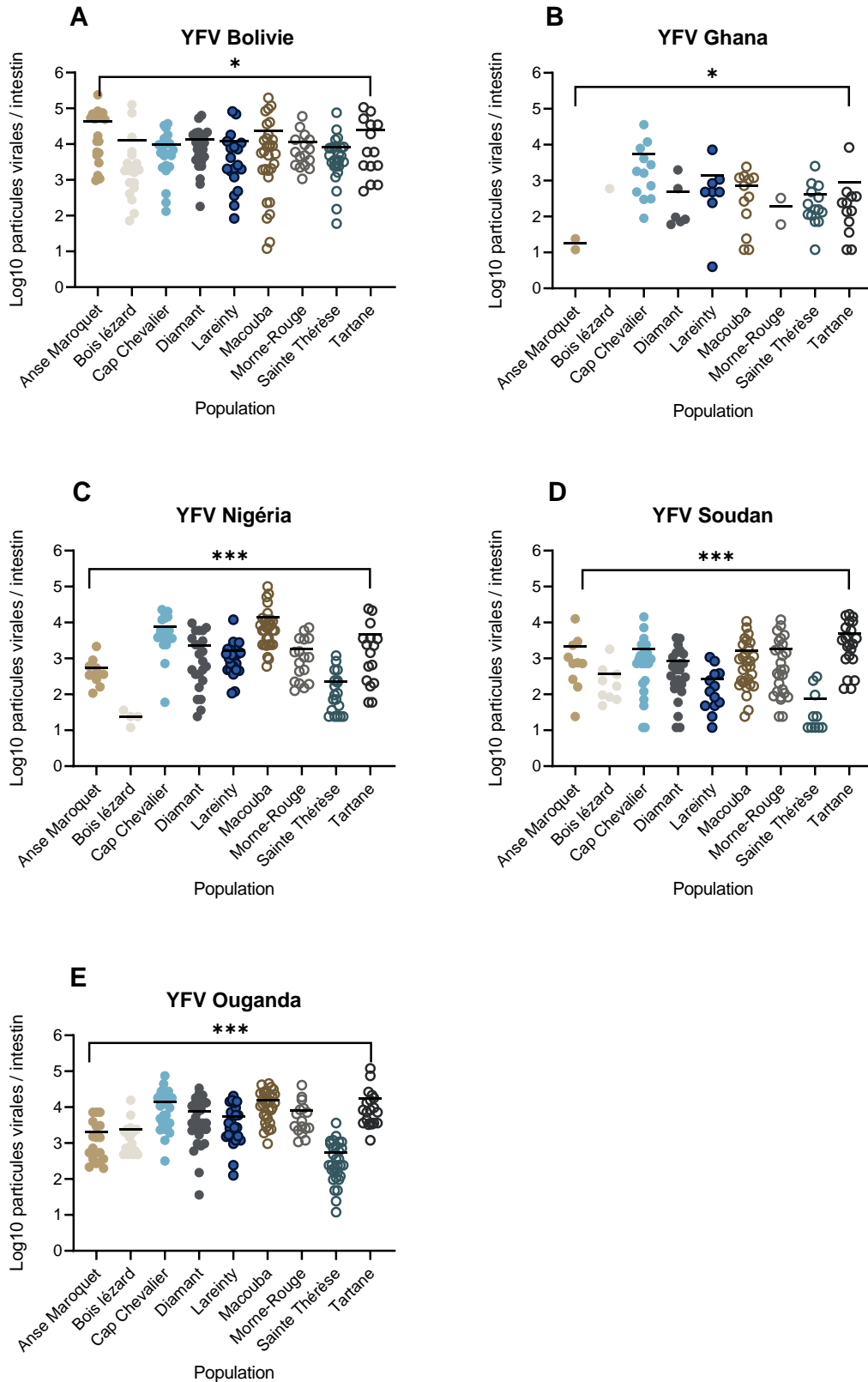


Figure 39 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre

de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : * $0,01 \leq p < 0,05$, *** $0,0001 \leq p < 0,001$.

A 21 jpi, le nombre moyen de particules virales dans le tube digestif n'est pas toujours plus important qu'à 14 jpi (Figure 40). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen varie de 6004 (N=26) pour Macouba à 40745 (N=19) pour Anse Maroquet, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen varie de 84 (N=1) pour Bois lézard à 15108 (N=7) pour Anse Maroquet, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen varie de 1051 (N=22) pour Sainte Thérèse à 12746 (N=15) pour Tartane, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen varie de 157 (N=7) pour Bois lézard à 4092 (N=22) pour Tartane, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen varie de 2016 (N=16) pour Bois lézard à 10674 (N=23) pour Tartane, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

A 21 jpi, YFV Ghana présente les nombres de particules virales les plus faibles dans le tube digestif alors que YFV Bolivie, les plus élevés. La population Anse Maroquet présente le nombre de particules virales le plus élevé, 21 jours après infection avec YFV Bolivie. La population Tartane présente les nombres de particules virales les plus élevés, 21 jours après infection avec YFV Nigeria, Soudan et Ouganda.

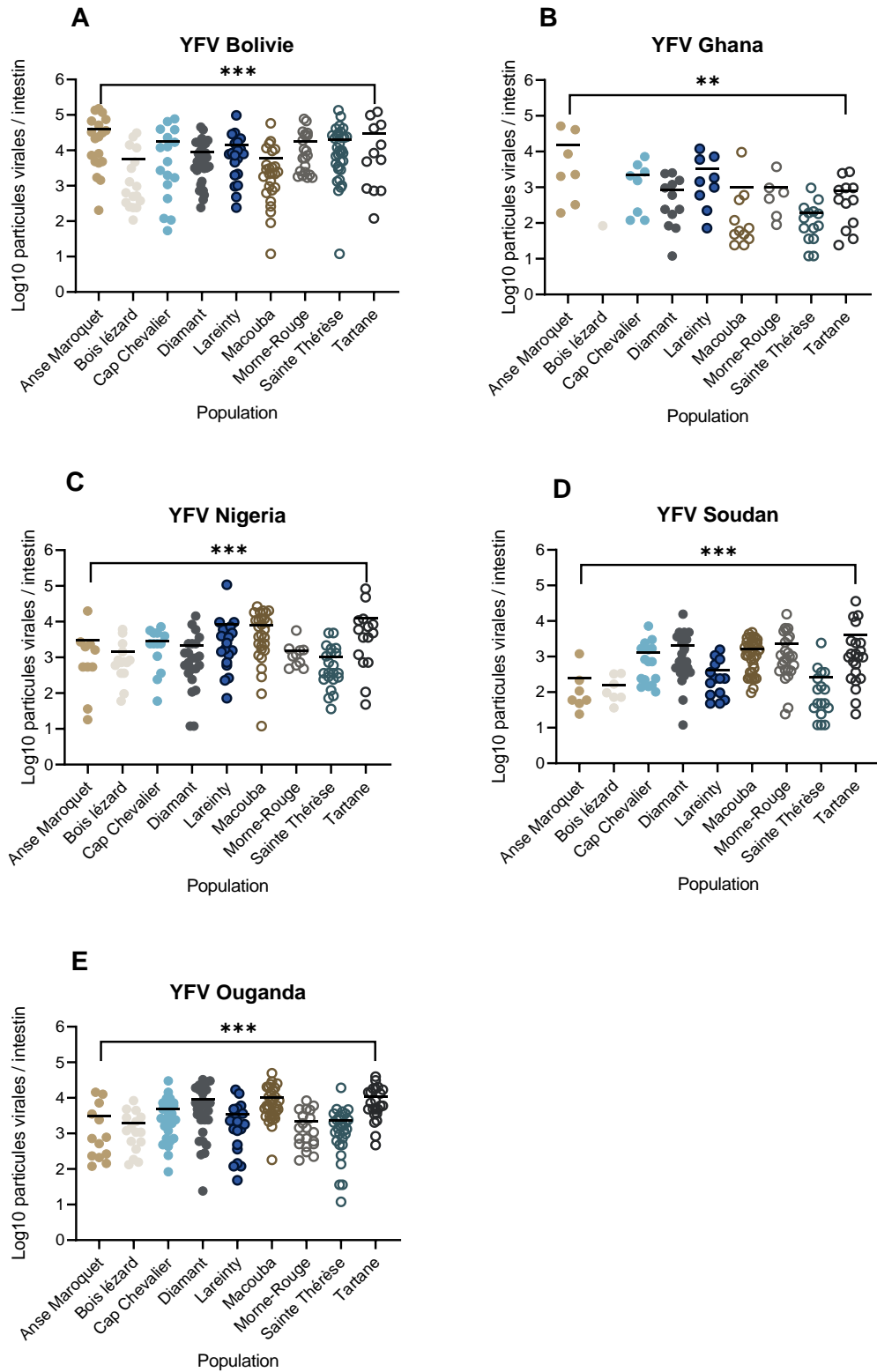


Figure 40 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre

de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ** $0,001 \leq p < 0,01$, *** $0,0001 \leq p < 0,001$.

L'examen du nombre de particules virales dans l'intestin moyen des moustiques montrent que : (i) le nombre de particules virales est variable en fonction des populations de moustiques de Martinique, (ii) ce nombre n'augmente pas à 21 jpi par rapport à 14 jpi, et (iii) YFV Ghana présente les nombres de particules virales les plus faibles dans le tube digestif alors que YFV Bolivie, les plus élevés.

8.6. Le nombre de particules virales dans la carcasse

A 14 jpi, les 9 populations de Martinique présentent un nombre moyen de particules virales plus élevé dans la carcasse que dans l'intestin moyen du moustique (Figure 41). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen varie de 787 (N=10) pour Morne-Rouge à 45378 (N=18) pour Anse Maroquet, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen varie de 24 pour Bois lézard (N=2) et Morne-Rouge (N=1) à 1452 (N=6) pour Lareinty, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen varie de 20 (N=3) pour Tartane à 4535 (N=23) pour Macouba, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen varie de 182 (N=12) pour Tartane à 7982 (N=13) pour Morne-Rouge, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen varie de 102 (N=10) pour Sainte Thérèse à 13709 (N=31) pour Cap Chevalier, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

A 14 jpi, YFV Ghana présente les nombres de particules virales les plus faibles dans la carcasse. La population Morne Rouge présente les nombres de particules virales les plus faibles, 14 jours après infection avec YFV Bolivie et Ghana et les plus élevés avec YFV Soudan. La population de Tartane présente les nombres de particules virales les plus faibles, 14 jours après infection avec YFV Nigeria et Soudan.

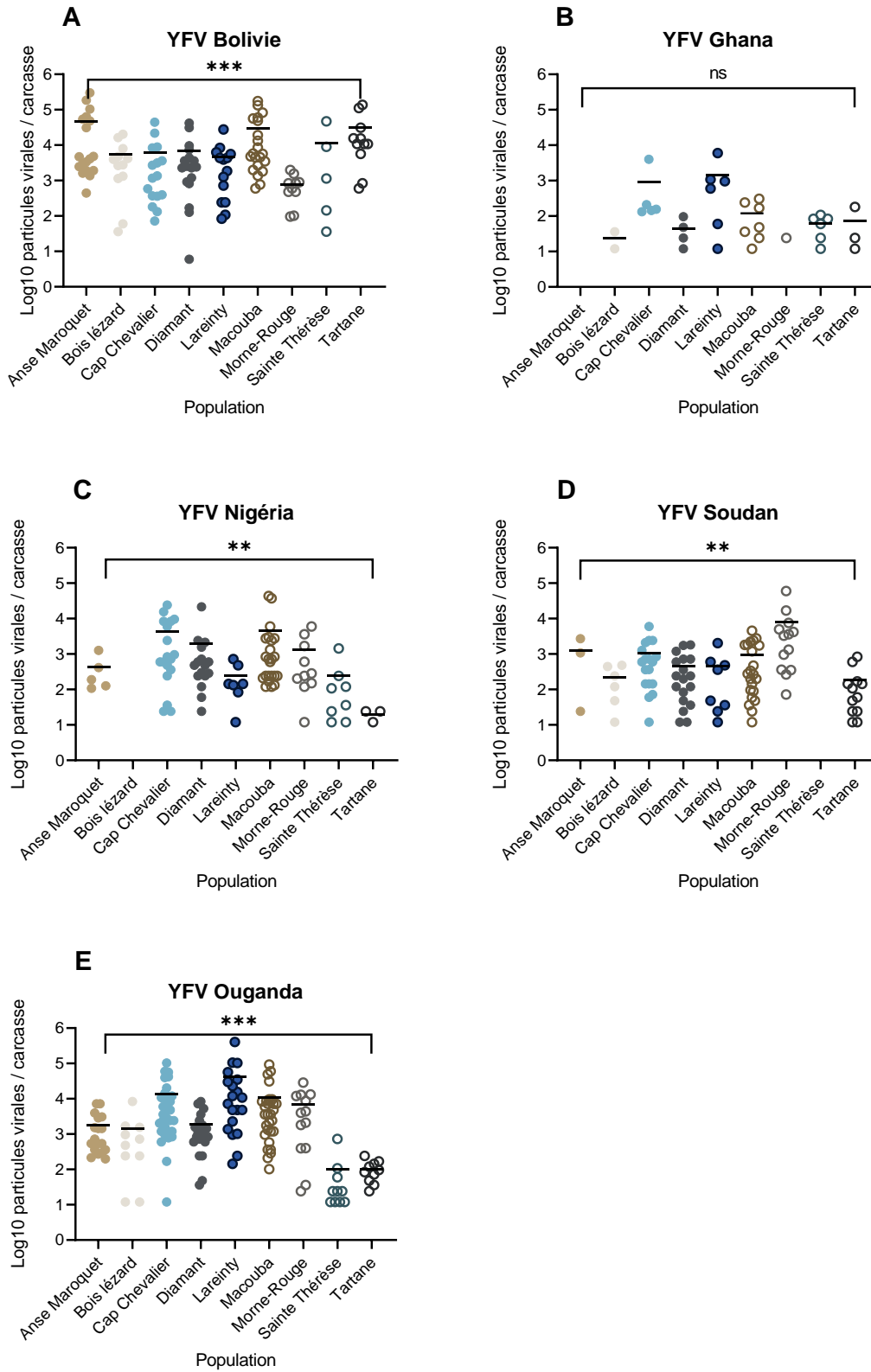


Figure 41 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la carcasse de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de

10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, ** $0,001 \leq p < 0,01$, *** $0,0001 \leq p < 0,001$.

A 21 jpi, le nombre moyen de particules virales dans la carcasse est plus important qu'à 14 jpi (Figure 42). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen varie de 15507 (N=20) pour Macouba à 199921 (N=15) pour Anse Maroquet, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen varie de 32 (N=3) pour Tartane à 2900 (N=3) pour Cap Chevalier, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen varie de 295 (N=5) pour Anse Maroquet à 35667 (N=24) pour Macouba, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen varie de 36 (N=1) pour Anse Maroquet à 131828 (N=7) pour Bois lézard, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen varie de 136 (N=9) pour Anse Maroquet à 92400 (N=16) pour Bois lézard, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

A 21 jpi, YFV Ghana présente les nombres de particules virales les plus faibles dans la carcasse. La population de Anse Maroquet présente les nombres de particules virales les plus élevés, 21 jours après infection avec YFV Bolivie et les plus faibles avec YFV Nigeria, Soudan et Ouganda. La population Bois lézard présente les nombres les plus élevés avec YFV Soudan et Ouganda.

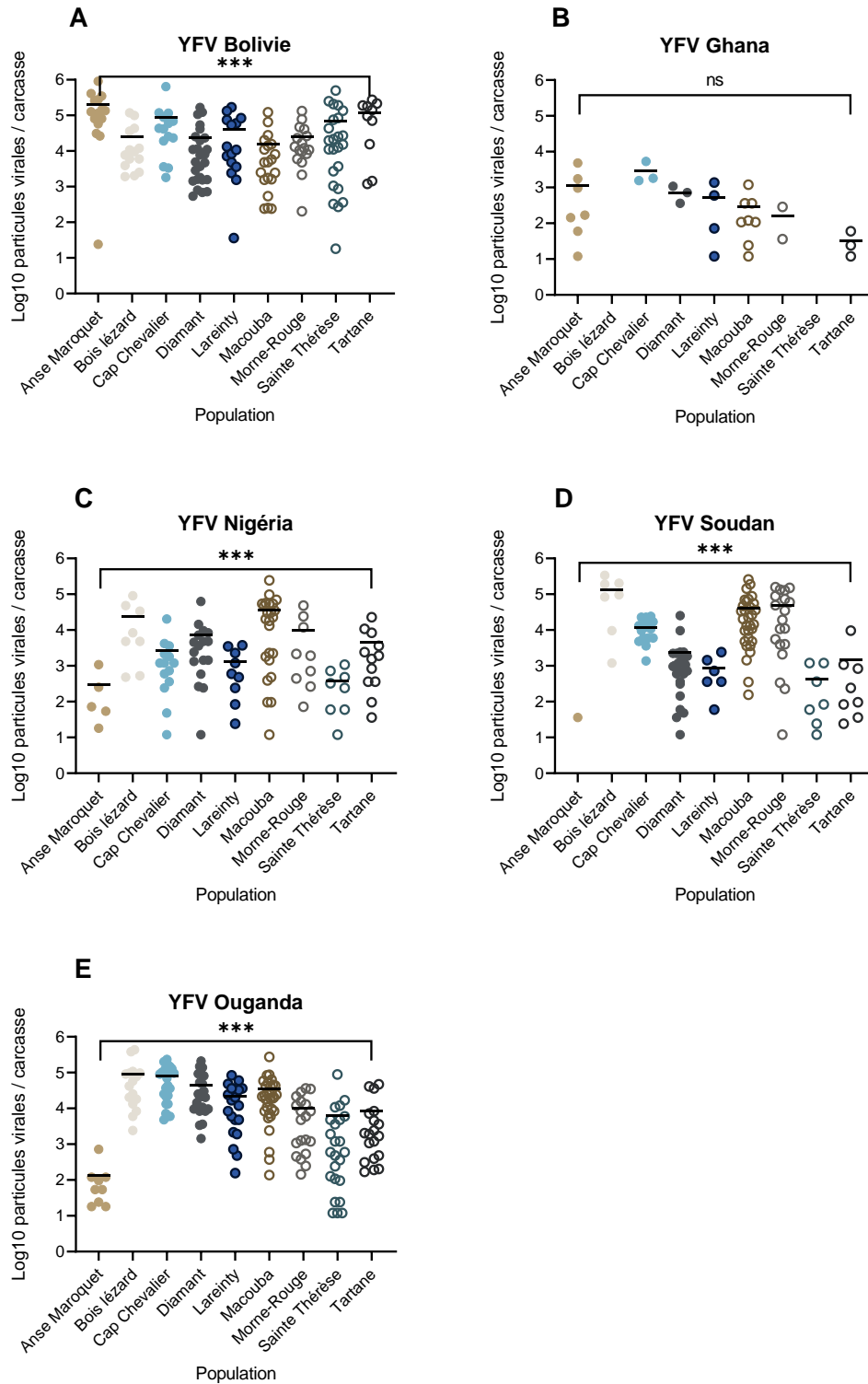


Figure 42 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la carcasse de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, *** $0,0001 \leq p < 0,001$

L'examen du nombre de particules virales dans la carcasse des moustiques indique que : (i) le nombre de particules virales dans la carcasse est plus important à 21 jpi qu'à 14 jpi, (ii) YFV Ghana présente les nombres de particules virales les plus faibles, et (iii) les populations de Martinique présentent un nombre de particules virales dans la carcasse qui diffèrent selon le YFV testé.

8.7. Le nombre de particules virales dans la salive

A 14 jpi, les 9 populations de Martinique présentent un nombre moyen de particules virales dans la salive qui est très faible (Figure 43). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen varie de 2 (N=1) pour Tartane à 112 (N=1) pour Sainte Thérèse. Avec YFV Ghana, on ne détecte aucune particule virale car aucune population ne transmet ce virus. Avec YFV Nigeria, le nombre moyen varie de 2 pour Anse Maroquet (N=1) et Lareinty (N=1) à 61 (N=2) pour Macouba. Avec YFV Soudan, le nombre moyen varie de 29 (N=4) pour Macouba à 376 (N=3) pour Lareinty. Avec YFV Ouganda, le nombre moyen varie de 4 (N=4) pour Anse Maroquet à 342 (N=10) pour Lareinty. On ne détecte pas de différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$).

A 14 jpi, le nombre de particules virales dans la salive des moustiques de Martinique est faible et varie très peu entre populations pour un même virus. YFV Soudan et Ouganda présentent les nombres de particules virales les plus élevés dans la salive alors que YFV Bolivie et Nigeria, les nombres les plus faibles. YFV Ghana n'est transmis par aucune population.

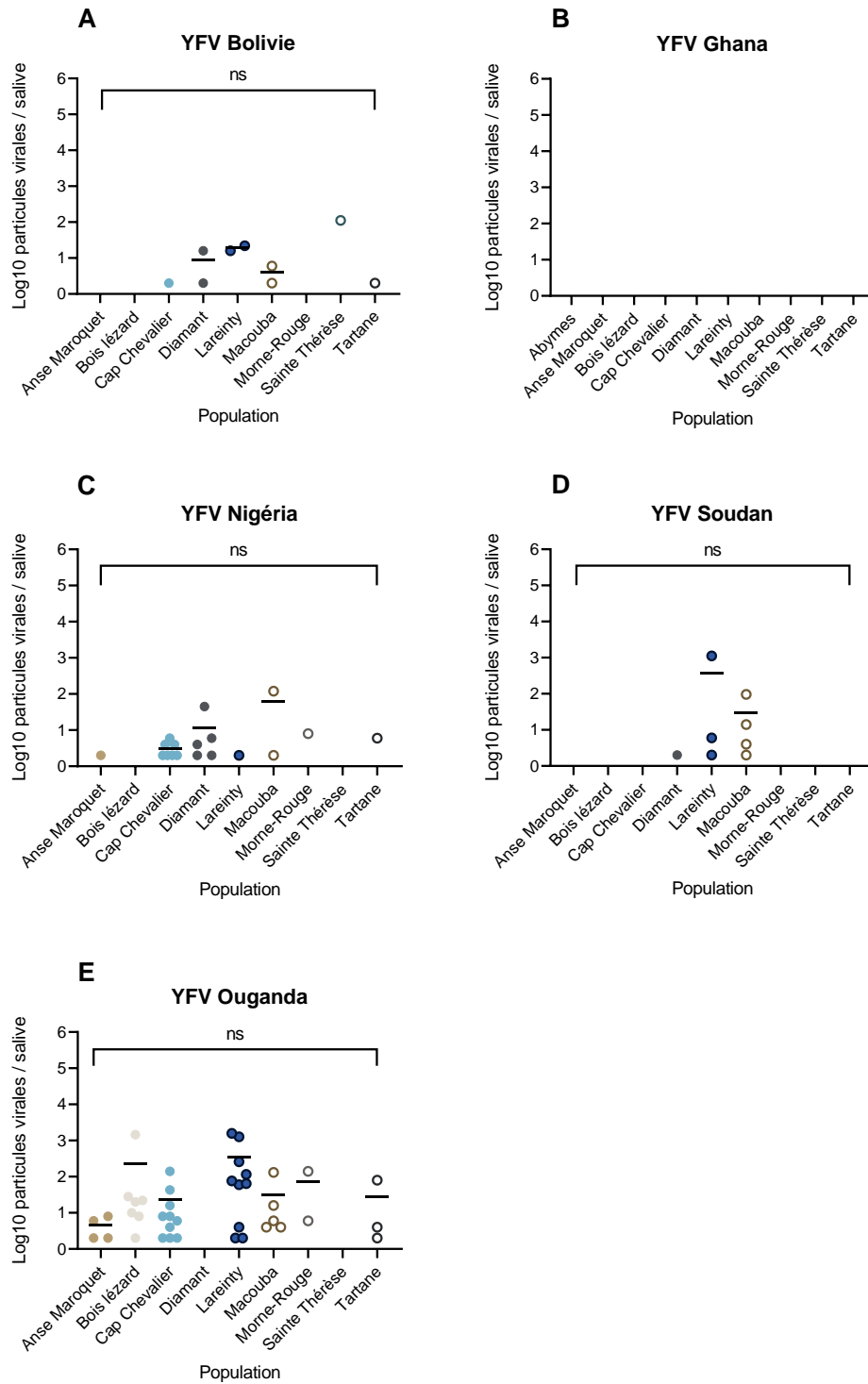


Figure 43 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la salive de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 14 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif.

A 21 jpi, les 9 populations de Martinique présentent un nombre moyen de particules virales dans la salive plus important qu'à 14 jpi (Figure 44). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen varie de 26 (N=2) pour Cap Chevalier à 320 (N=1) pour Tartane. Avec YFV Ghana, le nombre moyen est de 2 (N=1) pour Lareinty et 2 (N=1) pour Diamant. Avec YFV Nigeria, le nombre moyen varie de 3 (N=2) pour Cap Chevalier à 440 (N=1) pour Anse Maroquet. Avec YFV Soudan, le nombre moyen varie de 2 (N=3) pour Cap Chevalier à 1626 (N=4) pour Lareinty. Avec YFV Ouganda, le nombre moyen varie de 10 (N=7) pour Cap Chevalier à 1359 (N=8) pour Bois lézard. Pour un même virus, on ne détecte pas de différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$) à l'exception de YFV Nigeria et Ouganda (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$).

A 21 jpi, le nombre de particules virales dans la salive est le plus faible pour la population Cap Chevalier. YFV Soudan et Ouganda présentent les nombres de particules virales les plus élevés dans la salive alors que YFV Bolivie et Nigeria, les nombres les plus faibles. YFV Ghana n'est transmis par aucune population.

L'examen du nombre de particules virales dans la salive des moustiques de Martinique indique que : (i) le nombre de particules virales dans la salive est faible, plus faible à 14 jpi qu'à 21 jpi, (ii) ce nombre varie très peu entre populations pour un même virus, (iii) YFV Soudan et Ouganda présentent les nombres de particules virales les plus élevés dans la salive alors que YFV Bolivie et Nigeria, les nombres les plus faibles, et (iv) YFV Ghana n'est transmis que par les populations Diamant et Lareinty.

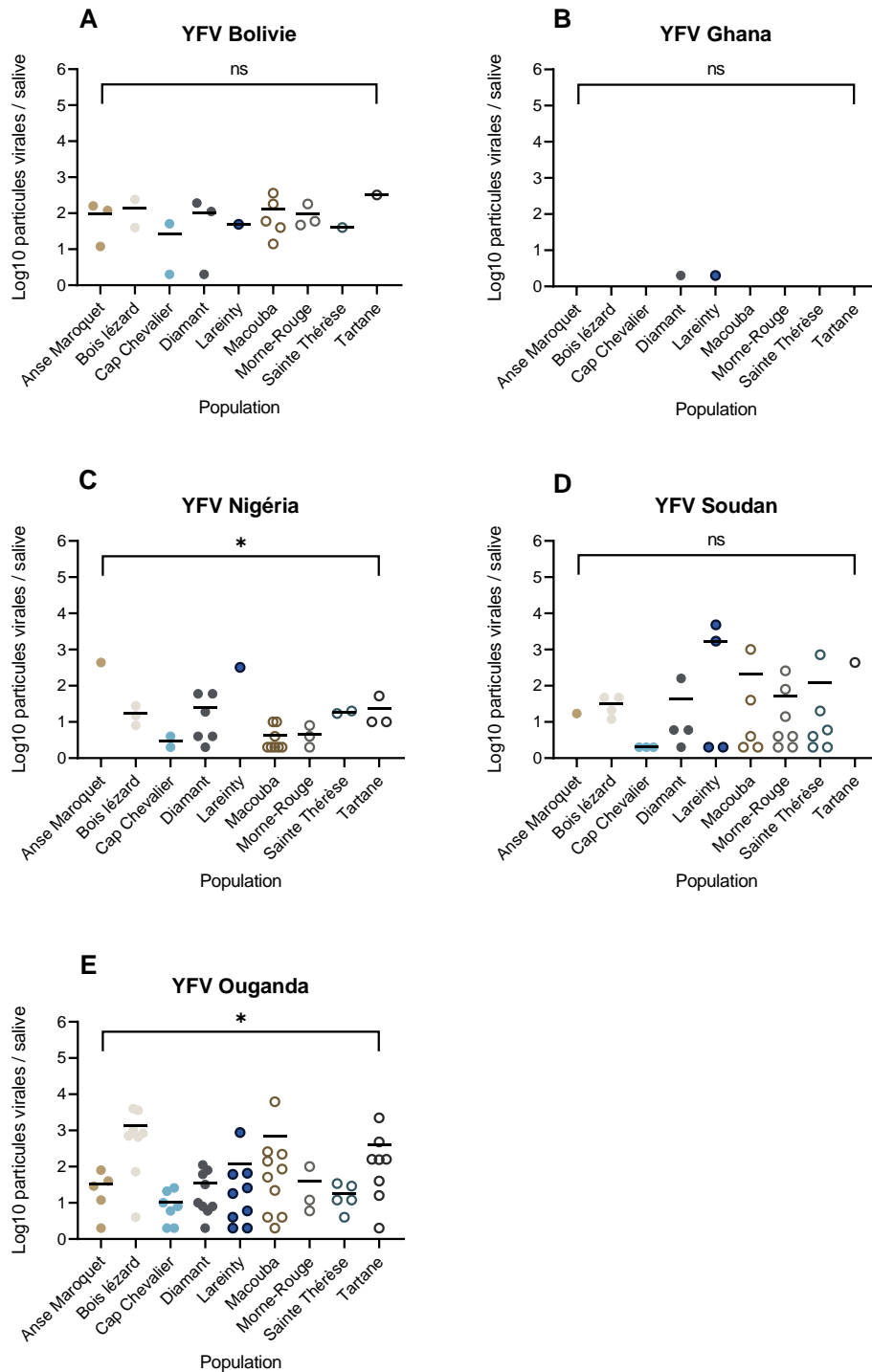


Figure 44 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la salive de moustiques issus de 9 populations d'*Aedes aegypti* de Martinique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, * $0,01 \leq p < 0,05$.

En résumé, l'examen du nombre de particules virales dans les trois compartiments du moustique, tube digestif, carcasse, et salive des 9 populations d'*Ae. aegypti* de Martinique infectées avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL montrent que :

- le nombre de particules virales est comparable à 14 jpi et 21 jpi dans l'intestin moyen des moustiques et est plus faible à 14 jpi par rapport à 21 jpi dans la carcasse et la salive ;
- alors que le nombre de particules virales dans le tube digestif et la carcasse varie entre populations pour un même virus, le nombre de particules virales dans la salive varie très peu ;
- YFV Ghana présente les nombres de particules virales les plus faibles dans le tube digestif et la carcasse. De plus, il n'est transmis que par 2 populations, 21 jours après infection ;
- YFV Bolivie présente les nombres de particules virales les plus élevés dans le tube digestif et la carcasse et un plus faible nombre de virus est détecté dans la salive.

Le nombre de particules virales dans chaque compartiment en fonction du statut du moustique

Les 9 populations d'*Ae. aegypti* infectées avec les 5 YFV fournis à un titre de 10^7 ffu/mL ont été examinées à 14 et 21 jpi en considérant le nombre de particules virales dans un compartiment du moustique (intestin moyen, carcasse et salive) selon le statut du moustique : (i) avec ou sans virus ayant disséminé et (ii) avec ou sans virus transmis via la salive).

8.8. Le nombre de particules virales dans l'intestin moyen en fonction du statut des moustiques (avec ou sans dissémination)

8.8.1. A 14 jours post-infection

A 14 jpi, le nombre moyen de particules virales mesuré dans l'intestin moyen varie selon le statut du moustique (Figure 45). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 2314 (sur N=185 moustiques) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus (sans virus détectés dans la carcasse) et 10,2 fois supérieur, 23526 (N=123) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen est faible, 137 (N=255) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 15,6 fois plus, 2140

(N=34) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 965 (N=165) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 7,1 fois plus, 6860 (N=90) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 537 (N=156) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 4 fois plus, 2144 (N=100) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 3092 (N=99) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 3,1 fois plus, 9576 (N=164) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

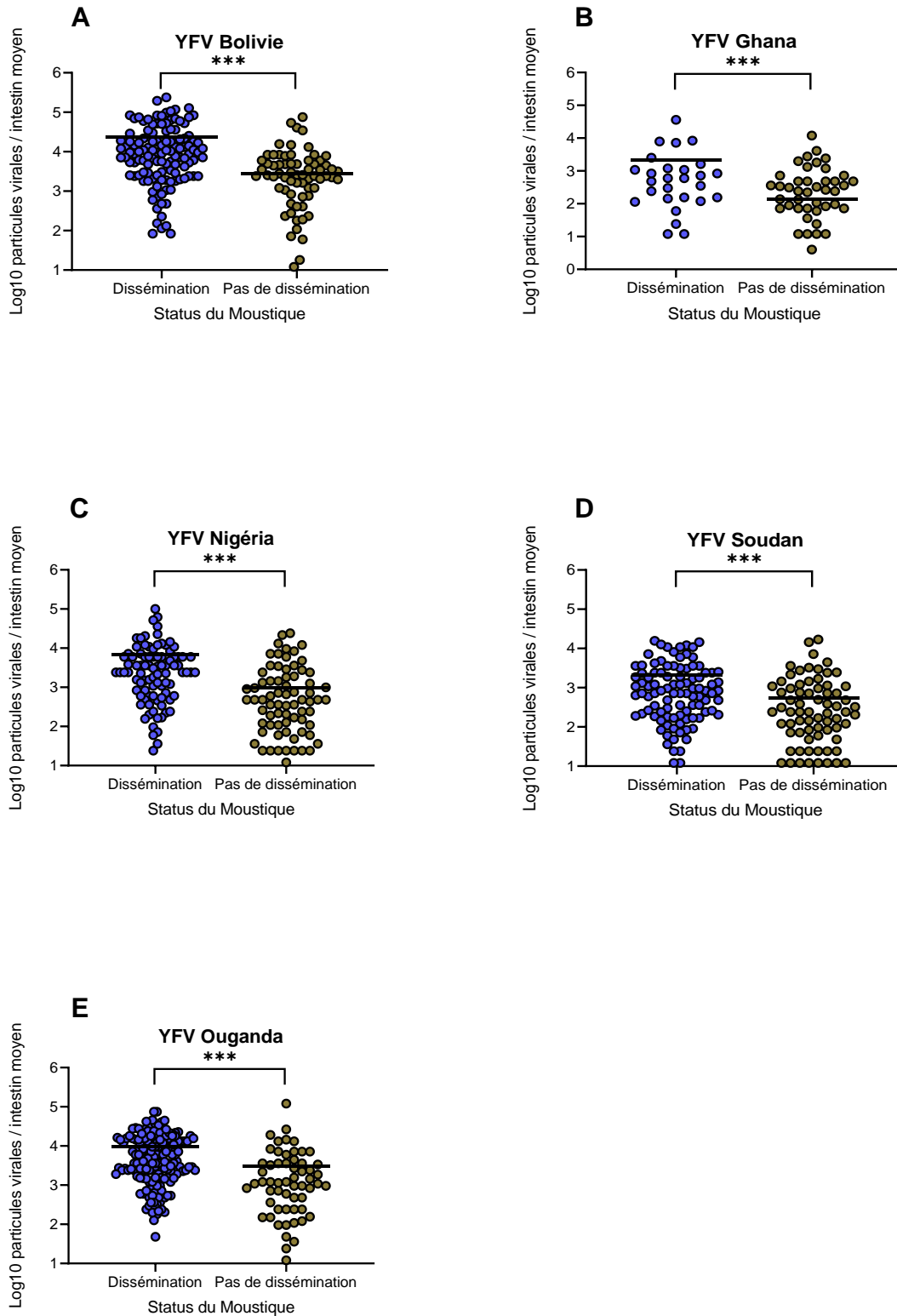


Figure 45 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans virus ayant disséminé dans la carcasse), examinés 14 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ***p<0,001.

8.8.2. A 21 jours post-infection

A 21 jpi, le nombre moyen de particules virales mesuré dans l'intestin moyen n'augmente significativement plus (Figure 46). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 1247 (N=171) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 16 fois supérieur, 19847 (N=156) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen est de 420 (N=242) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 7,3 fois plus, 3067 (N=30) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 1633 (N=127) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 3,2 fois plus, 5239 (N=106) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 330 (N=133) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 6,4 fois plus, 2101 (N=118) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 862 (N=53) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 7,3 fois plus, 6276 (N=190) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

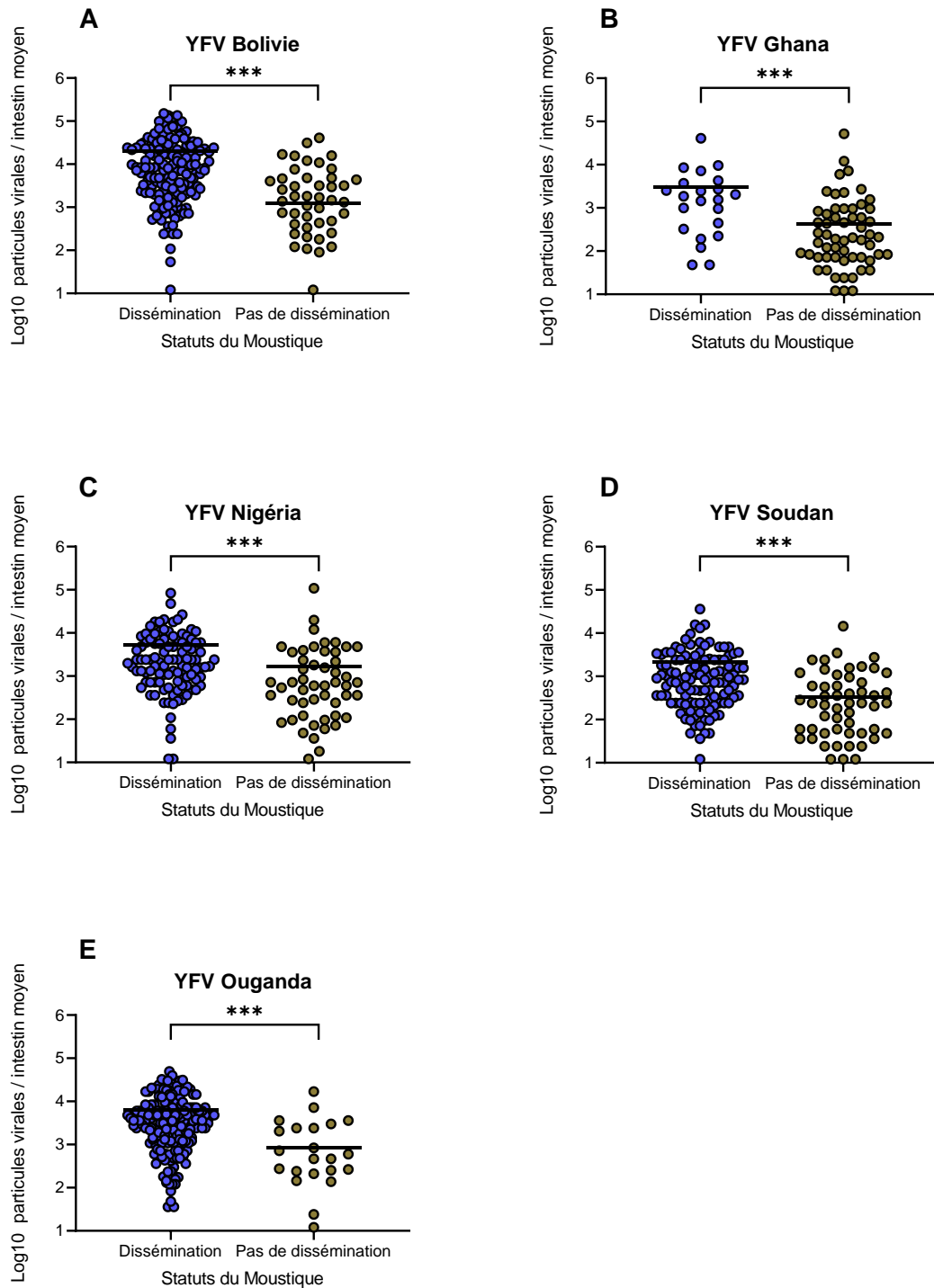


Figure 46 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans virus ayant disséminé dans la carcasse), examinés 21 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : *** 0,0001 ≤ p < 0,001.

Globalement, le nombre de particules virales dans le tube digestif des moustiques n'ayant pas disséminé le virus est généralement inférieur au nombre mesuré dans le tube digestif des moustiques ayant disséminé le virus. Ce résultat est plus marqué pour YFV Bolivie à 14 et 21 jpi.

8.9. Le nombre de particules virales dans la carcasse en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission)

8.9.1. A 14 jours post-infection

A 14 jpi, le nombre moyen de particules virales mesuré dans la carcasse varie selon le statut du moustique (Figure 47). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 6473 (N=300) pour les moustiques n'ayant pas transmis le virus (sans virus détectés dans la salive) et 4,6 fois supérieur, 29836 (N=9) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ghana, on ne compte que des moustiques n'ayant pas disséminé le virus avec un nombre moyen de 52 (N=289). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 901 (N=237) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 1,3 fois plus, 1144 (N=18) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 619 (N=249) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 1,7 fois plus, 1052 (N=8) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 3234 (N=222) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 7,8 fois plus, 25386 (N=41) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

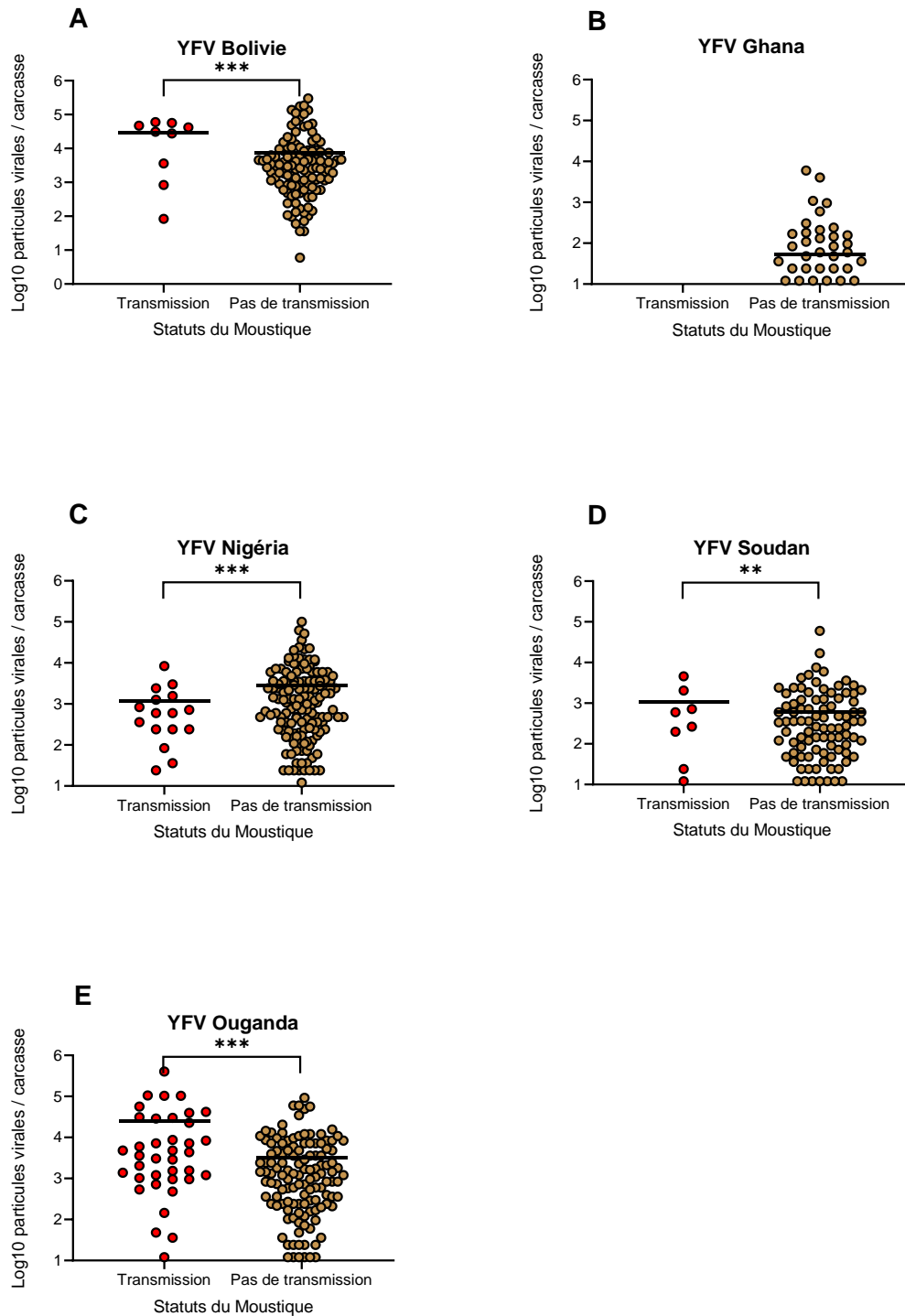


Figure 47 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la carcasse de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 14 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ** 0,001 ≤ p < 0,01, *** 0,0001 ≤ p < 0,001.

8.9.2. A 21 jours post-infection

A 21 jpi, le nombre moyen de particules virales mesuré dans la carcasse est plus élevé (Figure 48). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 25573 (N=309) pour les moustiques n'ayant pas transmis le virus et 2,9 fois supérieur, 73858 (N=21) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen est de 80 (N=270) pour les moustiques n'ayant pas transmis le virus et 10,5 fois supérieur, 840 (N=2) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 4464 (N=204) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 3,6 fois plus, 15919 (N=29) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 9294 (N=216) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 4,3 fois plus, 40441 (N=35) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 20503 (N=179) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 2,2 fois plus, 46265 (N=64) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

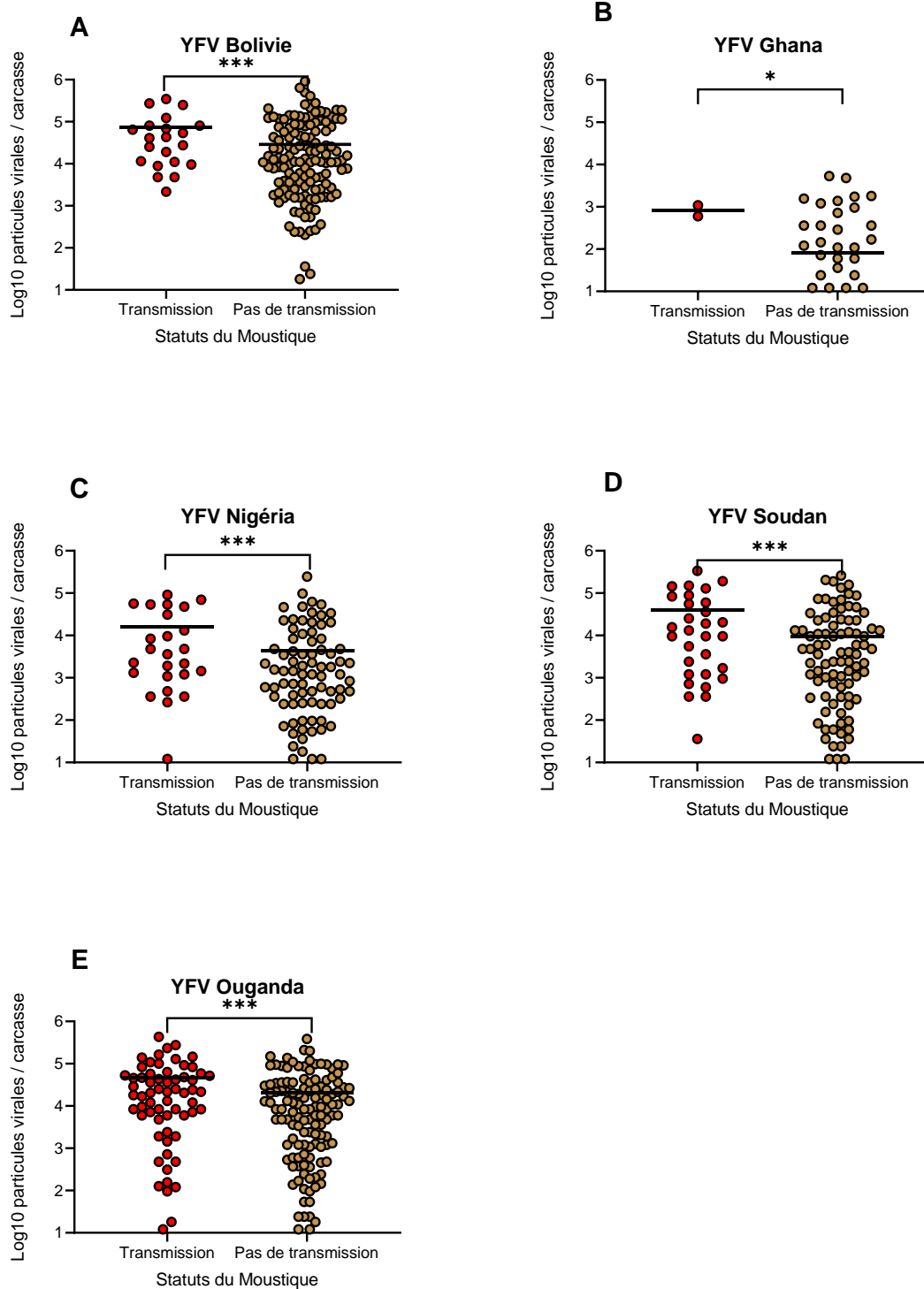


Figure 48 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la carcasse de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 21 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : * 0,01≤p<0,05, *** 0,0001≤p<0,001.

Dans l'ensemble, le nombre de particules virales dans la carcasse des moustiques n'ayant pas transmis le virus est généralement inférieur au nombre mesuré dans la carcasse des moustiques ayant transmis le virus. Ce résultat est plus marqué pour YFV Ghana à 21 jpi.

8.10. Le nombre de particules virales dans l'intestin moyen en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission)

8.10.1. A 14 jours post-infection

A 14 jpi, le nombre moyen de particules virales mesuré dans l'intestin moyen varie selon le statut du moustique (Figure 49). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 10849 (N=299) pour les moustiques n'ayant pas transmis le virus (sans virus détectés dans la salive) et de 8642 (N=9) pour les moustiques ayant disséminé le virus, sans différence significative (Test de Kruskal-Wallis : $p>0,05$). Avec YFV Ghana, on ne compte que des moustiques n'ayant pas transmis le virus avec un nombre moyen de 373 (N=289). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 2836 (N=237) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 2 fois plus, 5804 (N=18) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p<0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 1172 (N=248) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et de 931 (N=8) pour les moustiques ayant disséminé le virus, sans différence significative (Test de Kruskal-Wallis : $p>0,05$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 6115 (N=222) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 2,1 fois plus, 12662 (N=41) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p<0,001$).

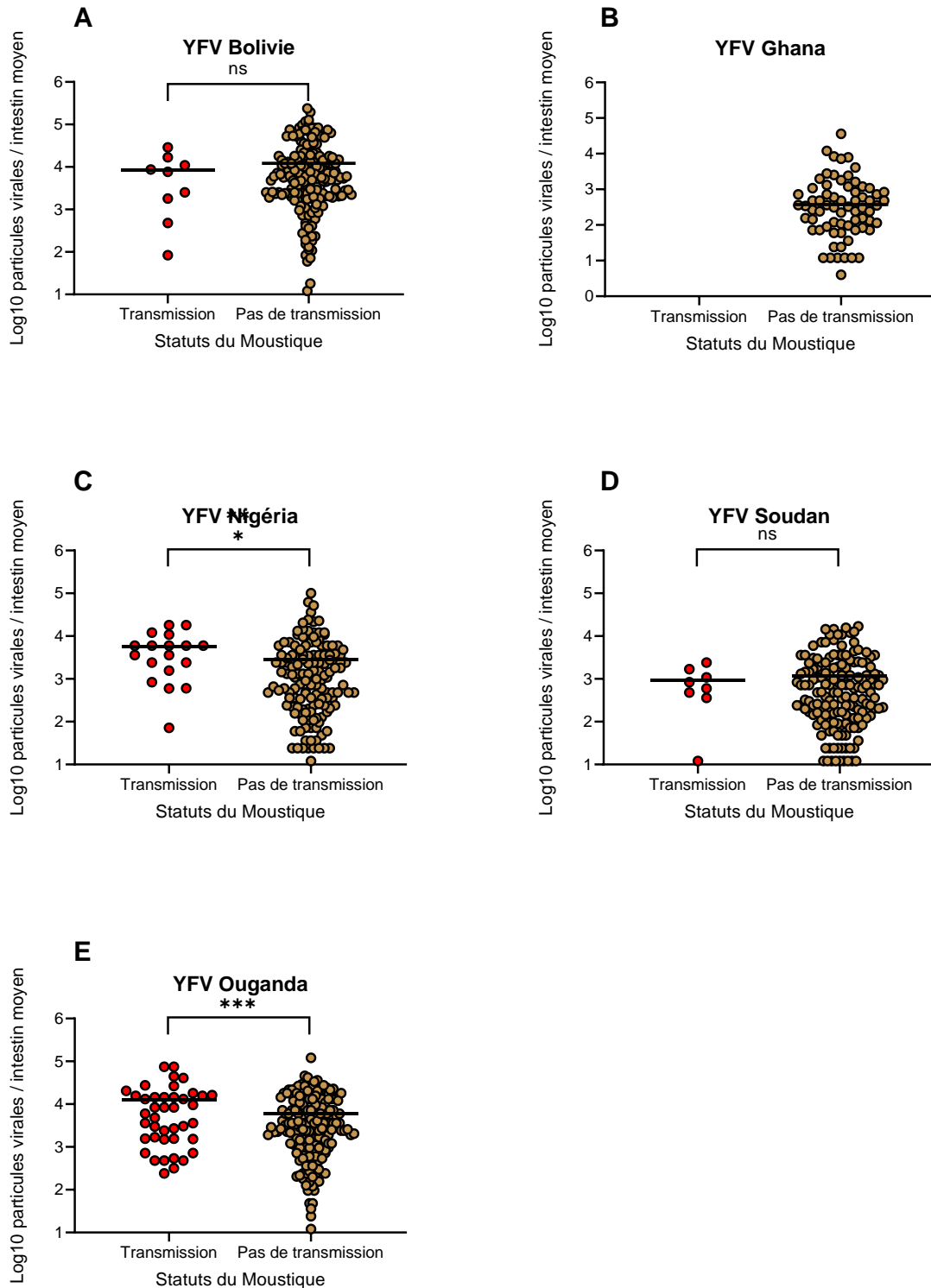


Figure 49 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 14 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, *** $0,0001 \leq p < 0,001$.

8.10.2. A 21 jours post-infection

A 21 jpi, le nombre moyen de particules virales mesuré dans l'intestin moyen est généralement plus important qu'à 14 jpi (Figure 50). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 9456 (N=306) pour les moustiques n'ayant pas transmis le virus et 2,1 fois supérieur, 19796 (N=21) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen est de 711 (N=270) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et de 930 (N=2) pour les moustiques ayant disséminé le virus, sans différence significative (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 2572 (N=204) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 3,2 fois plus, 8206 (N=29) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 1095 (N=216) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 1,4 fois plus, 1576 (N=35) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 4577 (N=179) pour les moustiques n'ayant pas disséminé le virus et 1,4 fois plus, 6546 (N=64) pour les moustiques ayant disséminé le virus (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$).

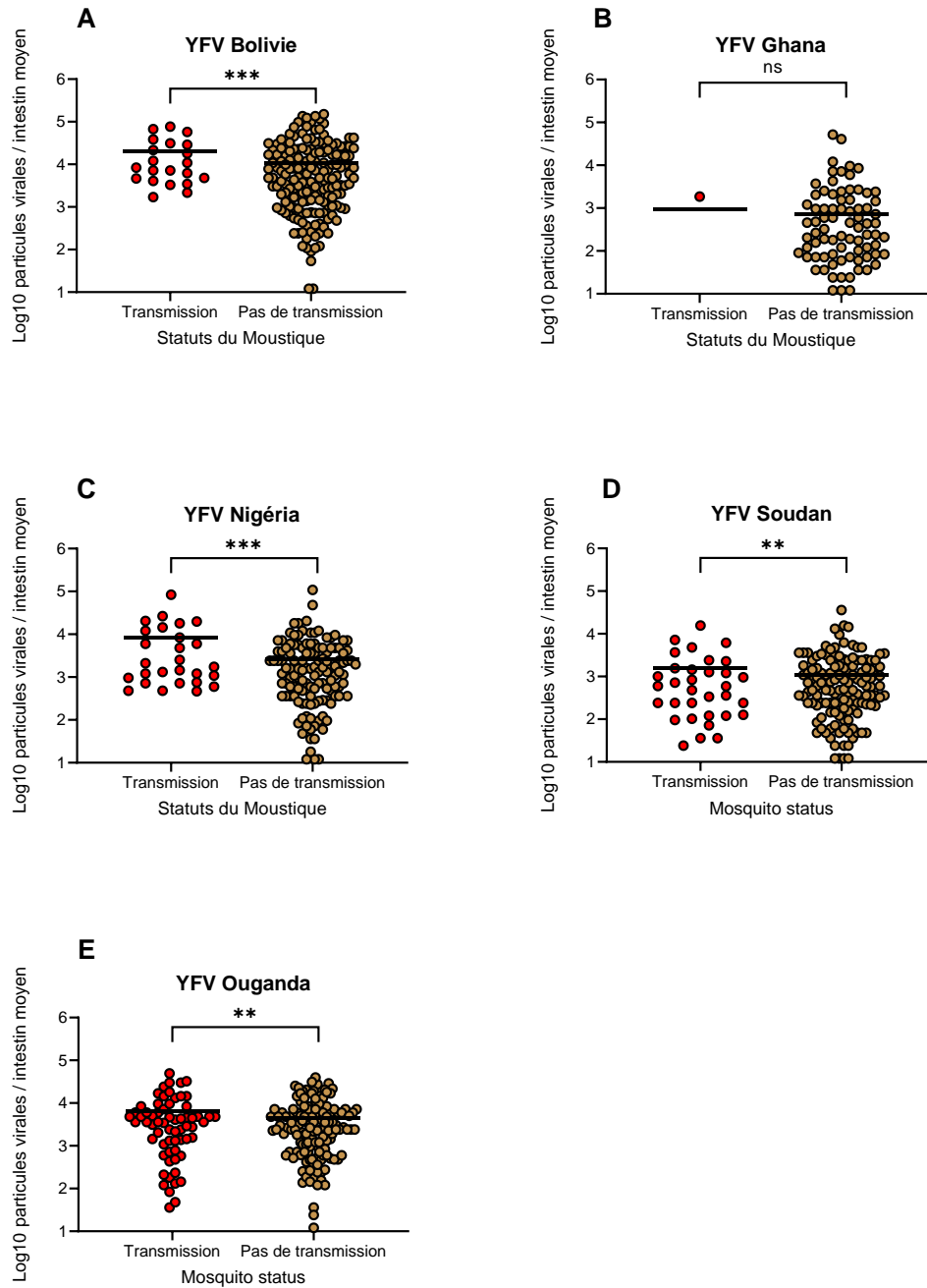


Figure 50 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de *Aedes aegypti* de Martinique en fonction du statut des moustiques (avec ou sans transmission *via* la salive), examinés 21 jours après un repas infectieux contenant YFV fourni à 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, ** $0,001 \leq p < 0,01$, *** $0,0001 \leq p < 0,001$.

Globalement, le nombre de particules virales dans l'intestin moyen des moustiques n'ayant pas transmis le virus est généralement inférieur au nombre mesuré dans la salive des moustiques ayant transmis le virus. YFV Bolivie génère le plus de particules virales quel que soit le statut du moustique.

En résumé, l'examen du nombre de particules virales dans les trois compartiments du moustique (tube digestif, carcasse, et salive) selon le statut du moustique (avec ou sans dissémination et avec ou sans transmission), 14 et 21 après infection avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL indique que :

- les moustiques présentant du virus ayant disséminé dans la carcasse ont généralement plus de particules virales dans leur tube digestif que les moustiques n'ayant pas disséminé le virus dans la carcasse ;
- les moustiques présentant du virus dans la salive ont généralement plus de particules virales dans la carcasse que les moustiques n'ayant pas transmis le virus ;
- les moustiques présentant du virus dans la salive ont généralement plus de particules virales dans leur tube digestif que les moustiques n'ayant pas de virus dans la salive ;

Partie 2 : Détermination de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe et d'Amérique pour les 5 souches de YFV

Les populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe

8.11. Détermination de la compétence vectorielle

Pour comparer les performances des moustiques de Martinique à ceux des autres îles de la Caraïbe, quatre populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe (Abymes/Guadeloupe, La Havane/Cuba, CTU/Haiti, Papin/Haiti) ont été infectées avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL. Les moustiques ont été examinés à 21 jpi.

8.11.1. Taux d'infection

A 21 jpi, les 4 populations présentent des IR qui varient en fonction du YFV utilisé (Figure 51). Avec YFV Bolivie, IR varie de 37,5% (18/48) pour CTU à 93,75% (30/32) pour Abymes, avec une différence significative de IR entre les 4 populations testées (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$). Avec YFV Ghana, IR varie de 25% pour Abymes (6/24), CTU (8/32), Papin (8/32) à 41,66% (10/24) pour La Havane, sans différence significative de IR entre les populations testées (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). Avec YFV Nigeria, IR varie de 62,5 (15/24) pour CTU à 79,16% (19/24) pour Abymes, sans différence significative de IR entre les populations testées (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). Avec YFV Soudan, IR varie de 33,33% (8/24) pour La Havane à 95,83% (23/24) pour Abymes, avec une différence significative de IR entre les 4 populations testées (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$). Avec YFV Ouganda, IR varie de 66,66% (16/24) pour Abymes à 100% (24/24) pour La Havane, avec une différence significative de IR entre les 4 populations testées (Test exact de Fisher : $p < 0,01$).

A 21 jpi, YFV Ouganda infecte mieux les 4 populations de la Caraïbe, YFV Ghana restant le virus qui infecte le moins. La population Abymes présente un IR maximum avec YFV Bolivie, Nigeria et Soudan.

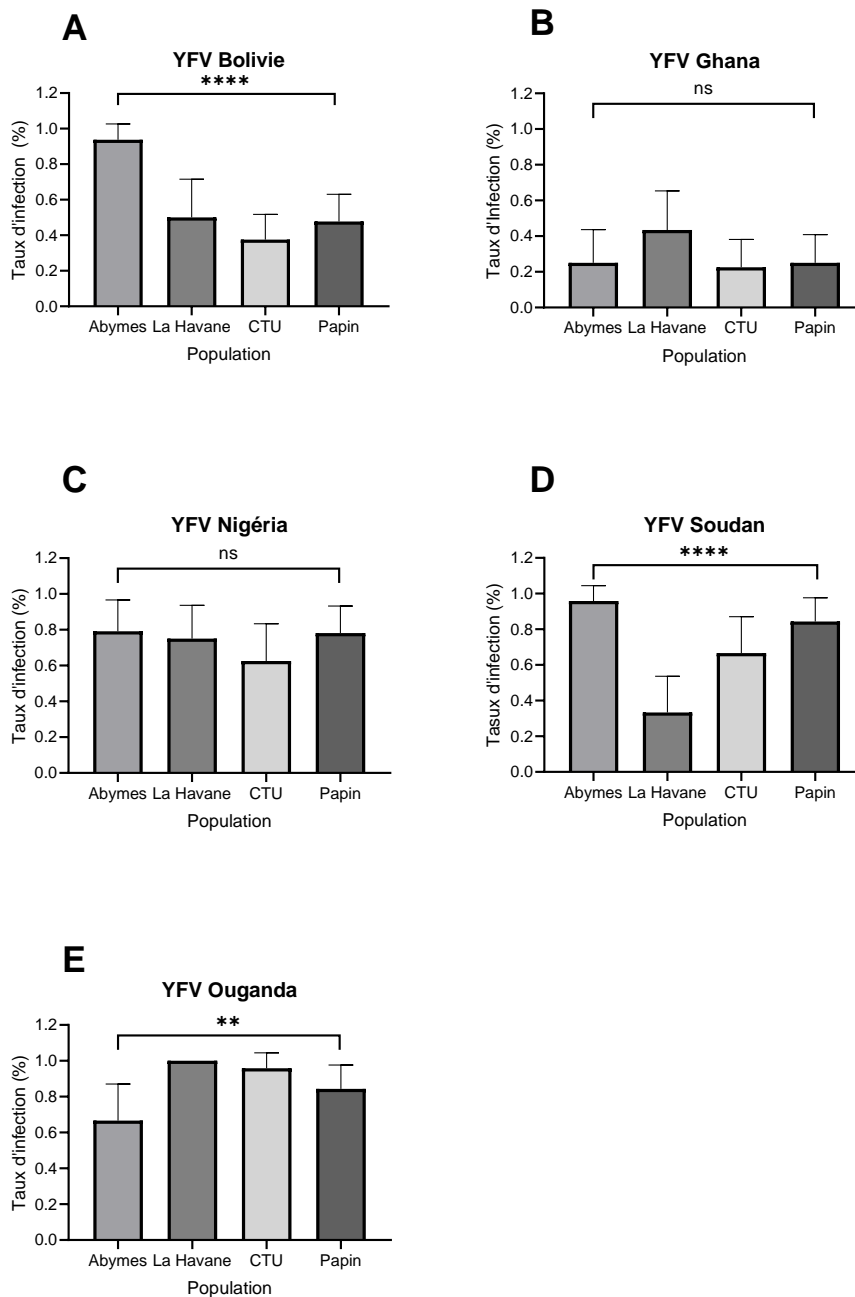


Figure 51 : Taux d'infection de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, ** $0,001 \leq p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

8.11.2. Taux de dissémination

A 21 jpi, les DR varient en fonction du YFV utilisé (Figure 52). Avec YFV Bolivie, DR varie de 50% pour La Havane (6/12) et CTU (9/18) à 83,33% (25/30) pour Abymes. Avec YFV Ghana, DR varie de 16,66% (1/6) pour Abymes à 50% pour La Havane (5/10) et Papin (4/8). Avec YFV Nigeria, DR varie de 6,66% (1/15) pour CTU à 77,77% (14/18) pour La Havane. Avec YFV Soudan, DR varie de 43,75% (7/16) pour CTU à 75% (6/8) pour La Havane. Avec YFV Ouganda, DR varie de 68,75% (11/16) pour Abymes à 100% (24/24) pour La Havane. On ne détecte pas de différence significative de DR entre les populations infectées par YFV à l'exception de YFV Nigeria (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$).

A 21 jpi, YFV Ouganda se dissémine mieux dans les moustiques de la Caraïbe. La population La Havane présente un DR maximum avec YFV Ghana, Nigeria, Soudan et Ouganda.

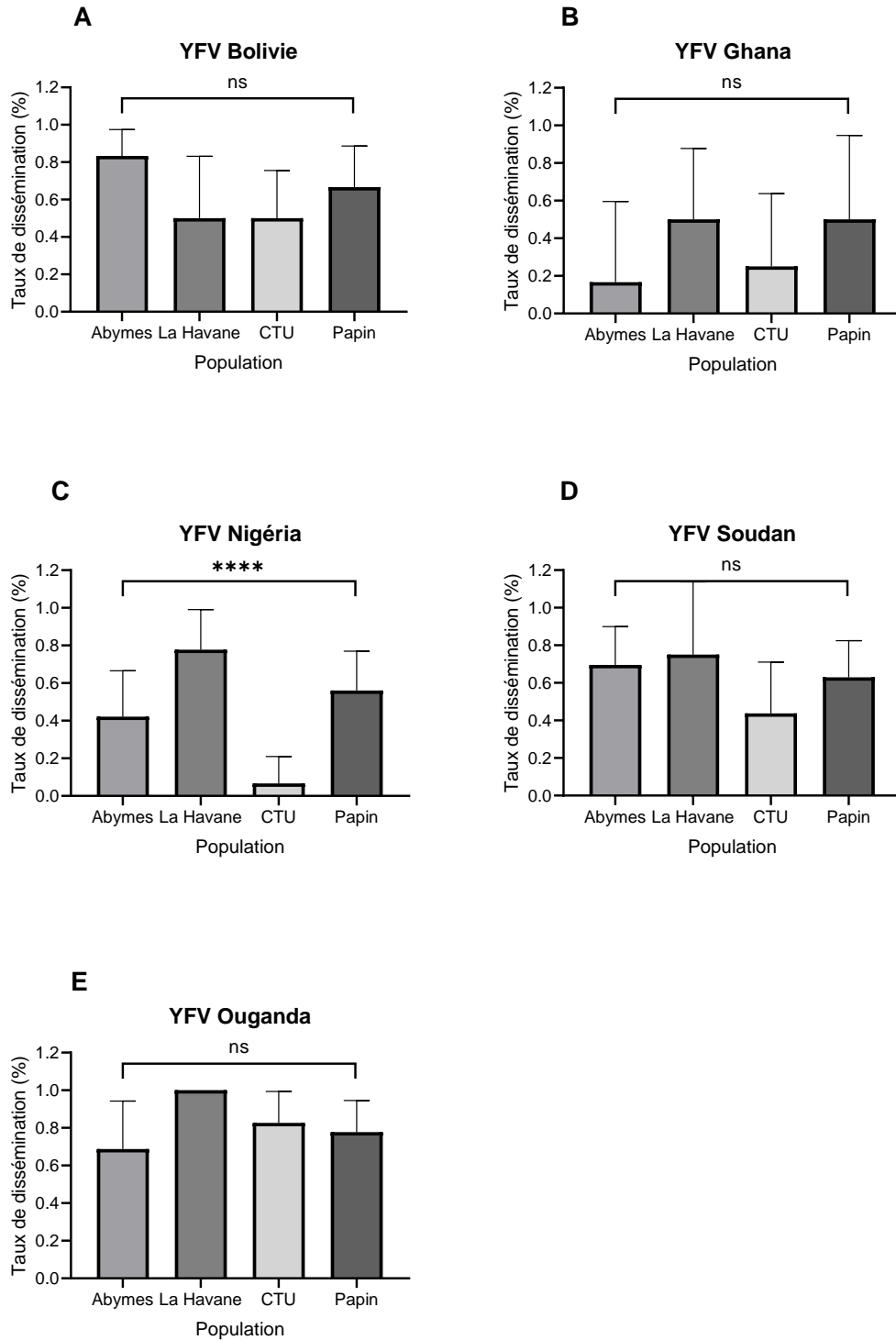


Figure 52 : Taux de dissémination de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, **** $p < 0,0001$.

8.11.3. Taux de transmission

A 21 jpi, les TR sont inférieurs à 40% (Figure 53). Avec YFV Bolivie, TR varie de 12% (3/25) pour Abymes à 35,71% (5/14) pour Papin. Avec YFV Ghana, TR varie de 0% pour Abymes (0/1), La Havane (0/5), CTU (0/2) à 25% (1/4) pour Papin. Avec YFV Nigeria, TR varie de 0% (0/1) pour CTU à 26,66% (4/15) pour La Havane. Avec YFV Soudan, TR varie de 0% (0/7) pour CTU à 16,66% (1/6) pour La Havane. Avec YFV Ouganda, TR varie de 18,18% (2/11) pour Abymes à 31,57% (6/19) pour CTU. On ne détecte pas de différence significative de TR entre les 4 populations (Test exact de Fisher : $p > 0,05$).

A 21 jpi, YFV Bolivie et Ouganda sont les virus les mieux transmis (4/4 populations) et YFV Ghana est seulement transmis par la population Papin.

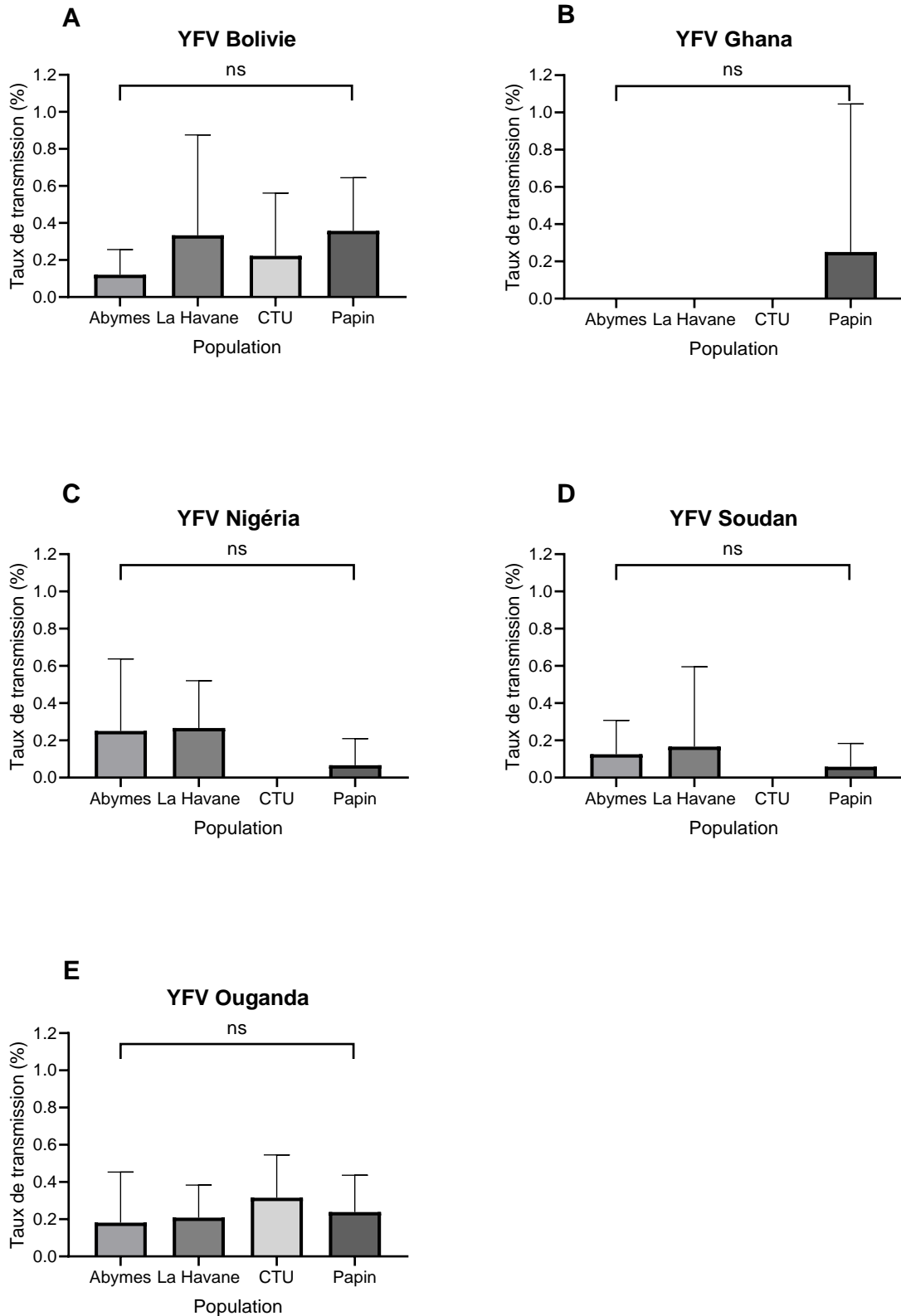


Figure 53 : Taux de transmission de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif.

En résumé, l'examen de la CV des 4 populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe, 21 jours après une infection avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL montrent que :

- YFV Ouganda et YFV Bolivie infectent, se disséminent et sont transmis par les 4 populations ;
- YFV Ghana est le virus le moins performant des 5 YFV testés et n'est transmis que par la population Papin ;
- les valeurs de TR sont plus faibles que celles des DR et les valeurs de DR restent proches de celles des IR, indiquant que les glandes salivaires jouent un rôle de barrière au virus plus important que le tube digestif.

8.12. Le nombre de particules virales détectées dans différents compartiments du moustique, *Ae. aegypti* de la Caraïbe

Le nombre de particules virales est mesuré dans le tube digestif, la carcasse et la salive, pour chaque moustique des 4 populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe, infectées avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL. Les moustiques ont été examinés à 21 jpi.

8.12.1. Le nombre de particules virales dans le tube digestif

Les 4 populations de la Caraïbe présentent un nombre moyen de particules virales dans le tube digestif qui varient en fonction du YFV utilisé (Figure 54). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen varie de 3356 (N=12) pour La Havane à 18297 (N=30) pour Abymes, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen varie de 72 (N=2) pour CTU à 870 (N=10) pour La Havane, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen varie de 1277 (N=17) pour La Havane à 8104 (N=15) pour CTU, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen varie de 525 (N=8) pour La Havane à 3871 (N=15) pour CTU, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen varie de 745 (N=16) pour Abymes à 14086 (N=23) pour CTU, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

A 21 jpi, YFV Bolivie et Ouganda présentent les plus grands nombres de particules virales dans le tube digestif et YFV Ghana, les nombres les plus faibles. La population CTU présente les nombres de particules virales les plus élevés, 21 jours après infection avec YFV Nigeria, Soudan et Ouganda.

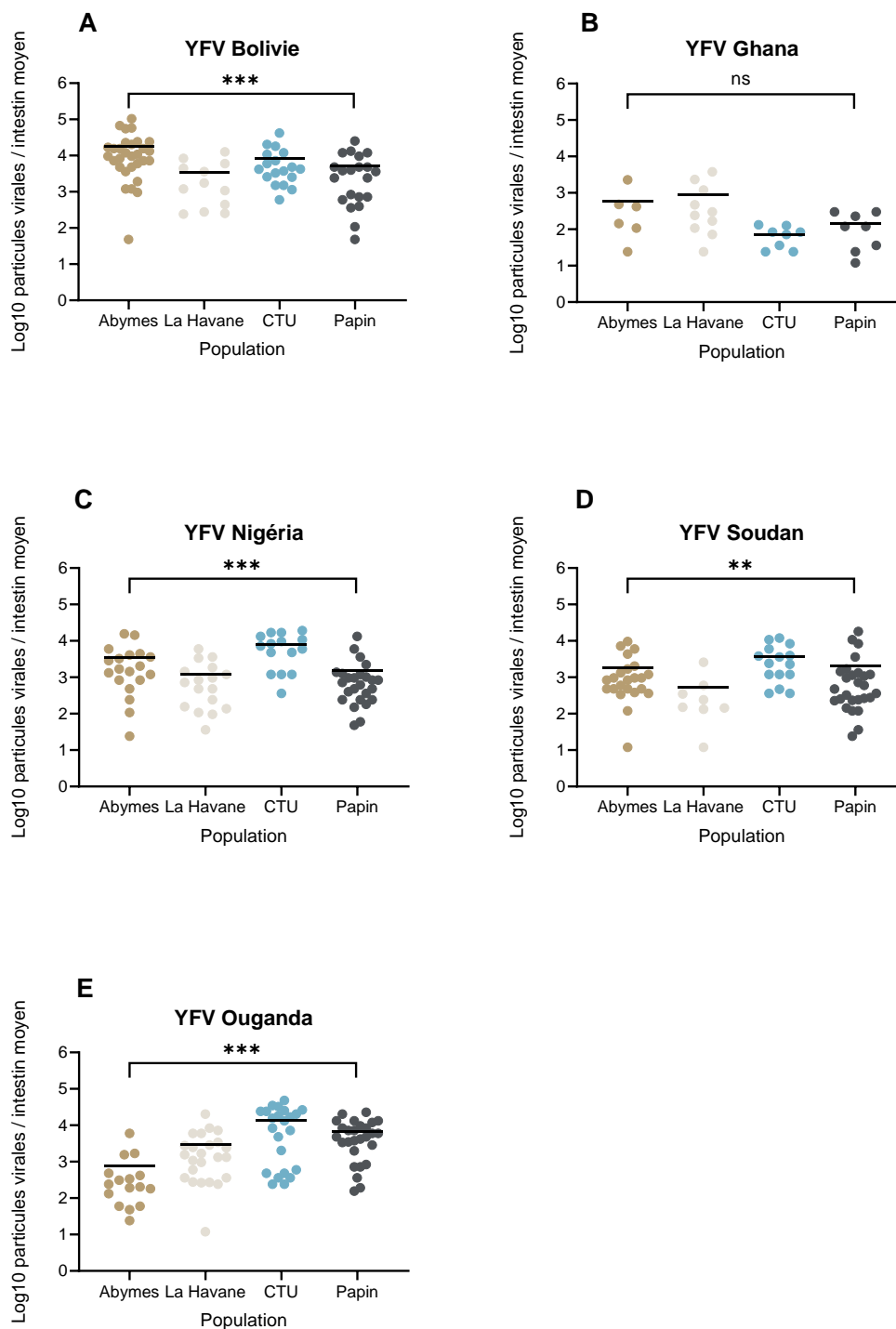


Figure 54 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de moustiques issus de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, ** $0,001 \leq p < 0,01$, *** $0,0001 \leq p < 0,001$.

8.12.2. Le nombre de particules virales dans la carcasse

Les 4 populations de la Caraïbe présentent un nombre moyen de particules virales plus élevé dans la carcasse que dans l'intestin moyen du moustique (Figure 55). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen varie de 5876 (N=9) pour CTU à 94200 (N=6) pour La Havane, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen varie de 222 (N=4) pour Papin à 885 (N=5) pour La Havane, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen varie de 372 (N=8) pour Abymes à 57465 (N=15) pour Papin, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen varie de 804 (N=16) Abymes à 22396 (N=17) pour Papin, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,01$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen varie de 540 (N=11) pour Abymes à 119708 (N=24) pour La Havane, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

A 21 jpi, YFV Bolivie et Ouganda présentent les plus grands nombres de particules virales dans la carcasse et YFV Ghana, les nombres les plus faibles. La population La Havane présente les nombres de particules virales les plus élevés, 21 jours après infection avec YFV Bolivie, Ghana et Ouganda. La population Papin présente les nombres de particules virales les plus élevés après infection avec YFV Nigeria et Soudan.

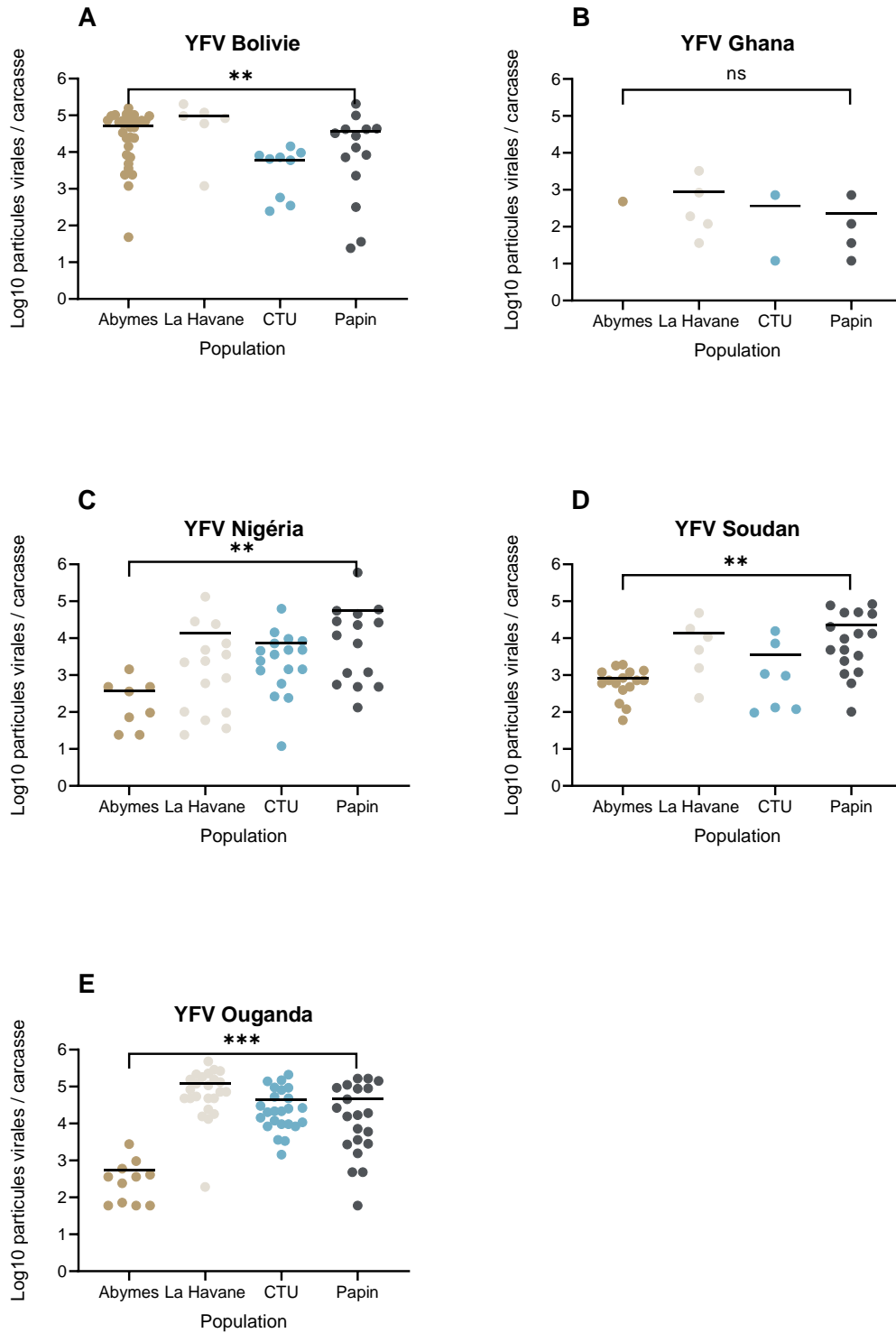


Figure 55 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la carcasse de moustiques issus de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, ** $0,001 \leq p < 0,01$, *** $0,0001 \leq p < 0,001$.

8.12.3. Le nombre de particules virales dans la salive

Les 4 populations de la Caraïbe présentent un nombre moyen de particules virales dans la salive qui est très faible (Figure 56). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen varie de 8 (N=2) pour CTU à 100 (N=3) pour Abymes. Avec YFV Ghana, un seul moustique de Papin délivre 14 particules virales dans la salive. Avec YFV Nigeria, le nombre moyen varie de 2 (N=1) pour Papin à 64 (N=4) pour La Havane. Avec YFV Soudan, le nombre moyen varie de 6 (N=1) pour La Havane à 200 (N=1) pour Papin. Avec YFV Ouganda, le nombre moyen varie de 68 (N=5) pour La Havane à 3808 (N=5) pour Papin. On ne détecte pas de différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$).

A 21 jpi, le nombre de particules virales dans la salive est faible et varie très peu entre populations pour un même virus. YFV Ouganda présente les plus grands nombres de particules virales dans la salive et YFV Ghana, les nombres les plus faibles. La population Papin présente les nombres de particules virales les plus élevés, 21 jours après infection avec YFV Soudan et Ouganda.

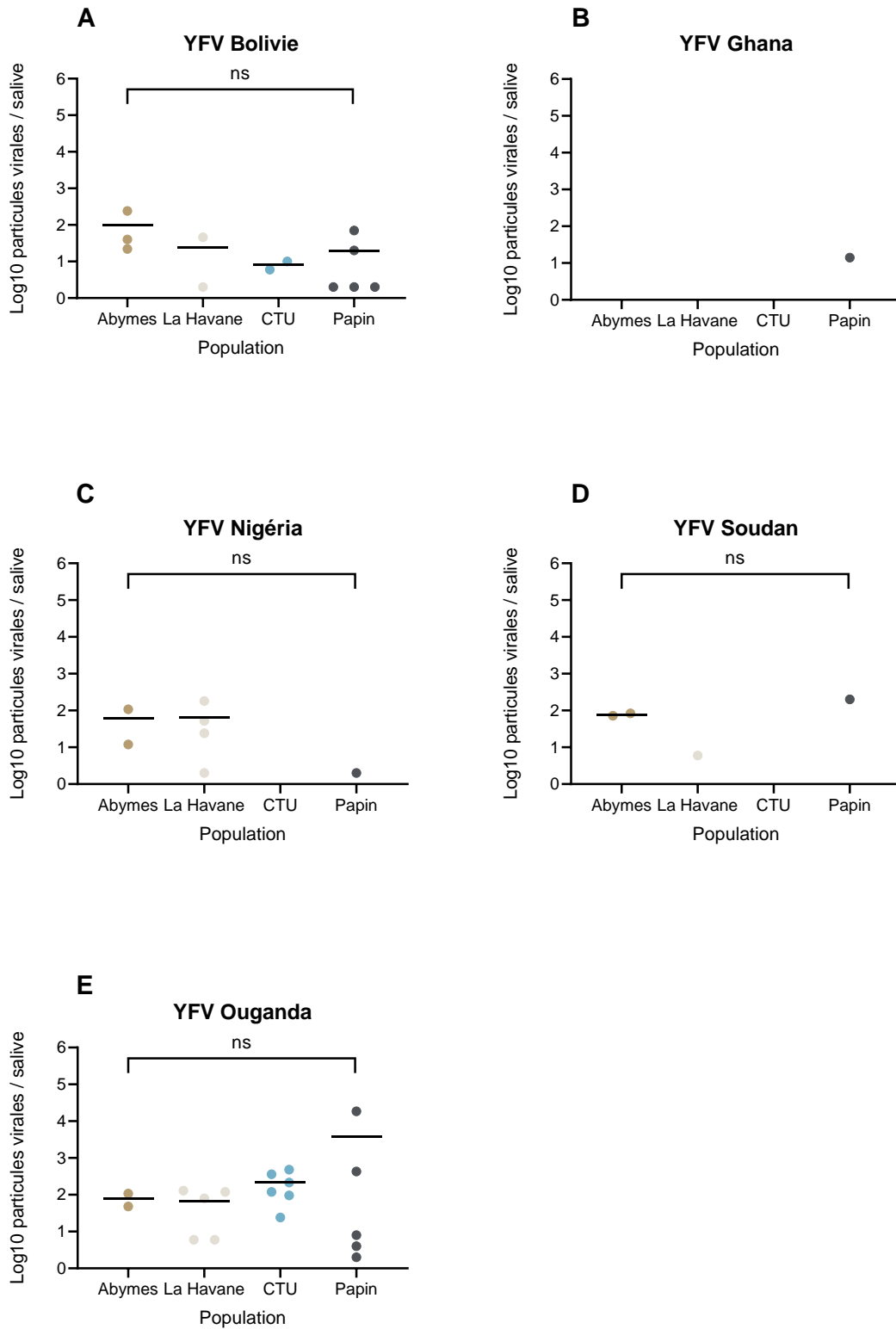


Figure 56 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la salive de moustiques issus de 4 populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E).

En résumé, l'examen du nombre de particules virales dans le tube digestif, carcasse, et salive des moustiques de 4 populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe, 21 jours après infection avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL indiquent que :

- YFV Bolivie et Ouganda présentent les plus grands nombres de particules virales et YFV Ghana, les nombres les plus faibles dans le tube digestif et la carcasse ;
- pour un même virus, le nombre de particules virales dans le tube digestif et la carcasse varie d'une population à l'autre alors que le nombre de particules virales dans la salive varie très peu ;
- YFV Ouganda présente les plus grands nombres de particules virales dans la salive et YFV Ghana, les nombres les plus faibles.

Les populations d'*Ae. aegypti* d'Amérique

8.13. Détermination de la compétence vectorielle

Pour réaliser une comparaison de compétence vectorielle avec les populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe, deux populations d'*Ae. aegypti* d'Amérique ont été ajoutées dans les analyses : Gainesville/Floride/USA et Nor-Oriental/Colombie. Les moustiques ont été infectés avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL et examinés à 21 jpi.

8.13.1. Taux d'infection

A 21 jpi, les 2 populations présentent des IR qui varient en fonction du YFV utilisé (Figure 57). Avec YFV Bolivie, IR est de 67,5% (27/40) pour Gainesville qui est significativement supérieur à 45,83% (11/24) pour Nor-Oriental (Test exact de Fisher : $p < 0,05$). Avec YFV Ghana, IR est de 11,53% (3/26) pour Gainesville et 16,66% (4/24) pour Nor-Oriental, sans différence significative de IR entre les 2 populations (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). Avec YFV Nigeria, IR est de 92,59% (25/27) pour Gainesville qui est significativement supérieur à 46,66% (7/15) pour Nor-Oriental (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$). Avec YFV Soudan, IR est

de 66,66% (18/27) pour Gainesville et 52,17 (12/23) pour Nor-Oriental, sans différence significative de IR entre les 2 populations (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). Avec YFV Ouganda, IR est de 93,33% (28/30) pour Gainesville qui est significativement supérieur à 50% (12/24) pour Nor-Oriental (Test exact de Fisher : $p < 0,0001$).

A 21 jpi, YFV Nigeria et Ouganda infectent mieux les 2 populations, YFV Ghana restant le virus qui infecte le moins. De plus, la population Gainesville s'infecte mieux avec YFV que Nor-Oriental.

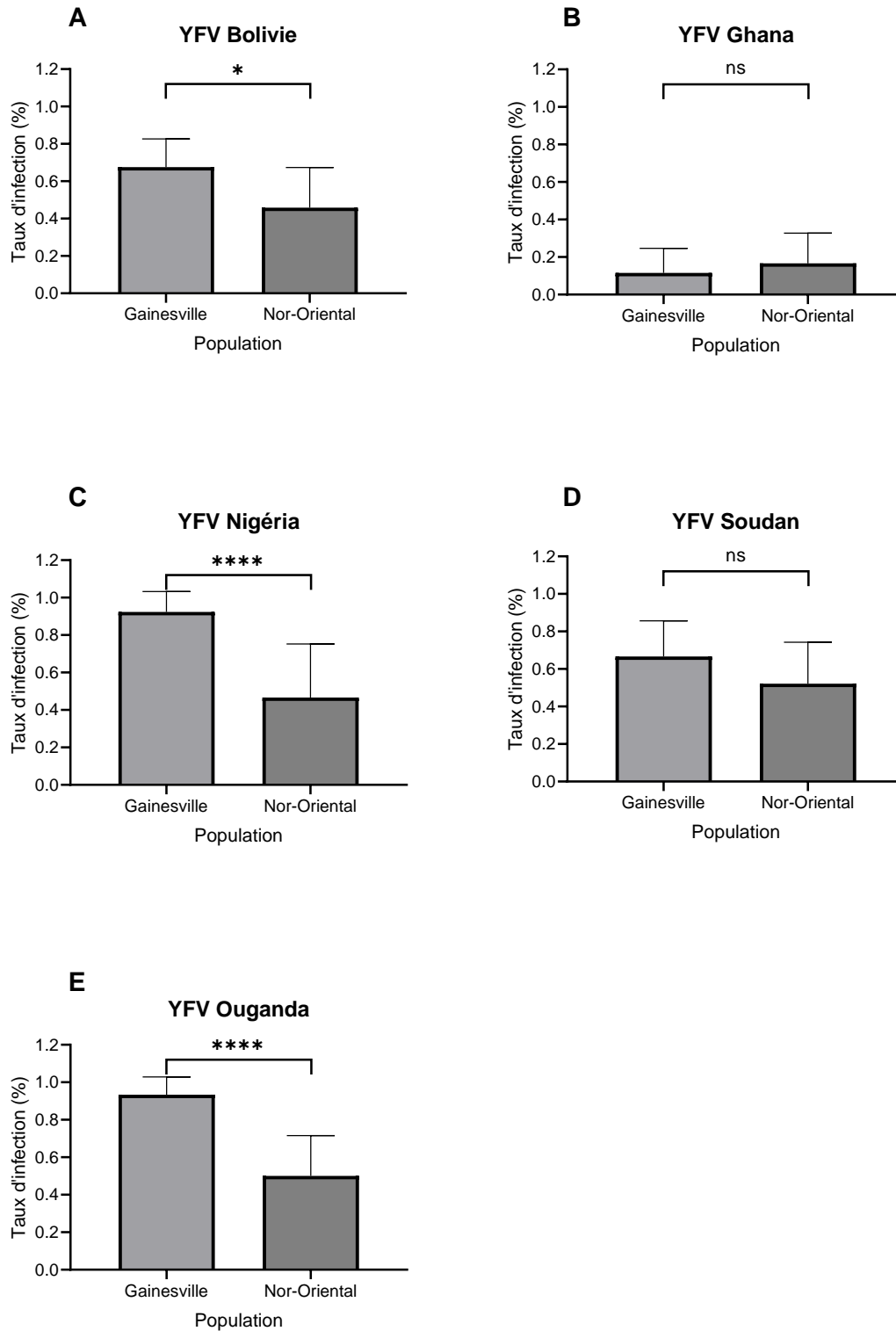


Figure 57 : Taux d'infection de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, $* 0,01 \leq p < 0,05$, $**** p < 0,0001$.

8.13.2. Taux de dissémination

A 21 jpi, les DR varient en fonction du YFV utilisé (Figure 58). Avec YFV Bolivie, DR est de 66,66% (18/27) pour Gainesville et 45,45% (5/11) pour Nor-Oriental. Avec YFV Ghana, DR est de 33,33% (1/3) pour Gainesville et 50% (2/4) pour Nor-Oriental. Avec YFV Nigeria, DR est de 40% (10/25) pour Gainesville et 57,14% (4/7) pour Nor-Oriental. Avec YFV Soudan, DR est de 50% (9/18) pour Gainesville et 33,33% (4/12) pour Nor-Oriental. Avec YFV Ouganda, DR est de 53,57% (15/28) pour Gainesville et 100% (12/12) pour Nor-Oriental. On ne détecte pas de différence significative de DR entre les 2 populations infectées par YFV à l'exception de YFV Ouganda où Nor-Oriental dissémine mieux le virus que Gainesville (Test exact de Fisher : $p < 0,01$).

A 21 jpi, les 2 populations d'Amérique disséminent les 5 YFV de façon équivalente à l'exception de YFV Ouganda où Nor-Oriental assure une meilleure dissémination que Gainesville.

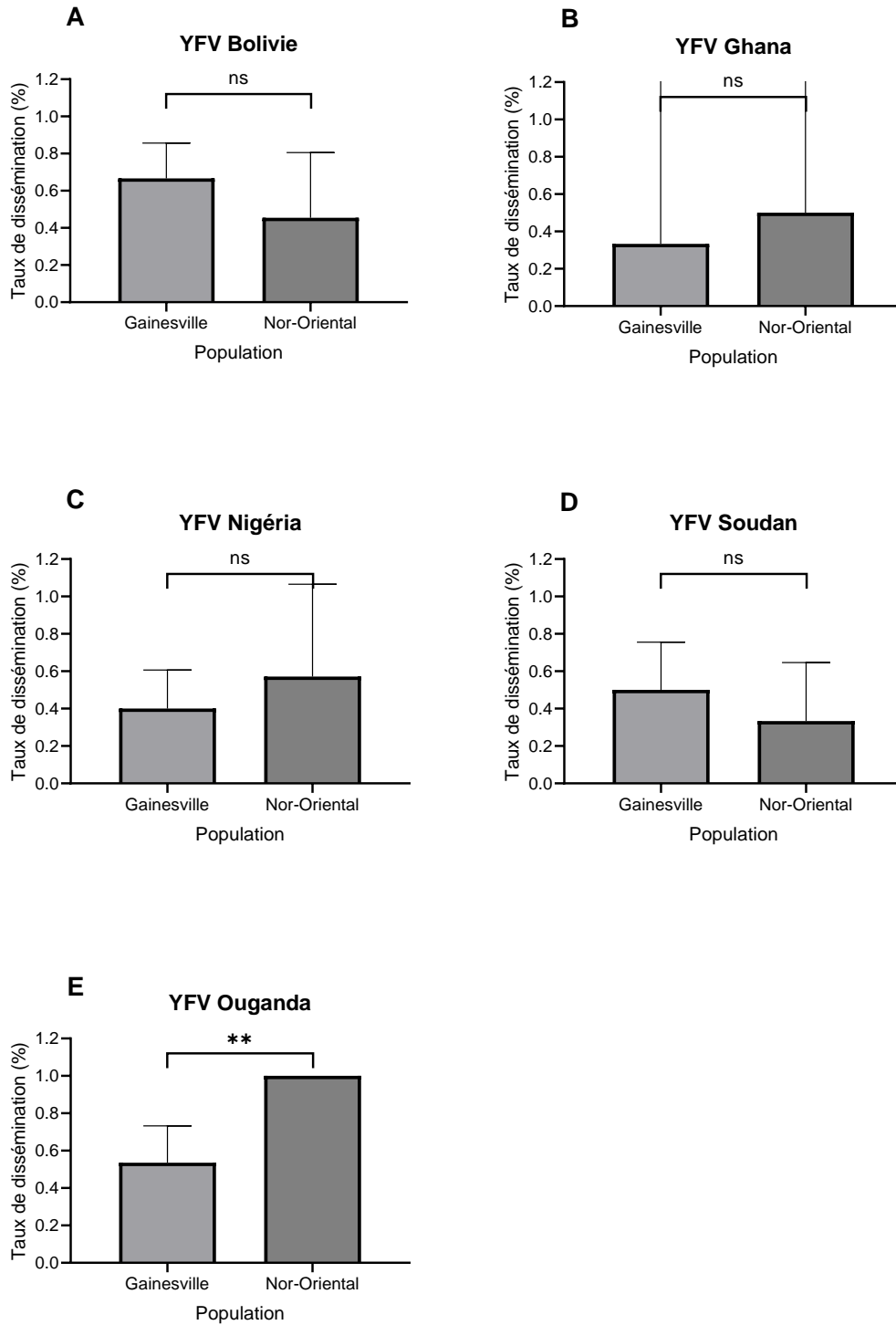


Figure 58 : Taux de dissémination de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, ** $0,001 \leq p < 0,01$.

8.13.3. Taux de transmission

A 21 jpi, les TR sont inférieurs à 30% (Figure 59). Avec YFV Bolivie, TR est de 27,77% (5/18) pour Gainesville et 20% (1/5) pour Nor-Oriental. Avec YFV Ghana, TR est de 0% pour les 2 populations. Avec YFV Nigeria, TR est de 0% (0/10) pour Gainesville et 25% (1/4) pour Nor-Oriental. Avec YFV Soudan, TR est de 0% pour les 2 populations. Avec YFV Ouganda, TR est de 6,66% (1/15) pour Gainesville et 8,33% (1/12) pour Nor-Oriental. On ne détecte pas de différence significative de TR entre les 2 populations (Test exact de Fisher : $p > 0,05$).

A 21 jpi, YFV Bolivie est le mieux transmis des 5 YFV suivi par YFV Ouganda. YFV Nigeria n'est transmis que par Nor-Oriental. YFV Ghana et Soudan ne sont pas transmis par les 2 populations.

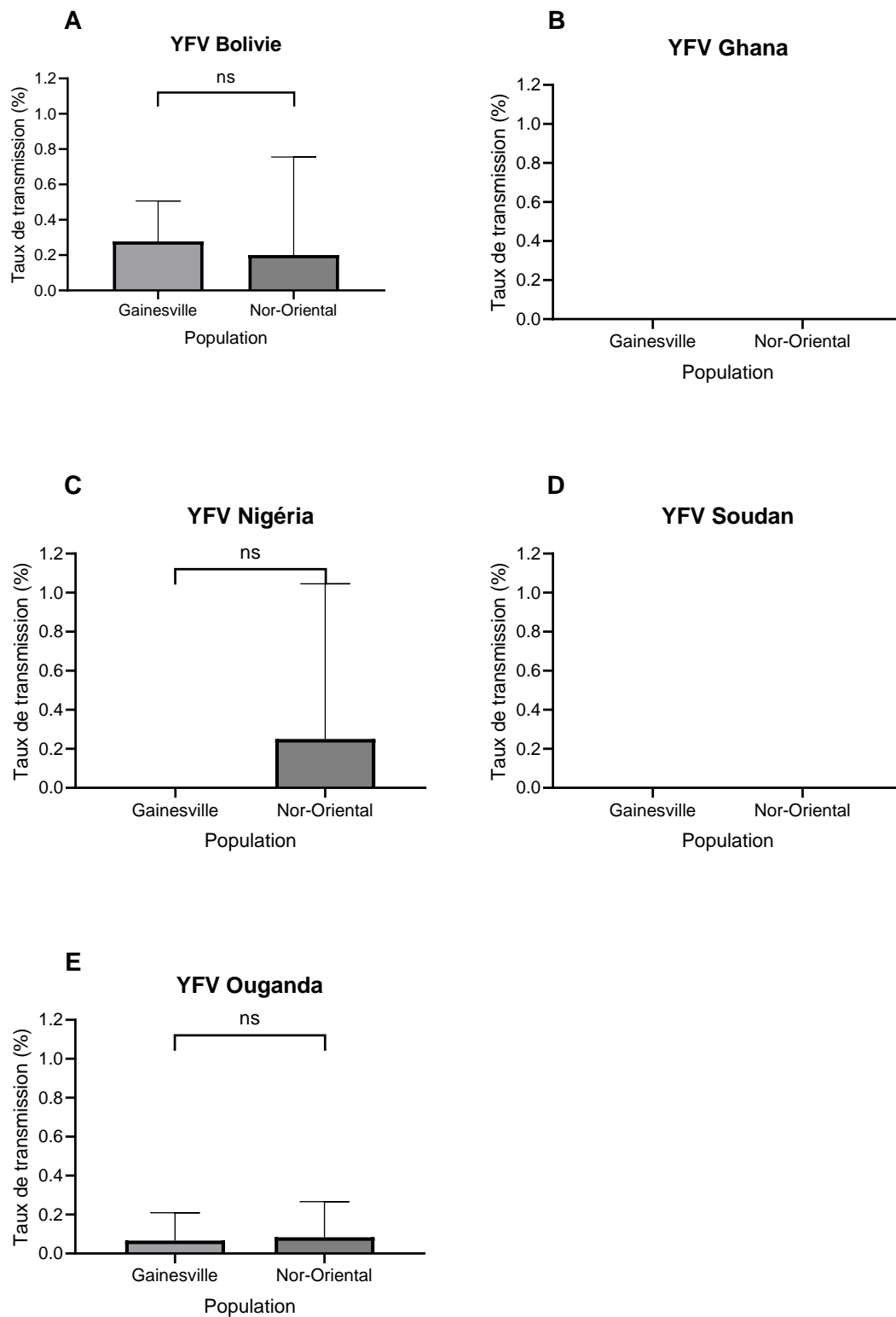


Figure 59 : Taux de transmission de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif.

En résumé, l'examen de la CV des 2 populations d'*Ae. aegypti* d'Amérique, 21 jours après une infection avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL montrent que :

- YFV Bolivie et Ouganda infectent, se disséminent et sont transmis ;
- YFV Ghana et Soudan infectent, se disséminent mais ne sont pas transmis ;
- YFV Nigeria infecte, se dissémine et est transmis seulement par Nor-Oriental ;
- Les populations Gainesville et Nor-Oriental transmettent bien YFV Bolivie.

8.14. Le nombre de particules virales détectées dans différents compartiments du moustique, *Ae. aegypti* d'Amérique

Le nombre de particules virales est mesuré dans le tube digestif, la carcasse et la salive de chaque moustique des deux populations d'*Ae. aegypti* (Gainesville et Nor-Oriental) infectées avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL. Les moustiques ont été examinés à 21 jpi.

8.14.1. Le nombre de particules virales dans le tube digestif

Les 2 populations d'Amérique présentent un nombre moyen de particules virales dans le tube digestif qui varie en fonction du YFV utilisé (Figure 60). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 8539 (N=27) pour Gainesville et 2650 (N=11) pour Nor-Oriental, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen est de 888 (N=3) pour Gainesville et 1332 (N=4) pour Nor-Oriental, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 891 (N=25) pour Gainesville et 3084 (N=7) pour Nor-Oriental, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 847 (N=18) pour Gainesville et 1004 (N=12) pour Nor-Oriental, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 315 (N=28) pour Gainesville et 10948 (N=12) pour Nor-Oriental, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,001$).

A 21 jpi, le nombre de particules virales dans le tube digestif des moustiques est comparable entre Gainesville et Nor-Oriental avec deux exceptions : la population Nor-Oriental qui présente en moyenne plus de particules virales dans le tube digestif des moustiques infectés avec YFV Soudan et Ouganda, par rapport à Gainesville.

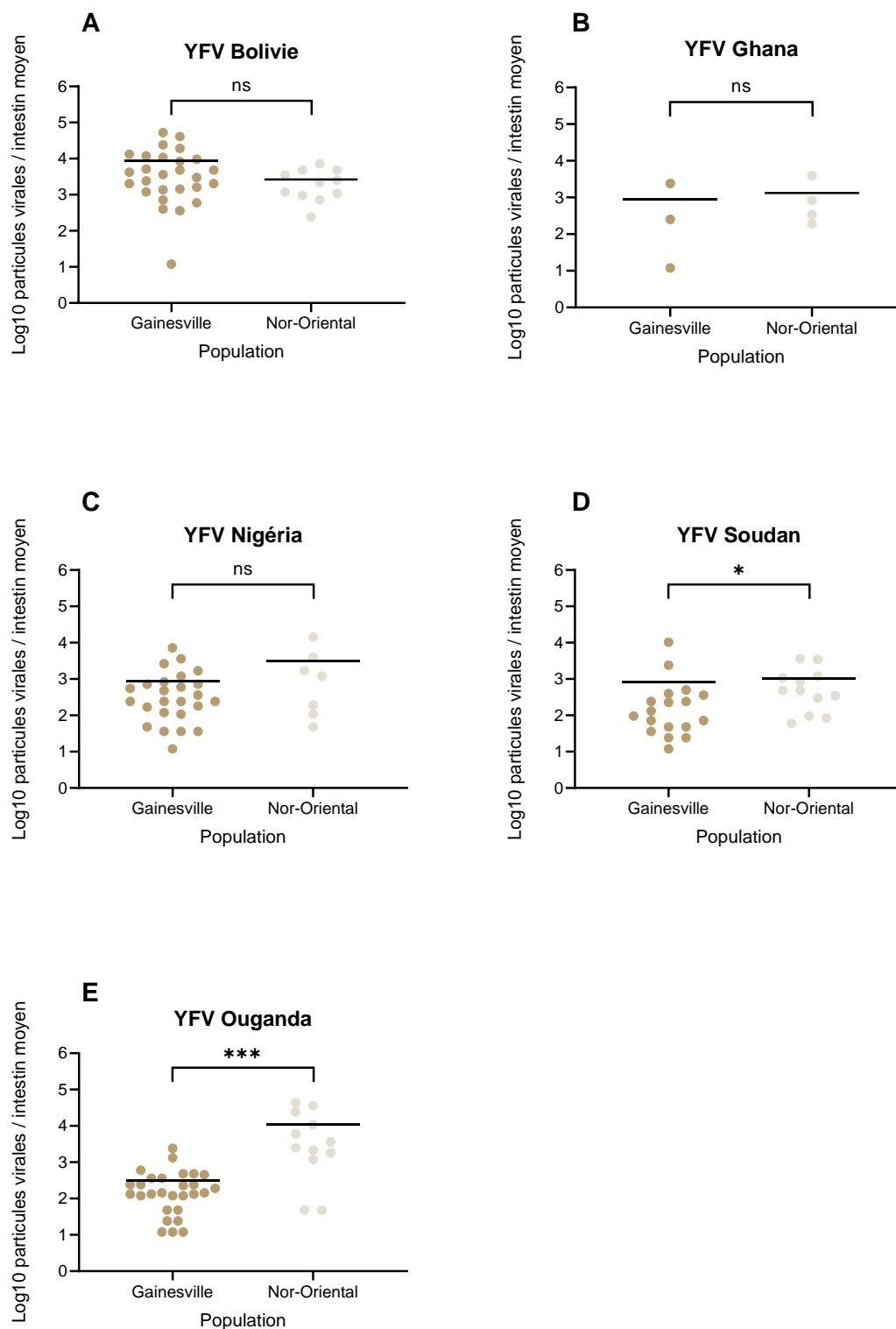


Figure 60 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen de moustiques issus de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, * $0,01 \leq p < 0,05$, *** $0,0001 \leq p < 0,001$.

8.14.2. Le nombre de particules virales dans la carcasse

Les deux populations d'Amérique présentent un nombre moyen de particules virales plus élevé dans la carcasse que dans l'intestin moyen du moustique (Figure 61). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 42805 (N=18) pour Gainesville et 48249 (N=5) pour Nor-Oriental. Avec YFV Ghana, le nombre moyen est de 36 (N=1) pour Gainesville et 2568 (N=2) pour Nor-Oriental. Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 7140 (N=10) pour Gainesville et 2706 (N=4) pour Nor-Oriental. Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 2616 (N=10) pour Gainesville et 6030 (N=4) pour Nor-Oriental. Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 1573 (N=14) pour Gainesville et 2699 (N=12) pour Nor-Oriental. On ne détecte pas de différence significative dans le nombre moyen de particules virales dans la carcasse entre les 2 populations pour l'ensemble des YFV (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$) à l'exception de YFV Ouganda (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,01$).

A 21 jpi, le nombre de particules virales dans la carcasse des moustiques est comparable entre Gainesville et Nor-Oriental avec une exception, la population Nor-Oriental qui présente davantage de particules virales dans la carcasse des moustiques infectés avec YFV Ouganda, par rapport à Gainesville.

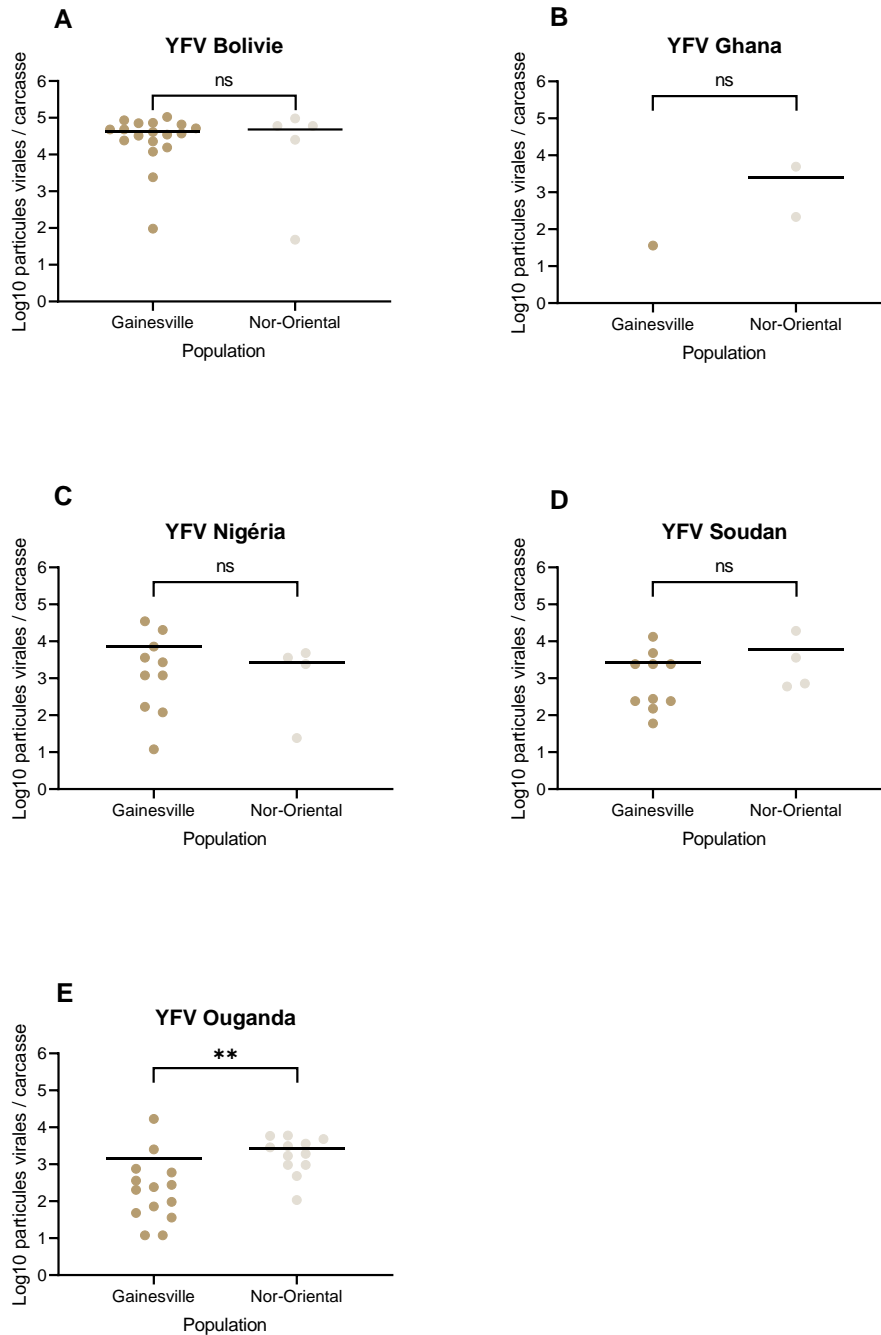


Figure 61 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la carcasse de moustiques issus de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, ** 0,001 ≤ p < 0,01.

8.14.3. Le nombre de particules virales dans la salive

Les 2 populations d'Amérique présentent un nombre moyen faible de particules virales dans la salive (Figure 62). Seuls 9 moustiques présentent une salive infectée. Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 59 (N=5) pour Gainesville et 12 (N=1) pour Nor-Oriental. Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 8 (N=1) pour Nor-Oriental. Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 3 (N=1) pour Gainesville et 2 (N=1) pour Nor-Oriental. Avec YFV Ghana et YFV Soudan, aucun moustique ne présente de virus dans la salive.

A 21 jpi, le nombre de particules virales dans la salive est faible et comparable entre les 2 populations.

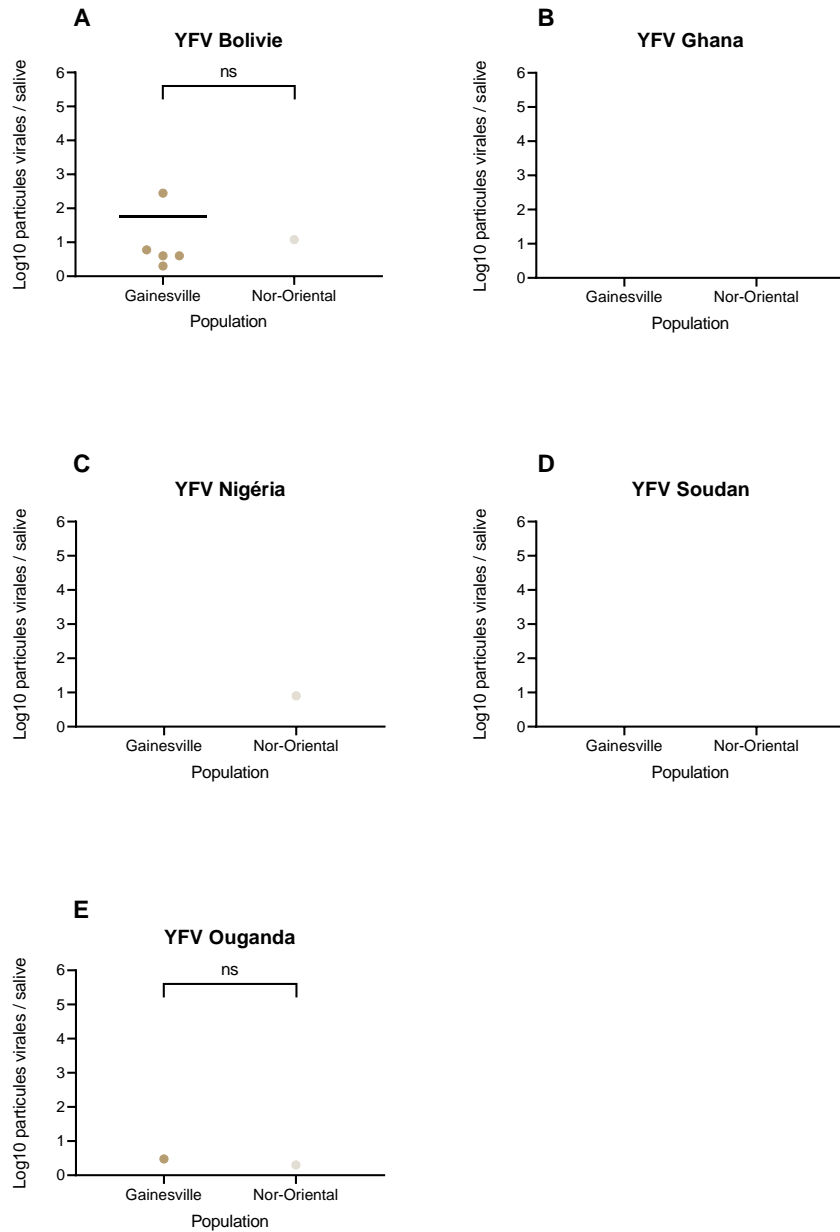


Figure 62 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans la salive de moustiques issus de 2 populations d'*Aedes aegypti* d'Amérique examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif.

En résumé, l'examen du nombre de particules virales dans le tube digestif, carcasse, et salive des moustiques de 2 populations d'*Ae. aegypti* d'Amérique, 21 jours après infection avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL indiquent que :

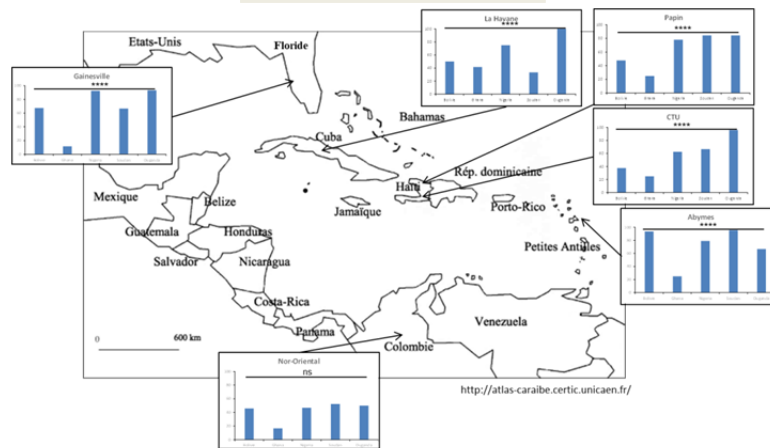
- Pour 4 YFV (Bolivie, Ghana, Nigeria et Soudan), les 2 populations présentent des nombres comparables de particules virales dans le tube digestif, la carcasse et la salive ;
- pour YFV Ouganda, Nor-Oriental présente plus de particules virales que Gainesville dans le tube digestif et la carcasse ;
- le nombre de particules virales dans la salive est faible et comparable entre les 2 populations.

Comparaisons des 6 populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe et d'Amérique

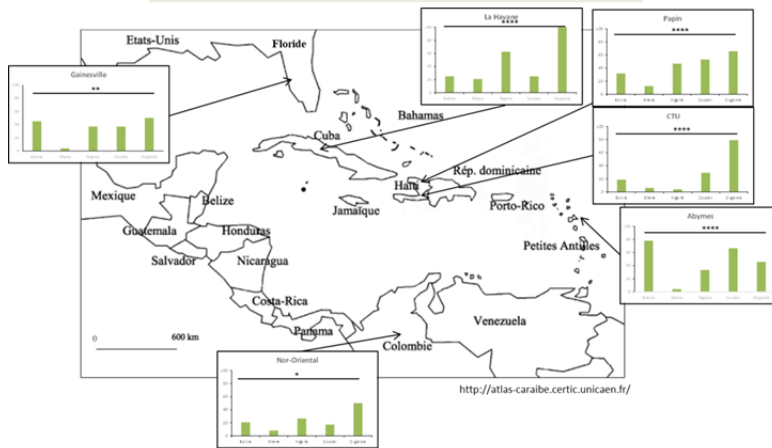
L'infection (IR), la dissémination (DE) et la transmission (TE) à 21 jpi sont présentés pour l'ensemble des moustiques testés. La figure 63 montre que :

- toutes les populations s'infectent avec les 5 virus;
- toutes les populations assurent la dissémination des 5 YFV ;
- la transmission des 5 YFV est très faible voire nulle ;
- YFV Bolivie et Ouganda sont transmis par les 6 populations ;
- YFV Ghana n'est transmis que par Papin ;
- YFV Nigeria n'est pas transmis par Gainesville et CTU ;
- YFV Soudan n'est pas transmis par Gainesville, Nor-Oriental et CTU;
- La Havane est la population la plus performante alors Gainesville est la moins performante.

Taux d'infection



Efficacité de dissémination



Efficacité de transmission

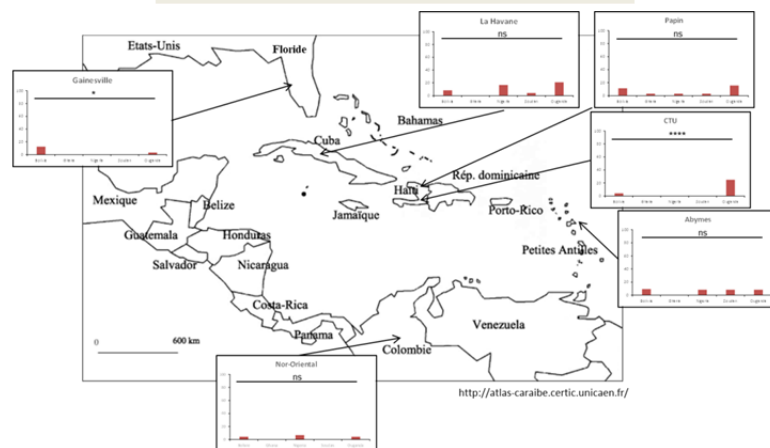


Figure 63 : Taux d'infection, efficacité de dissémination et efficacité de transmission de 6 populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe et d'Amérique vis-à-vis de 5 YFV (Bolivie, Ghana, Nigéria, Soudan, Ouganda). Les moustiques sont examinés 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Test exact de Fisher : ns non significatif, * $0,01 \leq p < 0,05$, ** $0,001 \leq p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

Partie 3 : Différence de compétence vectorielle entre *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*

Pour déterminer si deux espèces vivant en sympatrie pouvaient contribuer à la transmission de la fièvre jaune, une population d'*Ae. aegypti* et une population d'*Ae. albopictus* récoltées toutes deux à Papin (Port-à-Piment, Haïti) ont été infectées à un titre de 10^7 ffu/mL. Les moustiques ont été infectés avec YFV Bolivie et examinés à 14 et 21 jpi. Pour les quatre autres YFV, les moustiques ont seulement été examinés à 21 jpi.

Infection, dissémination et transmission

8.15. A 14 jours post-infection

A 14 jpi, les 2 espèces sont infectées qu'avec YFV Bolivie (Figure 64) ; IR est de 46,66% (21/45) pour *Ae. aegypti* et 25% (8/32) pour *Ae. albopictus*, sans différence significative de IR (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). DR est de 52,38% (11/21) pour *Ae. aegypti* et 62,5% (5/8) pour *Ae. albopictus*, sans différence significative de DR (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). Enfin, seuls *Ae. albopictus* sont capables de transmettre avec un TR de 20% (1/5).

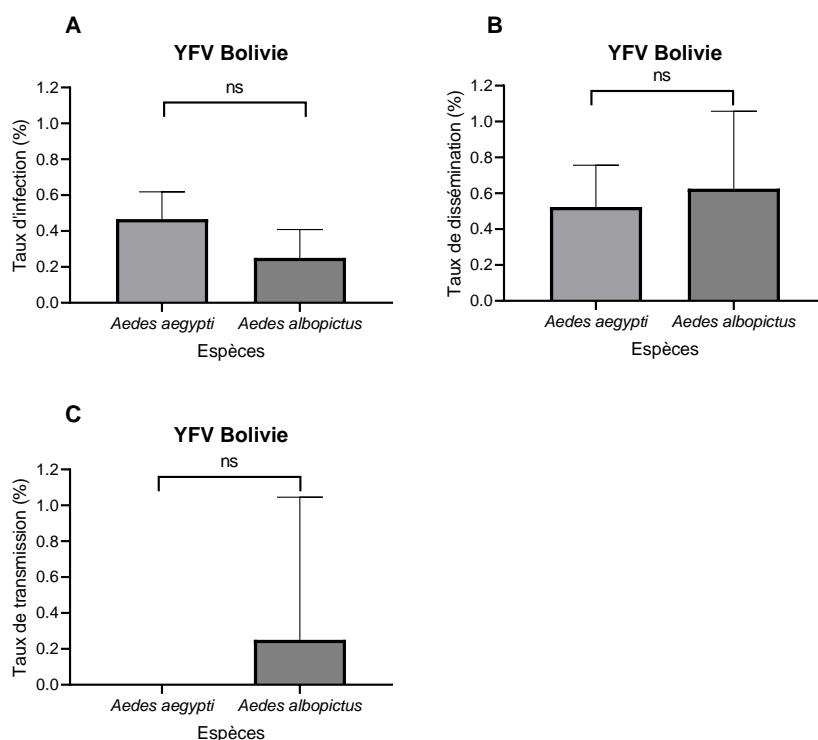


Figure 64 : Taux d'infection (A), dissémination (B) et transmission (C) des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 14 jours après un repas infectieux contenant YFV Bolivie, fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Test exact de Fisher : ns non significatif.

8.16. A 21 jours post-infection

A 21 jpi, les 2 espèces sont infectées avec les 5 virus (Bolivie, Ghana, Nigeria, Soudan et Ouganda).

8.16.1. Taux d'infection

Les 2 espèces présentent des IR qui varient en fonction du YFV utilisé (Figure 65). Avec YFV Bolivie, IR est de 47,72% (21/44) pour *Ae. aegypti* qui est significativement supérieur à 21,87% (7/32) pour *Ae. albopictus* (Test exact de Fisher : $p < 0,05$). Avec YFV Ghana, IR est de 25% (8/32) pour *Ae. aegypti* et 7,4% (2/27) pour *Ae. albopictus*, sans différence significative de IR (Test exact de Fisher : $p > 0,05$). Avec YFV Nigeria, IR est de 78,12% (25/32) pour *Ae. aegypti* qui est significativement supérieur à 29,16% (7/24) pour *Ae. albopictus* (Test exact de Fisher : $p < 0,001$). Avec YFV Soudan, IR est de 84,37% (27/32) pour *Ae. aegypti* qui est significativement supérieur à 33,33% (8/24) pour *Ae. albopictus* (Test

exact de Fisher : $p > 0,001$). Avec YFV Ouganda, IR est de 84,37% (27/32) pour *Ae. aegypti* qui est significativement supérieur à 58,33% (14/24) pour *Ae. albopictus* (Test exact de Fisher : $p < 0,05$).

A 21 jpi, *Ae. aegypti* s'infecte presque 2 fois plus qu'*Ae. albopictus*. Les IR les plus élevés pour *Ae. aegypti* sont obtenus après infection avec YFV Nigeria, Soudan et Ouganda.

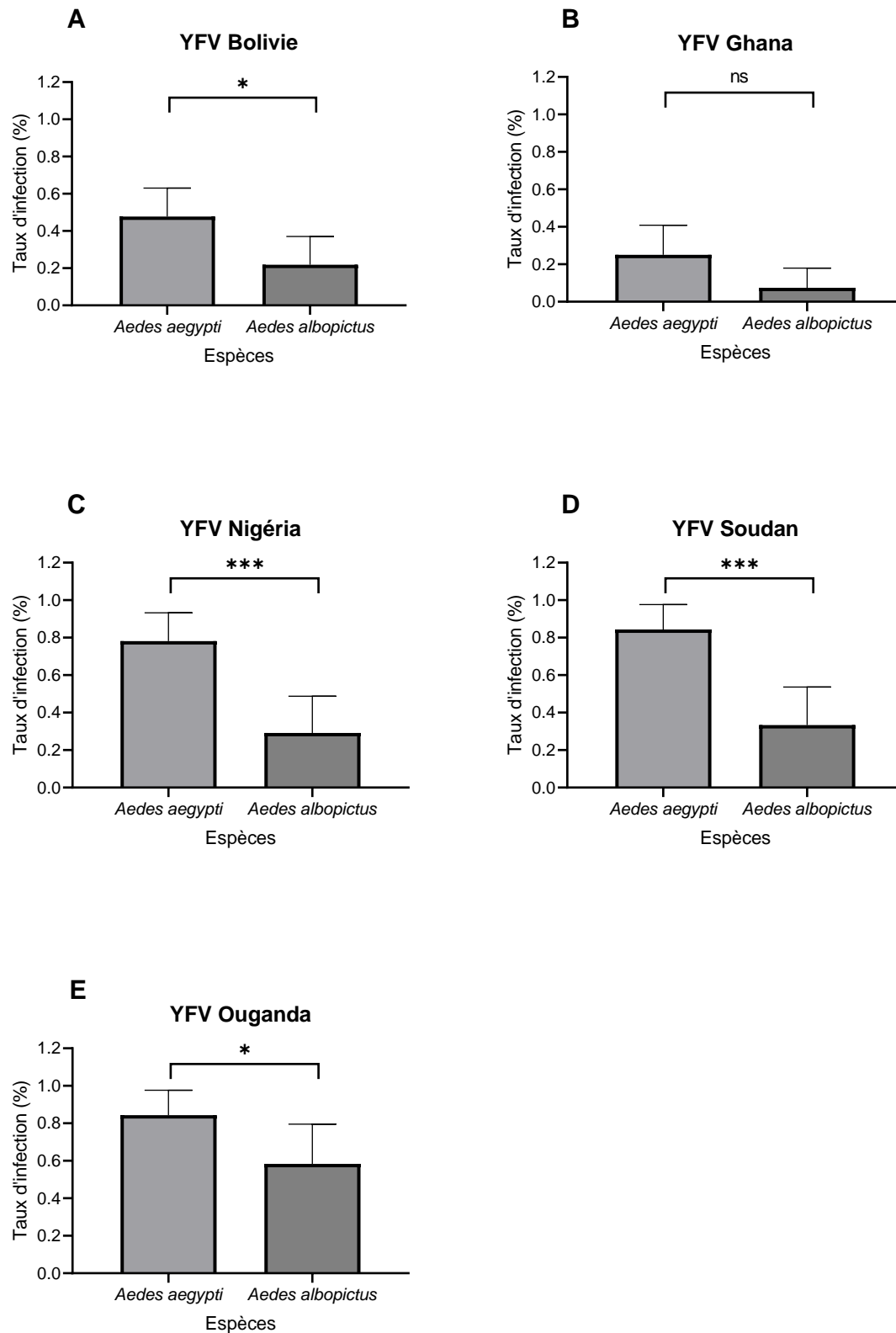


Figure 65 : Taux d'infection des moustiques, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, * $0,01 \leq p < 0,05$, *** $0,0001 \leq p < 0,001$.

8.16.2. Taux de dissémination

A 21 jpi, les 2 espèces présentent des DR qui varient en fonction du YFV utilisé (Figure 66). Avec YFV Bolivie, DR est de 66,66% (14/21) pour *Ae. aegypti* et 71,42% (5/7) pour *Ae. albopictus*. Avec YFV Ghana, DR est de 50% (4/8) pour *Ae. aegypti* et 0% (0/2) pour *Ae. albopictus*. Avec YFV Nigeria, DR est de 56% (14/25) pour *Ae. aegypti* qui est significativement inférieur à 100% (7/7) pour *Ae. albopictus* (Test exact de Fisher : $p < 0,05$). Avec YFV Soudan, DR est de 62,96% (17/27) pour *Ae. aegypti* et 62,5% (5/8) pour *Ae. albopictus*. Avec YFV Ouganda, DR est de 77,77% (21/27) pour *Ae. aegypti* et 100% (14/14) pour *Ae. albopictus*.

A 21 jpi, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* disséminent YFV de façon comparable à l'exception de YFV Nigeria pour lequel *Ae. aegypti* dissémine moins bien qu'*Ae. albopictus*.

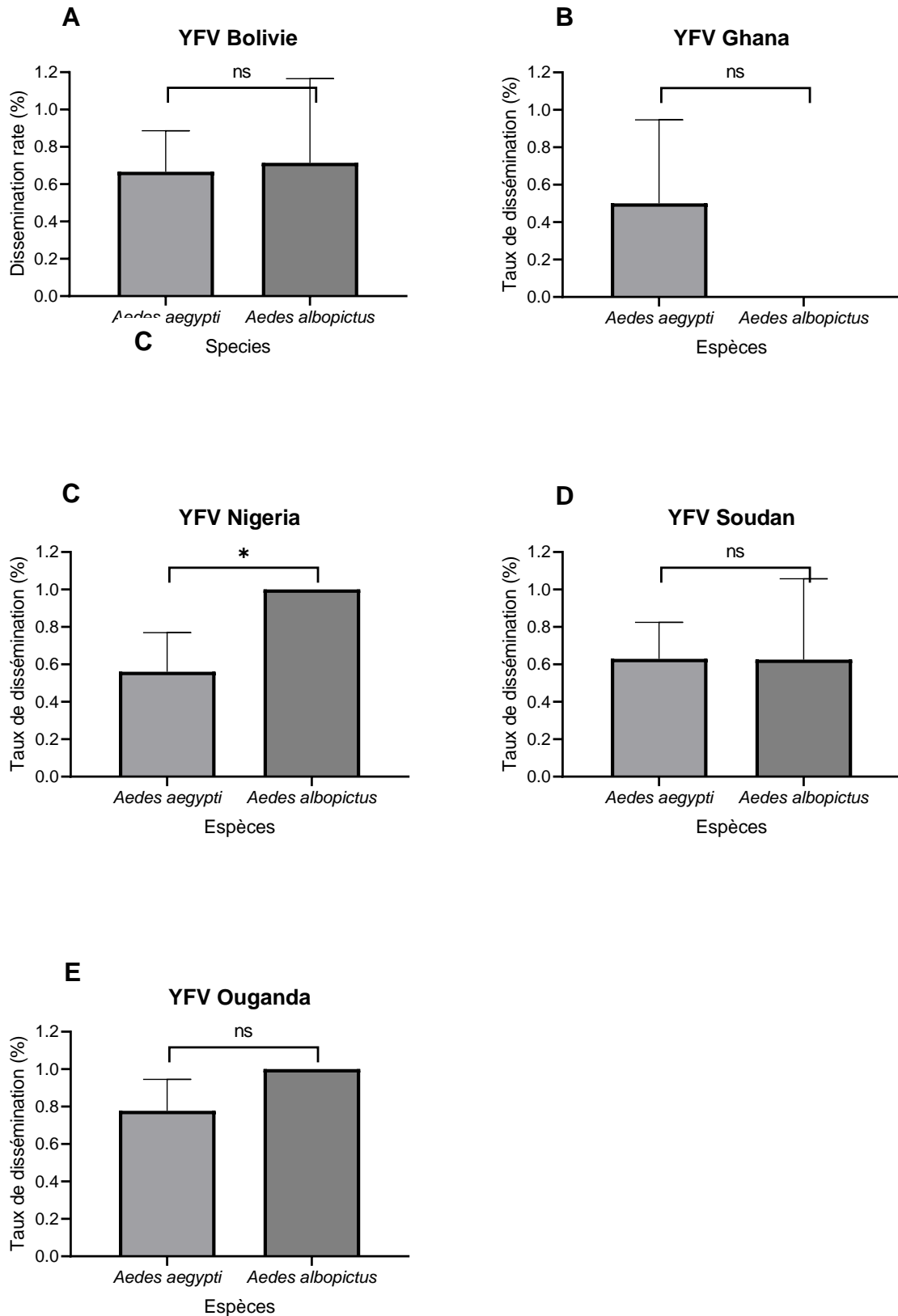


Figure 66 : Taux de dissémination des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus

utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, * $0,01 \leq p < 0,05$.

8.16.3. Taux de transmission

A 21 jpi, les 2 espèces présentent des TR qui varient en fonction du YFV utilisé (Figure 67). Avec YFV Bolivie, TR est de 35,71% (5/14) pour *Ae. aegypti* et 20% (1/5) pour *Ae. albopictus*. Avec YFV Ghana, TR est de 25% (1/4) pour *Ae. aegypti*. Avec YFV Nigeria, TR est de 6,66% (1/15) pour *Ae. aegypti* qui est significativement inférieur à 42,85% (3/7) pour *Ae. albopictus* (Test exact de Fisher : $p < 0,05$). Avec YFV Soudan, TR est de 8,88% (1/17) pour *Ae. aegypti* et 33,33% (2/6) pour *Ae. albopictus*. Avec YFV Ouganda, TR est de 23,80% (5/21) pour *Ae. aegypti* et 14% (2/14) pour *Ae. albopictus*.

A 21 jpi, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* transmettent YFV de façon comparable à l'exception de YFV Nigeria où *Ae. aegypti* transmet moins bien qu'*Ae. albopictus*.

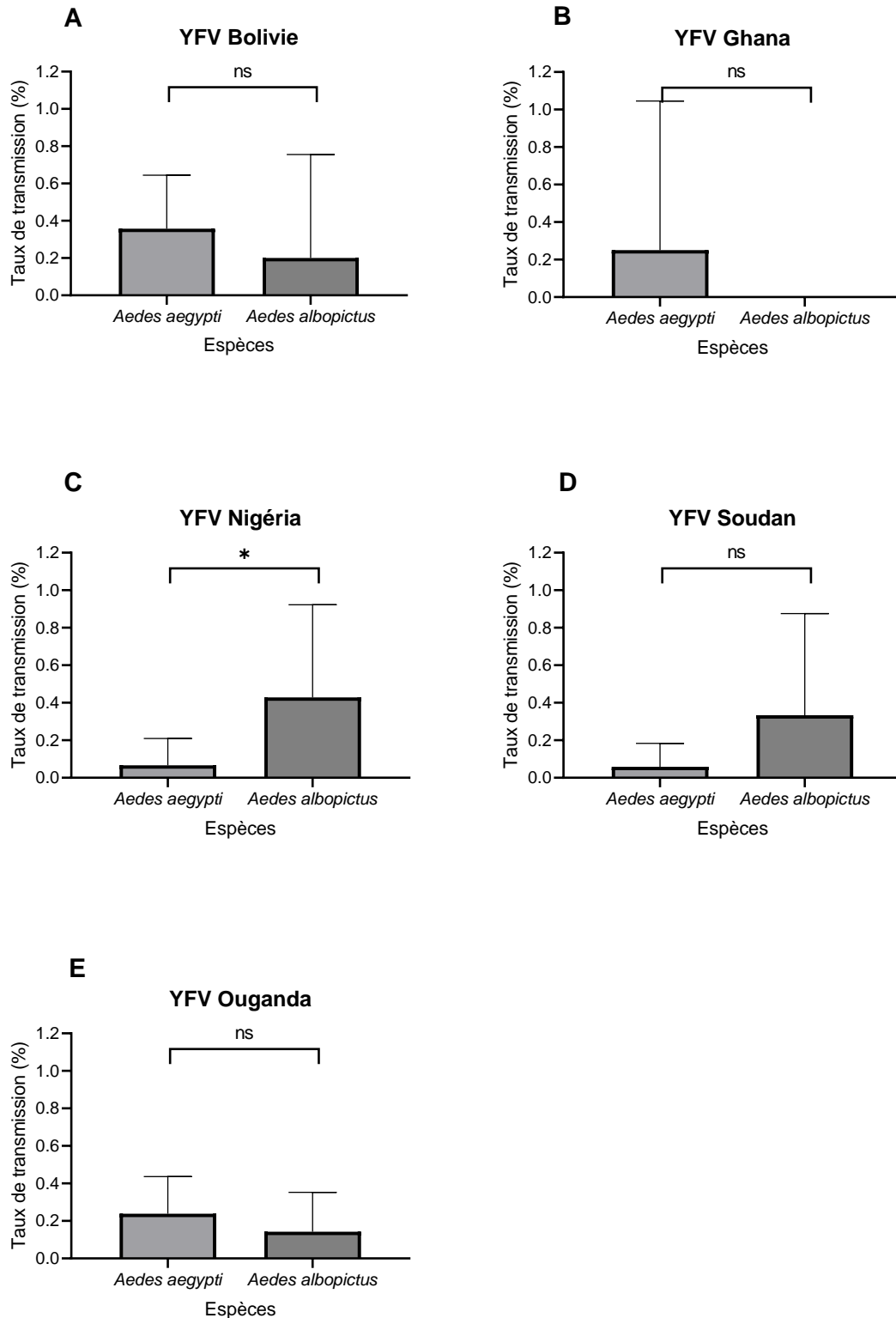


Figure 67 : Taux de transmission des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test exact de Fisher : ns non significatif, * $0,01 \leq p < 0,05$.

En résumé, l'examen des 2 espèces, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* de Haiti, 14 et 21 après une infection avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL montrent que :

- A 14 jpi, *Ae. albopictus* est le seul capable de transmettre YFV Bolivie ;
- A 21 jpi, *Ae. aegypti* s'infecte mieux qu'*Ae. albopictus*, dissémine aussi bien qu'*Ae. albopictus* mais transmet moins bien qu'*Ae. albopictus* ;
- *Ae. albopictus* n'est pas capable de transmettre YFV Ghana à 21 jpi ;
- *Ae. albopictus* est capable de transmettre YFV Bolivie dès 14 jpi alors qu'*Ae. aegypti* le peut à 21 jpi.

Le nombre de particules virales détectées dans différents compartiments du moustique

Le nombre de particules virales est évalué dans le tube digestif, la carcasse et la salive de chaque moustique des deux espèces infectées avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL. Les moustiques ont été examinés 14 et 21 jpi.

8.17.A 14 jours post-infection

A 14 jpi, les 2 espèces sont uniquement infectés avec YFV Bolivie (Figure 68).

Dans le tube digestif, les moustiques présentent un nombre moyen de particules virales de 8769 (N=21) pour *Ae. aegypti* et 7698 (N=8) pour *Ae. albopictus* sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$).

Dans la carcasse, les moustiques présentent un nombre moyen de particules virales avec YFV Bolivie de 18 229 (N=11) pour *Ae. aegypti* et 35 164 (N=5) pour *Ae. albopictus* sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$).

Dans la salive, *Ae. albopictus* présentent un nombre moyen de particules virales de 9 (N=2).

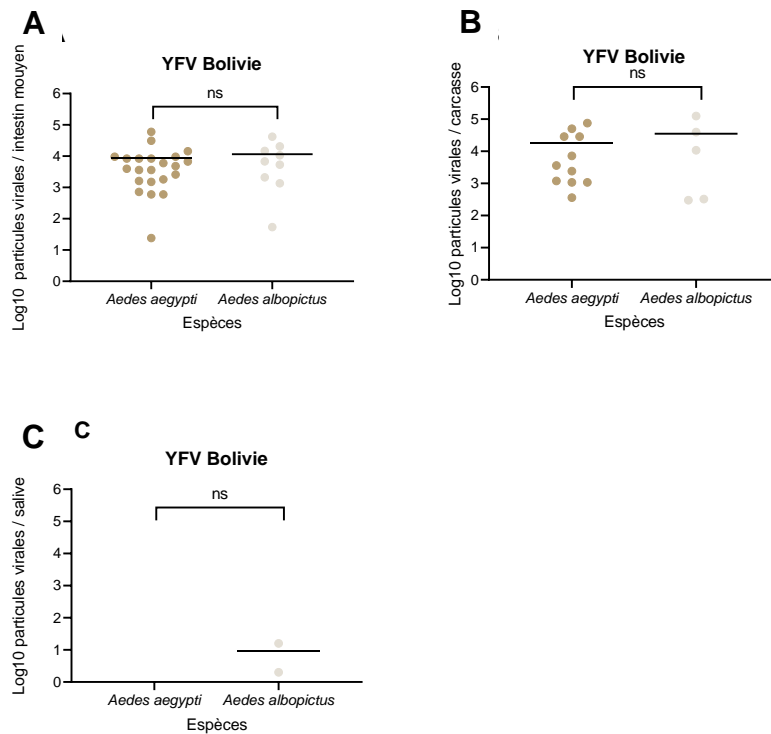


Figure 68 : Nombre de particules virales (en Log_{10}) détectées dans l'intestin moyen (A), la carcasse (B) et la salive (C) des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 14 jours après un repas infectieux contenant YFV Bolivie, fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif.

8.18.A 21 jours post-infection

A 21 jpi, les 2 espèces sont infectées avec les 5 virus (Bolivie, Ghana, Nigeria, Soudan et Ouganda).

8.18.1. Le nombre de particules virales dans l'intestin moyen

Le nombre moyen de particules virales dans le tube digestif n'est pas toujours plus important qu'à 14 jpi (Figure 69). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 5066 (N=21) pour *Ae. aegypti* et 18 308 (N=7) pour *Ae. albopictus*, avec une différence significative entre les populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$). Avec YFV Ghana, le nombre moyen est de 142 (N=8) pour *Ae. aegypti* et 102 (N=2) pour *Ae. albopictus*, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Nigéria, le nombre moyen est de 1507 (N=25) pour *Ae. aegypti* et 1812 (N=7) pour *Ae. albopictus*, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Soudan, le

nombre moyen est de 2001 (N=27) pour *Ae. aegypti* et 1205 (N=8) pour *Ae. albopictus*, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 6661 (N=27) pour *Ae. aegypti* et 15 072 (N=14) pour *Ae. albopictus*, avec une différence significative entre les populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$).

A 21 jpi, le nombre de particules virales dans le tube digestif des moustiques est comparable entre *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* avec deux exceptions : la population *Ae. albopictus* qui présente en moyenne plus de particules virales dans le tube digestif après infection par YFV Bolivie et Ouganda, par rapport à *Ae. aegypti*.

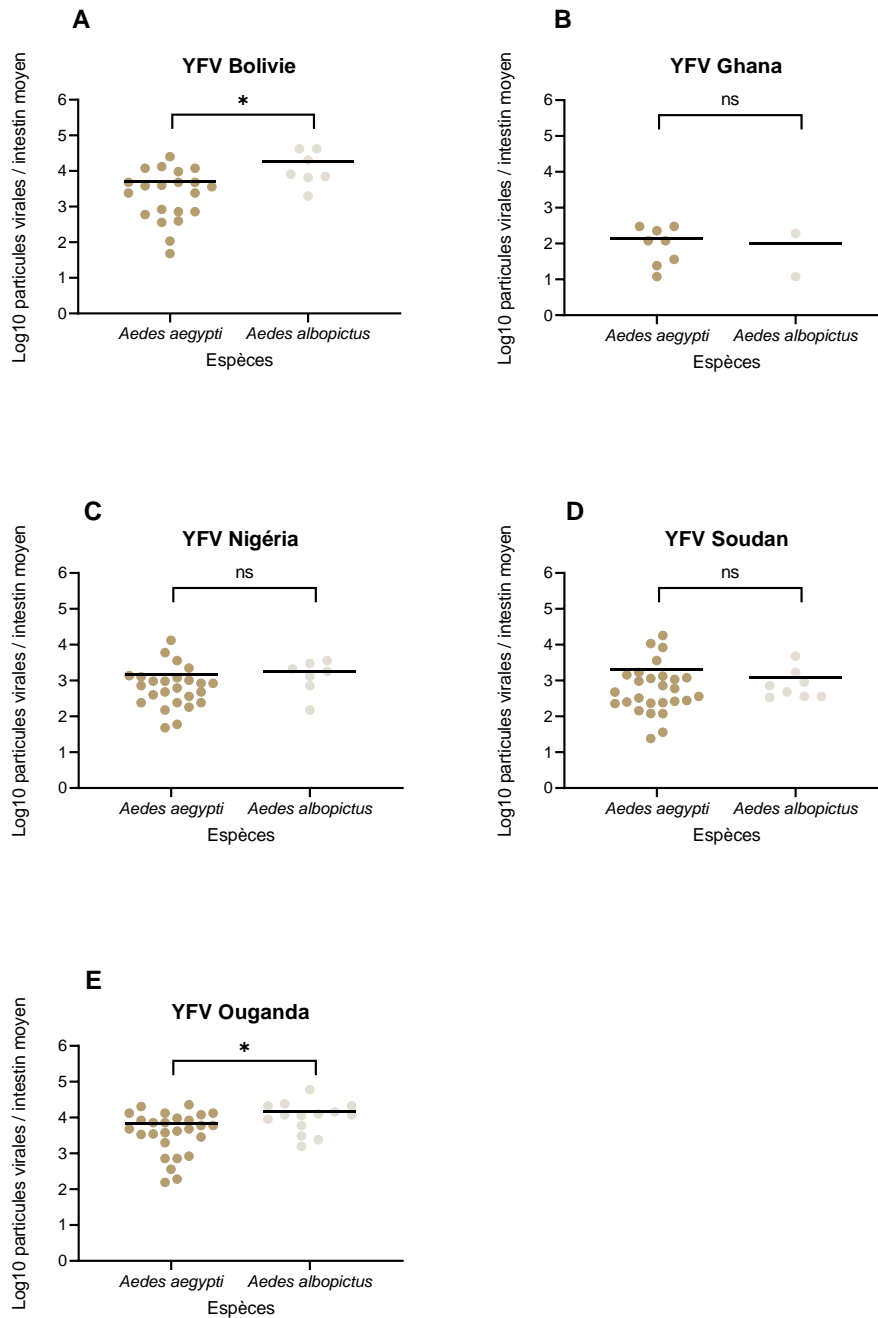


Figure 69 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans l'intestin moyen des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, * 0,01 ≤ p < 0,05.

8.18.2. Le nombre de particules virales dans la carcasse

A 21 jpi, le nombre moyen de particules virales dans la carcasse varie en fonction du YFV utilisé (Figure 70). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 37 389 (N=14) pour *Ae. aegypti* et 47 746 (N=5) pour *Ae. albopictus*, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$). Le nombre moyen de particules virales est plus élevé dans la carcasse que dans l'intestin moyen du moustique. Avec YFV Ghana, le nombre moyen est de 222 (N=4) pour *Ae. aegypti*. Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 57 465 (N=15) pour *Ae. aegypti* et 1356 (N=7) pour *Ae. albopictus*, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$). Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 22 396 (N=17) pour *Ae. aegypti* et 1134 (N=6) pour *Ae. albopictus*, avec une différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p < 0,05$). Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 47 700 (N=21) pour *Ae. aegypti* et 12 175 (N=14) pour *Ae. albopictus*, sans différence significative entre populations (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$).

A 21 jpi, le nombre de particules virales dans la carcasse des moustiques est comparable entre *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* avec deux exceptions, la population *Ae. albopictus* qui présente moins de particules virales dans la carcasse des moustiques infectés avec YFV Nigéria et YFV Soudan, par rapport à *Ae. aegypti*.

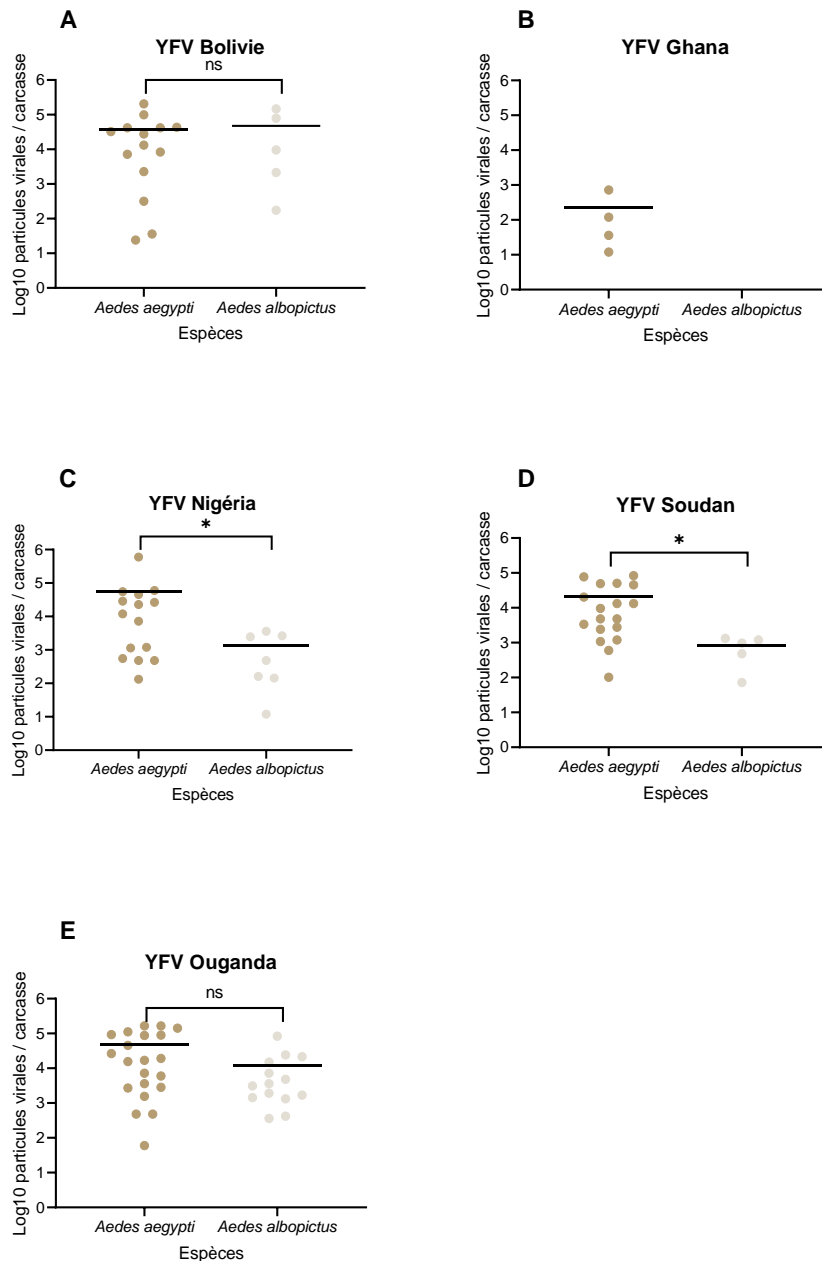


Figure 70 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la carcasse des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigeria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif, * 0,01 ≤ p < 0,05.

8.18.3. Le nombre de particules virales dans la salive

A 21 jpi, les 2 espèces présentent un nombre moyen faible de particules virales dans la salive (Figure 71). Avec YFV Bolivie, le nombre moyen est de 19 (N=5) pour *Aedes aegypti* et 28

(N=1) pour *Ae. albopictus*. Avec YFV Ghana, le nombre moyen est de 14 (N=1) pour *Ae. aegypti* et 7 (N=3) pour *Ae. albopictus*. Avec YFV Nigeria, le nombre moyen est de 2 (N=1) pour *Ae. aegypti* et 22 (N=3) pour *Ae. albopictus*. Avec YFV Soudan, le nombre moyen est de 200 (N=1) pour *Ae. aegypti* et 31 (N=2) pour *Ae. albopictus*. Avec YFV Ouganda, le nombre moyen est de 3808 (N=5) pour *Ae. aegypti* et 44 (N=2) pour *Ae. albopictus*. Aucune différence significative dans le nombre moyen de particules virales dans la salive n'est détectée entre les 2 espèces pour l'ensemble des YFV (Test de Kruskal-Wallis : $p > 0,05$)

A 21 jpi, le nombre de particules virales dans la salive est faible et comparable entre les 2 espèces.

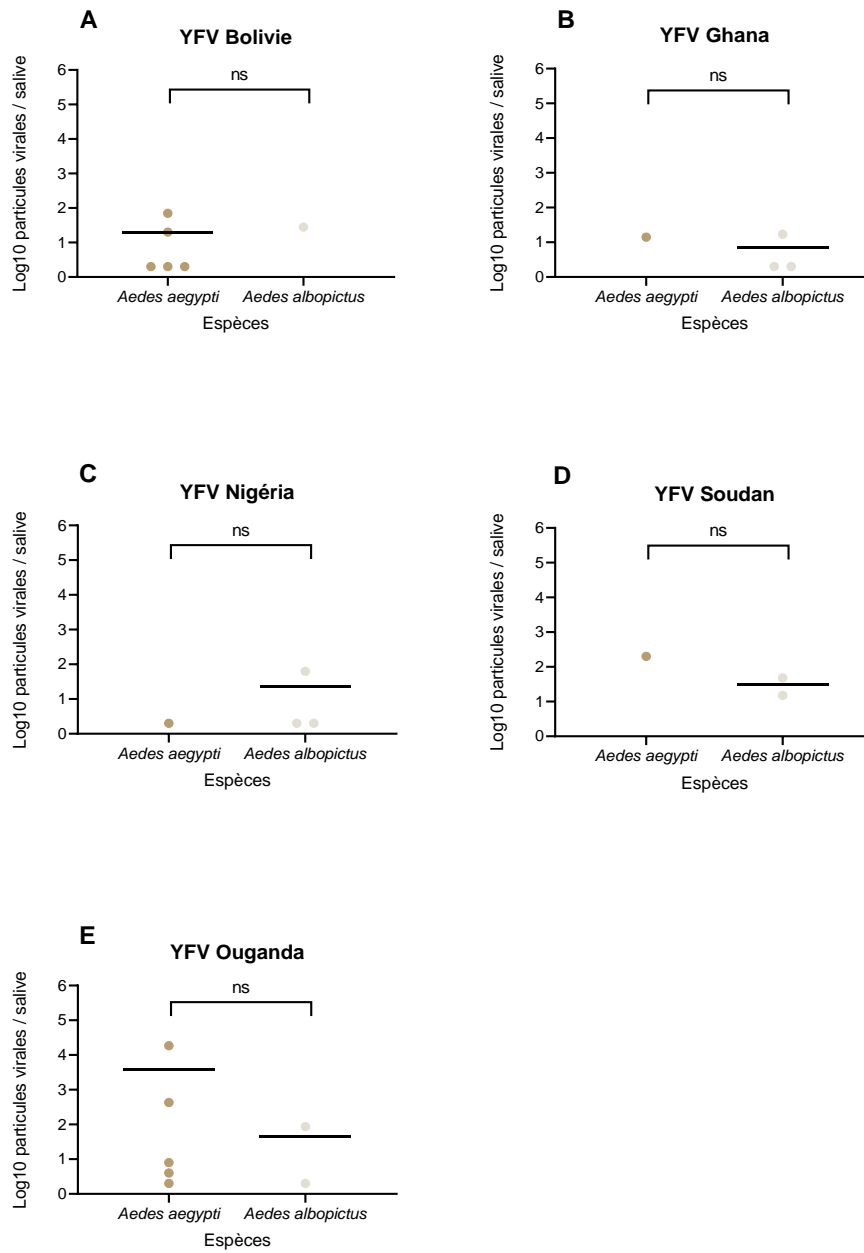
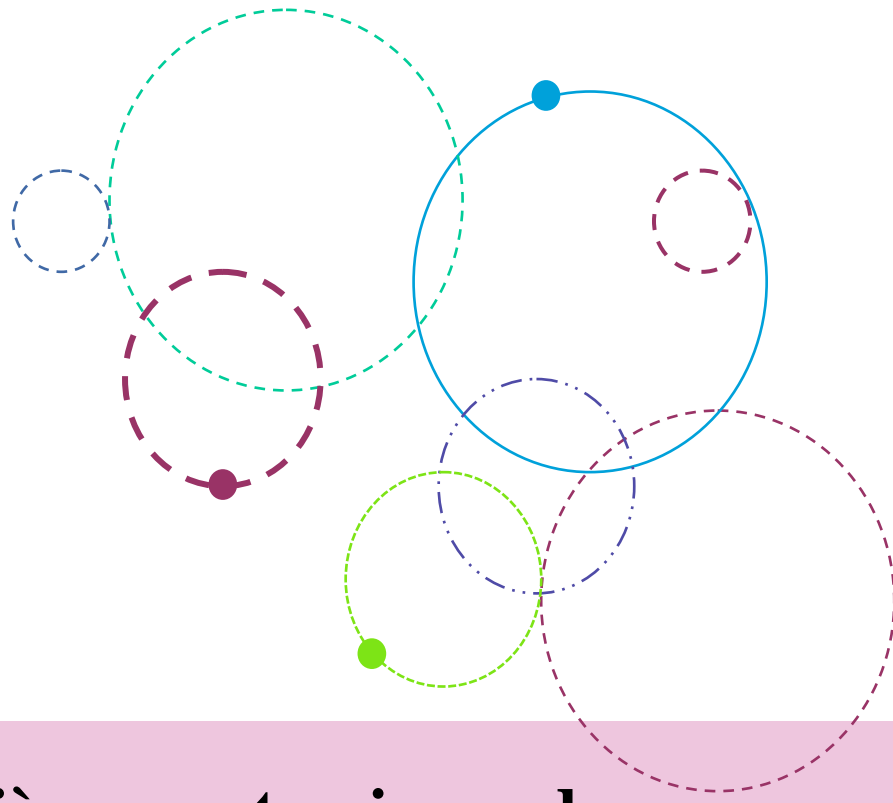


Figure 71 : Nombre de particules virales (en Log₁₀) détectées dans la salive des moustiques, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* de Papin (Port-à-Piment, Haïti), examinées 21 jours après un repas infectieux fourni à un titre de 10⁷ ffu/mL. Les virus utilisés sont : YFV Bolivie (A), Ghana (B), Nigéria (C), Soudan (D), et Ouganda (E). Test de Kruskal-Wallis : ns non significatif.

En résumé, l'examen du nombre de particules virales dans le tube digestif, carcasse, et salive des moustiques d'une espèce d'*Ae. aegypti* et d'une espèce *Ae. albopictus* de Haïti, 14 et 21 jours après infection avec 5 souches de YFV proposées à un titre de 10^7 ffu/mL indiquent que :

- Les 2 espèces présentent des nombres comparables de particules virales dans l'intestin moyen, la carcasse des moustiques à 14 et 21 jpi ;
- Les 2 espèces produisent un nombre équivalent de particules virales dans chaque compartiment du moustique.

Au bilan, les 2 espèces, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* de Haïti, sont capables de transmettre les 5 virus. De façon surprenante, *Aedes albopictus* est capable de transmettre YFV Bolivie dès 14 jpi. Par contre, il n'est pas capable de transmettre YFV Ghana à 21 jpi. Les 2 espèces produisent un nombre équivalent de particules virales dans chaque compartiment du moustique.



Chapitre 9

Impact des barrières anatomiques du moustique sur la diversité virale du YFV

Ce chapitre présente les résultats concernant l'impact des barrières anatomiques du moustique sur la diversité virale du virus de la fièvre jaune.

Chapitre 9 : Etude de l'impact des barrières anatomiques du moustique sur le virus de la fièvre jaune

Contexte

Au cours de l'infection du moustique par un arbovirus, le virus est ingéré par le moustique femelle lors d'un repas de sang pris sur un hôte en phase virémique. Pour être transmis, le virus doit, dans un premier temps, être capable de se répliquer dans les cellules de l'épithélium intestinal passant ainsi la barrière du tube digestif. Une fois cette étape franchie, le virus dissémine dans la cavité générale et atteint les différents organes internes du moustique dont les glandes salivaires. Afin d'être transmis, le virus doit se répliquer dans les cellules des glandes salivaires et ainsi, passer la barrière des glandes salivaires.

Après chaque étape, la population virale est soumise à un goulot d'étranglement qui diminuera la diversité virale. En effet, il a été montré que les différentes barrières anatomiques (intestin et glandes salivaires) pouvaient jouer un rôle de filtre (goulot d'étranglement) ayant ainsi un impact sur la compétence vectorielle et la diversité virale. Dans cette partie de la thèse, nous avons tenté de déterminer l'impact de ces deux barrières sur la diversité virale des différentes souches de fièvre jaune.

Dans notre protocole expérimental, décrit dans les paragraphes 8.4 à 8.6, des moustiques ont été disséqués, les intestins ont été séparés des carcasses et analysés individuellement. La diversité des populations virales des cinq souches de YFV d'origines géographiques différentes a été étudiée dans les deux compartiments du moustique, l'intestin moyen et la carcasse. La population de Morne-Rouge (Martinique) a été infectée avec les cinq souches de YFV et la diversité virale analysée à 21 jours post-infection.

Partie 4 : Analyse des populations virales des moustiques Morne-Rouge (Martinique) infectés avec 5 souches de virus de la fièvre jaune

La diversité des populations virales de 5 YFV d'origine géographique différente a été étudiée dans deux compartiments du moustique, intestin moyen et carcasse. La population Morne-Rouge (Martinique) a été infectée avec un repas de sang comprenant une suspension virale issu d'un stock de YFV produit après un passage sur cellules *Ae. albopictus*. Le repas de sang est proposé à un titre de 10^7 ffu/mL et les moustiques ont été examinés à 21 jpi.

Evolution des populations virales

Les virus utilisés dans les expériences appartiennent à deux lignées phylogénétiques africaines différentes (Figure 72) :

- le groupe "Afrique de l'Ouest": Nigeria (genotype I*), Ghana (genotype II)

* d'après Mutebi et al. (2001) DOI: 10.1128/JVI.75.15.6999–7008.2001

- le groupe "Afrique de l'Est" : Soudan (génotype Est/Centre), Ouganda (génotype Est)

Le virus de Bolivie est plus proche des virus d'Afrique de l'Ouest, que de ceux d'Afrique de l'Est. L'arbre phylogénétique basé sur les séquences acides aminés confirme ce résultat.

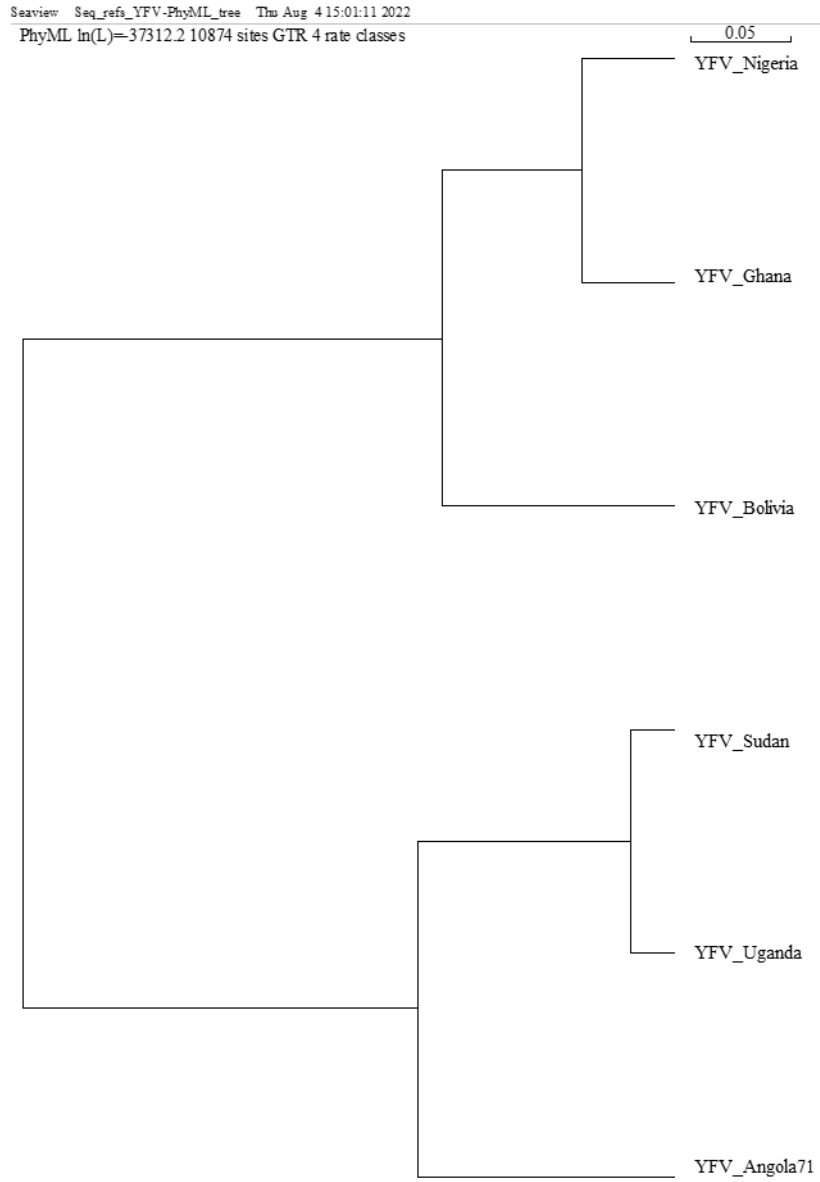


Figure 72 : Arbre phylogénétique des génomes complets des 5 virus utilisés. Alignement avec muscle, Construction de la phylogénie avec PhyML, modèle GTR, dans Seaview4 (Gouy et al. 2010)

Les populations virales détectées dans les moustiques forment un groupe phylogénétique homogène incluant les populations virales présentes dans la production virale utilisée pour les

infections de moustiques. On distingue 5 groupes distincts correspondant aux 5 souches virales utilisées (Figure 73).

On retrouve les deux grands groupes viraux africains : (i) Afrique de l’Ouest (Ghana, Nigeria et (ii) Afrique de l’Est (Soudan, Ouganda) pour les populations virales issues des moustiques et leurs génomes de référence. Malgré l’accumulation des variants dans les populations virales des moustiques, la phylogénie des virus est maintenue.

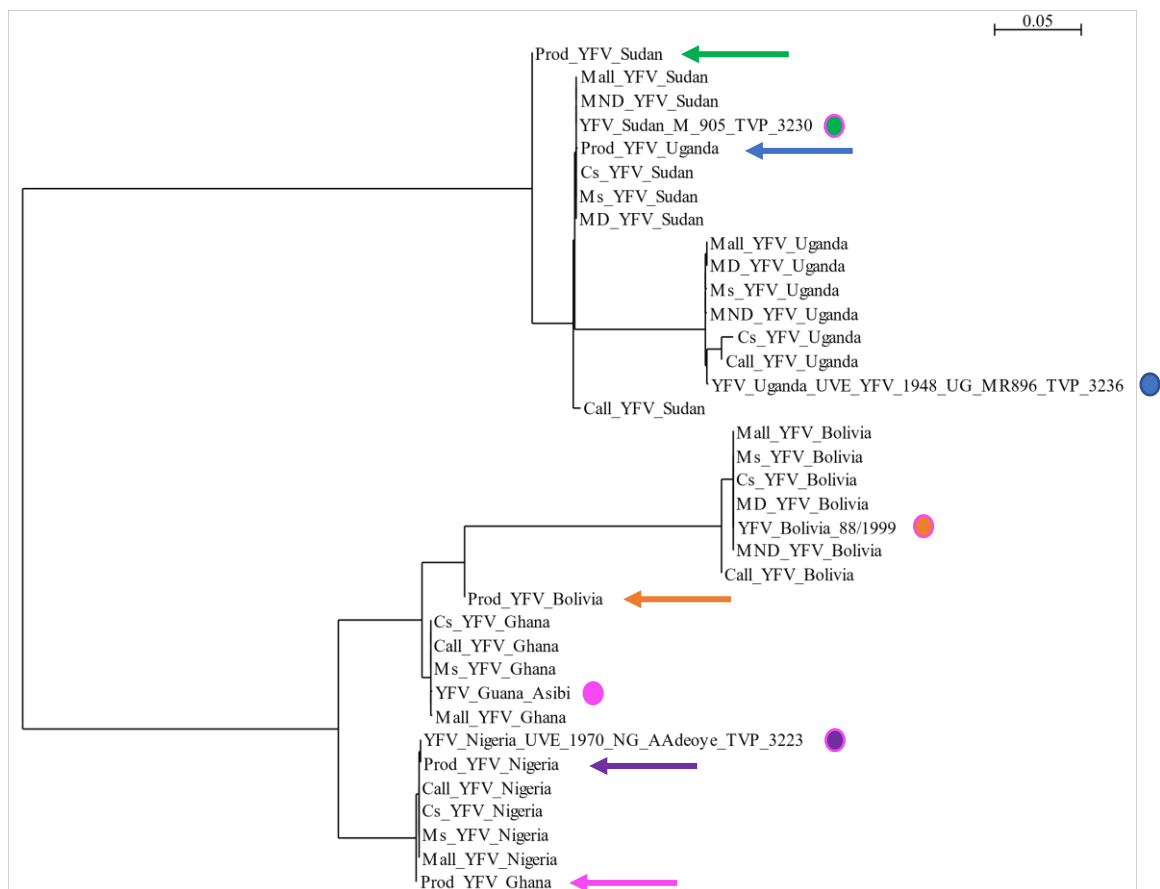


Figure 73 : Phylogénie des séquences consensus majoritaires (obtenues avec le logiciel Vivan). Alignement avec muscle, Construction de la phylogénie avec PhyML, modèle GTR, dans Seaview4 (Gouy et al., 2010).

Abbréviations: **Prod**, production ; **Mall**, all midguts ; **MD**, Midgut with positive dissemination ; **MND**, Midgut with negative dissemination ; **Ms**, Midgut with positive saliva ; **Call**, all carcasses ; **Cs**, Carcass with positive saliva. *Légende :* Cercle : Séquence Sanger du virus ; Flèche : Séquence de la production virale sur C636.

Les séquences consensus obtenues des 5 productions virales peuvent être très divergentes des populations virales issus des moustiques qu'elles ont infectés. Par exemple, la séquence consensus de la production YFV Ghana se trouve positionnée dans le groupe YFV Nigeria. Il en est de même pour la production YFV Ouganda qui se retrouve dans le groupe YFV Soudan (Figure 73). Ces résultats suggèrent une dérive génétique aléatoire très rapide des virus en culture sur cellules C6/36.

Diversité des populations virales

Dans le but d'étudier l'effet des différentes barrières anatomiques du moustique sur la diversité virale, les ARNs viraux ont été extraits des productions virales, de l'intestin moyen (pour l'infection), de la carcasse (pour la dissémination) et de la salive (pour la transmission) des moustiques de la population Morne-Rouge à 21 jpi selon différents statuts infectieux des moustiques (Tableau 3).

Les ARNs viraux extraits ont été séquencés en utilisant la technologie haut-débit (Ion Torrent). Les mutations nucléotidiques des populations de reads ou SNVs (single nucleotidic variants) ont été détectées en comparant les reads de chacune des populations virales avec la séquence génomique de référence (Sanger) en utilisant le logiciel ViVan (Isakov et al., 2015). Cependant, les difficultés rencontrées lors du séquençage, n'ont pas permis d'obtenir une bonne couverture pour l'ensemble des échantillons. C'est le cas, en particulier, de la production YFV Soudan. Pour des raisons non élucidées, il n'a pas été non plus possible de détecter les SNVs dans la production YFV Nigeria.

L'ARN viral contenu dans les salives a été séquencé à l'aide du dispositif MALBAC mais malheureusement le nombre de reads n'a pas été suffisant pour déterminer la diversité virale dans la salive.

9.1. Description des populations virales

On observe un très grand nombre de SNVs dans les productions virales. Le nombre de SNVs observés atteint 1332 pour la production YFV Bolivie, 1022 pour YFV Ghana, 1091 pour YFV Ouganda et seulement 253 pour la production YFV Soudan (avec un niveau de couverture du séquençage très faible).

Le nombre de SNVs dans les populations virales issus des moustiques est beaucoup moins important et varie en fonction des répliques.

Les répliques, Carc3-Bolivia, Carc6-Soudan et Carc3-Uganda, montrent un plus grand nombre de SNVs que les autres répliques (Figure 74). L'indice de Shannon mesurant l'entropie indique que l'évolution virale dans ces trois échantillons est moins contrainte (données non communiquées).

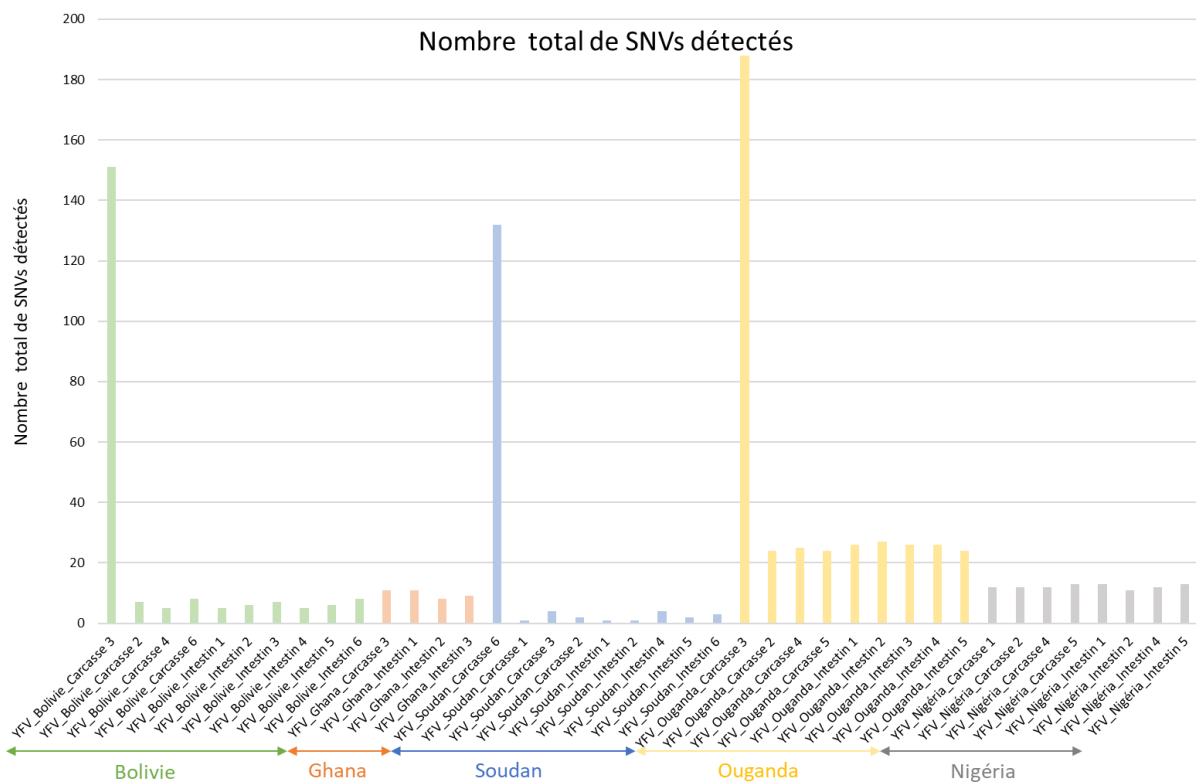


Figure 74 : Nombre total de SNVs détectés dans les différents échantillons de populations virales. Sont représentés ici, le nombre de SNVs des populations virales des tubes digestifs et des carcasses des moustiques infectés au laboratoire.

Pour l'ensemble des autres échantillons, de légères variations du nombre de SNVs sont observées en fonction du virus utilisé : >20 SNVs pour les populations de YFV Ouganda, >10 SNVs pour YFV Nigeria, de 5 à 10 pour YFV Bolivie et YFV Ghana, et <5 SNVs pour YFV Soudan (Figure 74).

Ainsi, en dehors des répliques atypiques, le nombre de SNVs dans les populations virales des moustiques est 40 à 100 fois inférieur au nombre de SNVs dans les productions. Les productions virales contiennent de 283 à 1332 SNVs, mais seulement 26 à 300 d'entre elles (4,43% à 27,5%) seront retrouvées dans l'intestin moyen des moustiques (Tableau 5). La majorité des mutations observées dans les populations virales des productions ne sont pas retrouvées dans l'intestin moyen des moustiques.

Tableau 5 : Comparaisons des populations virales issus des productions et de l'intestin moyen des moustiques en fonction du YFV utilisé. Analyse des SNVs (spécifiques) à l'intestin moyen.

	Bolivia	Ghana	Uganda	Sudan	Nigeria
Nombre SNVs = common mutations	1332	1022	1091	283	non mappé
Nombre de SNVs non partagées avec les midguts = unique mutations	1055	877	791	257	
Nombre de SNVs partagées avec les midguts (par différence)	59	145	300	26	
% de SNVs partagées avec les midguts (par différence)	4.43	14.19	27.50	9.19	

9.1.1. Populations virales des productions et de l'intestin moyen des moustiques

Les populations virales issues des productions virales ont été examinées et comparées aux populations virales détectées dans l'intestin moyen des moustiques ayant ingéré une partie de la population virale contenue dans la production composant le repas de sang proposé aux moustiques.

En premier lieu, les SNVs spécifiques des productions virales, non détectées dans les populations virales de l'intestin moyen des moustiques ont été étudiées.

Les SNVs détectés sont localisés principalement dans les gènes codant pour la protéine d'enveloppe E et les protéines non structurales :

- NS5, enzyme responsable de la mise en place de la coiffe sur l'ARN, qui permet aussi la réplication du génome ARN viral (activité ARN-dépendante ARN),
- NS4b, polypeptide jouant un rôle potentiel dans l'assemblage du virus,
- NS3, enzyme ayant une activité serine protéase en N-terminale et une activité NTPase/hélicase en C-terminale, intervenant dans le traitement de la polyprotéine,
- NS1, glycoprotéine jouant le rôle de facteur de virulence.

La production YFV Bolivie a été séquencée avec un niveau de couverture moyen. Seuls 771 (74%) des SNVs de couverture supérieure à 500, ont été retenus pour l'analyse. Ils se répartissent sur tout le génome, principalement sur NS5 (27,76% des mutations observées), NS3 (19,54%), E (15,81%) et NS1 (10,41%). 696 SNVs correspondent à des mutations synonymes de fréquence supérieure à 90%. 60 mutations non synonymes à très forte fréquence, elles aussi réparties sur tout le génome, restent plus fréquentes sur NS5, E, NS3 et NS1 (par ordre décroissant).

La production YFV Ghana, avec 811 mutations retenues sur les 877 détectées, est l'échantillon présentant la meilleure couverture de séquençage. Les mutations, majoritairement synonymes portent sur NS5 (26%), NS3 (15,39%), E (16,19%), NS1 (8,21%) et NS4b (8,44%). Le plus grand nombre de mutations non synonymes est porté par NS5, avec 5 mutations non synonymes et 172 mutations synonymes. De façon inattendue, 23 mutations non synonymes sont présentes sur la séquence codant la protéine preM (précurseur de la protéine M de membrane) avec presque autant de mutations synonymes (26 mutations), ce qui représente au total 6,61% des mutations observées.

La production YFV Ouganda présente un séquençage de qualité moyenne. Elle contient 520 sur 791 SNVs de couverture supérieure à 500, qui correspondent à des mutations généralement synonymes et réparties sur l'ensemble du génome. Ces mutations sont principalement localisées sur les séquences codant pour les protéines E (21,28% des mutations), NS3 (15,53%), NS4b (14,68%) et NS5 (10,43%). La séquence codant pour la protéine d'enveloppe possède le plus fort taux de mutations avec 100 mutations synonymes.

La production YFV Soudan, de plus faible couverture de séquençage, présente le moins de mutations avec 203 mutations sur tout le génome qui sont généralement synonymes. Les mutations détectées portent sur les séquences codant pour les protéines E (49,22%) et NS3 (18,75%), comme pour les populations virales des autres productions.

Ainsi, les mutations des populations virales des productions de virus du groupe “Afrique de l’Est”, Ouganda et Soudan, s’accumulent préférentiellement la séquence codant la protéine E tandis que celles des productions de YFV Ghana (Afrique de l’Ouest) et de Bolivie (Amérique) s’accumulent préférentiellement sur la séquence codant la protéine NS5. Par ailleurs, aucune des mutations virales spécifiques d’une production donnée n’est retrouvée dans les autres productions.

En second lieu, les SNVs spécifiques des populations virales issus de l’intestin moyen des moustiques, non détectées dans les productions virales ont été examinées.

De l’ordre d’un millier de mutations différentes, sont détectées dans les populations virales issues de l’intestin moyen des moustiques mais non détectées dans les productions virales utilisées pour les repas de sang.

Sur les 32, 151, 36 et 78 SNVs communs à tous les répliques des intestins moyens infectés avec YFV Bolivie, YFV Ghana, YFV Ouganda et YFV Soudan, 25, 115, 15 et 78 SNVs ont été respectivement identifiés comme spécifiques de l’intestin moyen des moustiques.

Parmi les mutations à forte fréquence ($>0,9$), on note (Annexe 2) :

- 3 mutations synonymes pour les moustiques infectés avec YFV Bolivie,
- 2 mutations synonymes et 3 mutations non synonymes, D28G sur E, I3V sur NS2a, K244R sur NS4b pour ceux infectés avec YFV Ghana,
- 2 mutations non synonymes, E247K sur NS4b, R2I sur NS5 avec YFV Ouganda,
- et enfin, 2 mutations non synonymes A280V sur NS3 et S231F sur NS5 avec YFV Soudan.

Comme pour les productions virales, aucune des mutations virales spécifiques des moustiques infectés avec un virus donné n’est retrouvées dans les populations issus des moustiques infectés avec les autres virus.

9.1.2. Mutations communes entre les populations virales des intestins moyens et des carcasses de moustiques

Afin d'obtenir une vision globale des populations virales présentes dans le moustique, tous les variants des populations virales des intestins moyens et des carcasses de fréquence supérieure à 90% ont été analysés.

Un total de 35 SNVs partagés par les intestins moyens et les carcasses des moustiques infectés ont été identifiés (Tableau 6) :

- une mutation non synonyme (NS3) et 4 mutations synonymes, pour YFV Bolivie,
- une seule mutation non synonyme (NS5), pour YFV Soudan,
- une mutation non synonyme (NS5) et 16 mutations non synonymes (15 sur NS5 et 1 sur preM), pour YFV Ouganda,
- 6 mutations non synonymes et 3 mutations synonymes, pour YFV Ghana,
- 2 mutations non synonymes (NS3, NS4b) et 1 mutation synonyme (NS2a) pour YFV Nigéria.

Aucune de ces mutations n'est partagée par les 5 YFV utilisés.

Tableau 6 : Détails des 35 mutations (fréquence > 0,9) communes aux intestins moyens et aux carcasses, pour les moustiques infectés avec 5 YFV (Bolivie, Soudan, Ouganda, Ghana, Nigeria). **(A)** mutations non synonymes, **(B)** mutations synonymes.

A

Virus	Gène	Position sur le génome	Nucléotide de références	Valeur de la couverture	Changement nucléotidique : position sur le gène : type de changement >AA: fréquence
YFV_Bolivie	NS3	6140	A	5538.50	C:524:T>P:1.00000
YFV_Soudan	NS5	8332	C	1418.40	T:231:S>F:0.99961
YFV_Ouganda	NS5	9091 A	A	346.80	T:484:Y>F:1.00000

YFV_Ghana	E	1023	A	3998.00	G:28:D>G:0.99832
YFV_Ghana	NS1	2540	G	4400.67	A:41:E>K:0.99861
YFV_Ghana	NS2a	3482	A	4120.67	G:3:I>V:0.99990
YFV_Ghana	NS4b	7125	C	4283.33	T:91:T>I:0.99882
YFV_Ghana	NS4b	7192	A	2794.33	G:113:I>M:0.99663
YFV_Ghana	NS4b	7584	A	2681.33	G:244:K>R:0.99977
YFV_Nigéria	NS3	4768	A	9345.50	G:66:K>R:0.99911
YFV_Nigéria	NS4b	7623	G	3604.00	A:246:E>K:0.99805

B

Virus	Gène	Position sur le génome	Nucléotide de références	Valeur de la couverture	Changement nucléotidique : position sur le gène : type de changement >AA: fréquence
YFV_Bolivie	NS2a	4039	A	3050.25	G:177:synonymous>G:0.99792
YFV_Bolivie	2k	6860	T	9054.75	C:15:synonymous>L:1.00000
YFV_Bolivie	NS4b	7459	C	5055.00	T:191:synonymous>F:0.99830
YFV_Bolivie	NS5	7936	C	3737.25	T:100:synonymous>V:0.99858
YFV_Soudan : pas de mutations synonymes (f> 0.9) communes aux intentins					
YFV_Ougand a	preM	503	C	1986.20	T:7:synonymous>N:1.00000
YFV_Ougand a	NS5	9083	A	565.20	G:481:synonymous>G:1.00000
YFV_Ougand a	NS5	9086	T	594.40	G:482:synonymous>A:1.00000
YFV_Ougand a	NS5	9089	G	246.80	T:483:synonymous>R:1.00000
YFV_Ougand a	NS5	9095	A	754.20	C:485:synonymous>L:1.00000
YFV_Ougand a	NS5	9101	C	434.60	T:487:synonymous>F:0.99619
YFV_Ougand a	NS5	9107	C	718.20	T:489:synonymous>A:0.99834
YFV_Ougand	NS5	9110	A	457.60	T:490:synonymous>L:1.00000

a					
YFV_Ougand a	NS5	9113	A	335.20	G:491:synonymous>G:1.0000 0
YFV_Ougand a	NS5	9116	T	476.80	C:492:synonymous>F:1.00000
YFV_Ougand a	NS5	9119	A	758.40	G:493:synonymous>L:1.00000
YFV_Ougand a	NS5	9131	T	654.80	C:497:synonymous>H:0.98835
YFV_Ougand a	NS5	9141	C	755.20	A:501:synonymous>R:0.98030
YFV_Ougand a	NS5	9158	T	1469.40	A:506:synonymous>G:0.99551
YFV_Ougand a	NS5	9161	G	1867.20	T:507:synonymous>G:0.99648
YFV_Ougand a	NS5	9164	G	1458.80	T:508:synonymous>V:0.99775
YFV_Ghana	NS3	5881	G	1997.33	A:448:synonymous>K:0.99600
YFV_Ghana	NS5	8767	A	3408.33	G:388:synonymous>R:0.99971
YFV_Ghana	NS5	8938	A	2839.33	G:445:synonymous>Q:0.9991 9
YFV_Nigéria	NS2a	4046	C	5446.50	T:179:synonymous>L:0.99763

Tableau 7 : Liste des mutations communes aux intestins moyens et aux carcasses des moustiques et non observées dans les productions.

Virus	Gène	Position sur le génom	Nucléotide de références	Valeur de la couverture	Changement nucléotidique : positon sur le gène : type de changement >AA: fréquence
YFV_Bolivie	2k	6860	T	6285.67	C:15:synonymous>L:1.00000
YFV_Bolivie	NS4b	7459	C	3263.33	T:191:synonymous>F:1.00000
YFV_Bolivie	NS5	7936	C	2442.5	T:100:synonymous>V:1.00000
YFV_Soudan	NS5	8332	C	1418.40	T:231:S>F:0.99961

YFV_Ghana	E	1023	A	3998.00	G:28:D>G:0.99832
YFV_Ghana	NS2a	3482	A	4120.67	G:3:I>V:0.99990
YFV_Ghana	NS3	5881	G	1997.33	A:448:synonymous>K:0.99600
YFV_Ghana	NS4b	7584	A	2681.33	G:244:K>R:0.99977
YFV_Ghana	NS5	8938	A	2839.33	G:445:synonymous>Q:0.99919

Neuf de ces mutations n'ont pas été détectées dans les populations virales des productions virales (Tableau 7, Annexe 3).

De façon intéressante, les mutations spécifiques détectées dans les intestins moyens (non détectées dans les productions) de YFV Bolivie, YFV Ghana et une des 2 mutations de YFV Soudan, sont maintenues dans les carcasses. Ce résultat n'est cependant pas observé avec le YFV Ouganda.

9.1.3. Description des populations virales dans les différents compartiments du moustique en fonction du virus

Les populations virales détectées dans les intestins moyens des moustiques ont été examinées et comparées avec les populations virales détectées dans les carcasses de moustiques correspondant aux populations virales ayant disséminé dans la cavité générale du moustique.

Les mutations communes à chaque compartiment du moustique, intestin moyen ou carcasses sont analysées (Figure 48).

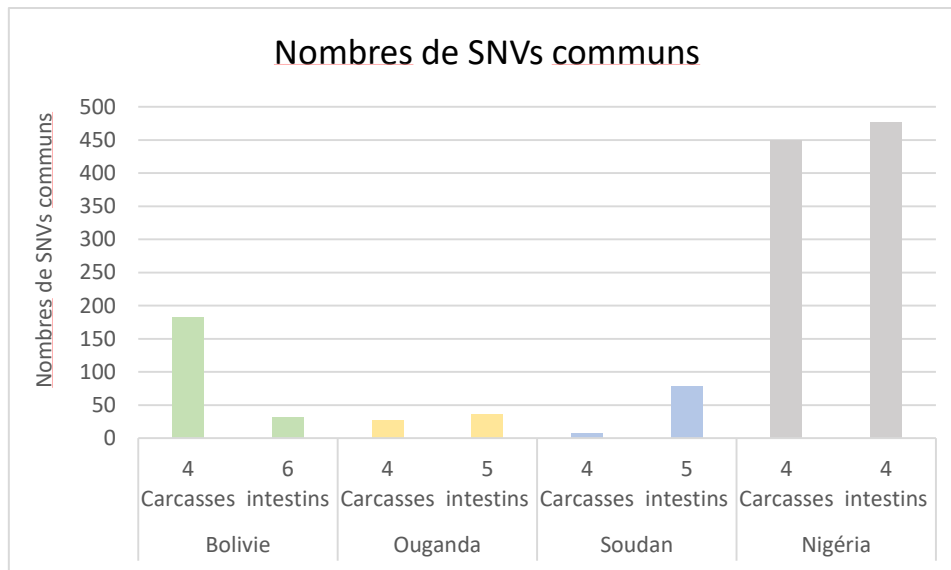


Figure 75 : Nombres de SNVs communs à toutes les populations virales (réplicas) des intestins moyens (intestins) ou des carcasses pour chaque virus.

En étudiant les SNVs communs à tous les intestins moyens d'une part et ceux communs à toutes les carcasses d'autres part, on s'attend à ce que le nombre de replicas influence le nombre de SNVs. En effet, plus la diversité des SNVs est différente entre les replicas, plus le nombre de SNVs communs va diminuer quand le nombre de replicas augmente. C'est ce que l'on observe entre les intestins moyens pour les différents virus. On note moins de variants dans les 6 populations virales de YFV Bolivie (SNVs = 32), un peu plus de variants dans les 5 populations virales de YFV Ouganda (SNVs = 36) et YFV Soudan (SNVs = 78) , et encore plus de variants dans les 4 populations virales du YFV Nigeria (SNVs = 476) (Figure 75).

En revanche avec un nombre égal de réplicas pour toutes les carcasses, on note qu'il y a plus de variants dans les carcasses des moustiques infectés par les virus d'Afrique de l'Ouest, YFV Nigeria (SNVs = 450), et d'Amérique, YFV Bolivie (SNVs = 182), et moins de variants pour les virus d'Afrique de l'Est, YFV Ouganda (SNVs = 26) et YFV Soudan (SNVs = 7, sous réserve du niveau de couverture).

Avec le même nombre de réplicas dans les deux compartiments, on observe un nombre similaire de variants, dans les intestins moyens (476 SNVs) et les carcasses (450 SNVs) infectées avec YFV Nigeria.

Par comparaison entre les deux compartiments, nous avons déterminé l'ensemble des mutations spécifiques des carcasses et l'ensemble des mutations spécifiques des intestins moyens.

Il y a autant de SNVs spécifiques des carcasses que de SNVs spécifiques des intestins moyens pour les moustiques infectés avec YFV Ouganda (702-773) et YFV Nigeria (735-796). En revanche, il y a plus de SNVs spécifiques dans les populations virales des carcasses que dans celles des intestins moyens pour les moustiques infectés avec YFV Bolivie (1666>492) ou YFV Soudan (1243>660) (Figure 76).

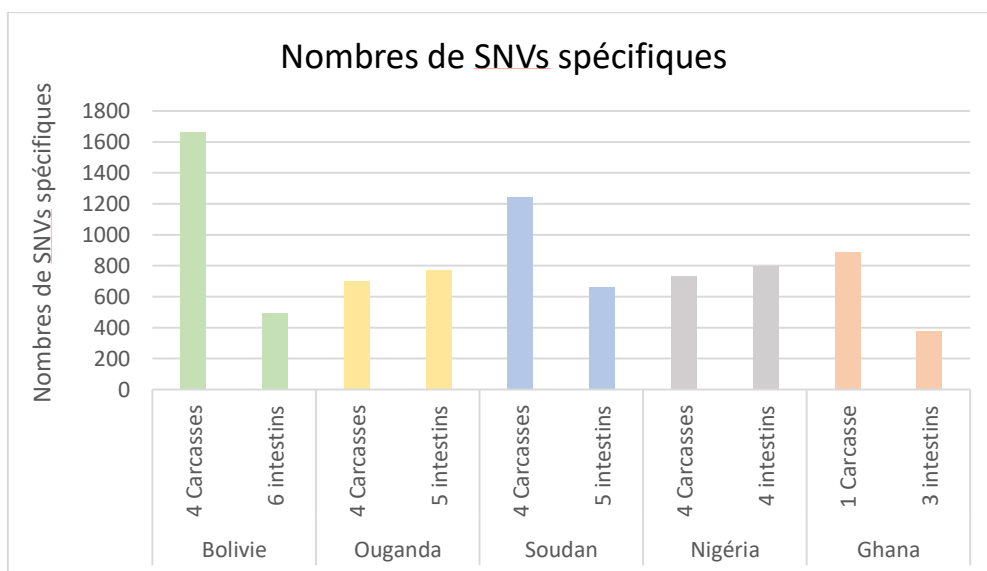


Figure 76 : Nombre de SNVs spécifiques des populations virales présentes dans les carcasses ou les intestins moyens (intestins) des moustiques pour chaque virus.

Enfin, par comparaison, nous avons étudié les mutations communes (à tous les réplicas) spécifiques des populations virales dans les carcasses (non présentes dans les réplicas d'intestin moyen) et les mutations communes (à tous les réplicas) spécifiques des populations virales dans les intestins moyens (présentes dans aucun des réplicas de carcasses).

Les SNVs communs à tous les réplicas et spécifiques d'un compartiment sont très rares.

On observe seulement 2 mutations synonymes majoritaires (fréquence > 0,1) sur les gènes NS2a et NS3, spécifiques des carcasses infectées avec YFV Bolivie (Tableau 8).

Tableau 8 : Liste des mutations communes à deux répliquas et spécifiques des carcasses de moustiques capables de sécréter le virus dans la salive (CS).

Virus	Gène	Position sur le génome	Nucléotide de références	Valeur de la couverture	Changement nucléotidique : position sur le gène: type de changement >AA: fréquence
YFV_Bolivie	NS2a	3901	T	3992.25	C:131:synonymous>L:0.17461
YFV_Bolivie	NS3	4711	C	6396.75	G:47:synonymous>V:0.16968

Avec YFV Nigeria, on observe, respectivement, 2 et 9 mutations synonymes minoritaires spécifiques des carcasses et spécifiques des intestins moyens mais leur fréquence est inférieure à notre seuil de détection des mutations minoritaires. Avec YFV Ouganda et YFV Soudan, on n'observe aucune mutation commune aux répliquas et spécifique de compartiment. Avec YFV Ghana, il n'y a qu'un seul échantillon de carcasse issus de moustique infecté ; il n'a donc pas été possible de faire la comparaison.

En conclusion, aucune différence significative entre les variants des différents compartiments, n'a été mise en évidence avec notre jeu de données.

9.1.4. Comparaison des populations virales dans les différents compartiments du moustique en fonction du statut infectieux

En restreignant la comparaison des populations virales des carcasses infectées aux seules populations virales des intestins moyens de moustiques ayant disséminé le virus (MD), on retrouve les mêmes résultats qu'en comparant la totalité des intestins moyens avec les carcasses (cf. paragraphe 5.3.4.).

Nous avons ensuite comparé les populations virales des intestins moyens des moustiques où le virus s'est disséminé (MD) avec les populations virales des intestins moyens des moustiques où le virus ne s'est pas disséminé (MND).

Pour YFV Soudan, une mutation synonyme C179F (fréquence=0,06308) sur NS5 a été détectée comme spécifique des populations virales des intestins moyens des moustiques n'ayant pas disséminé le virus.

Pour YFV Bolivie, la fréquence des quelques SNVs spécifiques observés est inférieure au seuil de 0,03 choisi pour la détection des mutations minoritaires. Ces SNVs n'ont pas été considérés.

Avec un seul échantillon d'intestin moyen disséminé (MD), infecté avec YFV Ouganda, il n'a pas été possible de faire cette comparaison.

Bien que le nombre de répliques soit limité à 2 dans cette catégorie, nous avons aussi comparé les populations virales des carcasses (CS) avec les populations virales des intestins moyens (MS), des moustiques capables de transmettre le virus (salive positive).

Pour YFV Bolivie, 2 mutations synonymes minoritaires et 2 mutations synonymes majoritaires ont été observées pour les carcasses (CS) (Tableau 9).

Tableau 9 : Liste des mutations virales, communes à deux répliques et spécifiques des carcasses de moustiques capables de sécréter le virus dans la salive (CS).

Virus	Gène	Position sur le génome	Nucléotide de références	Valeur de la couverture	Changement nucléotidique : position sur le gène : type de changement >AA: fréquence
YFV_Bolivie	NS2a	3934	A	1136.00	G:142:synonymous>R:0.06472
YFV_Bolivie	NS3	4684	G	4982.50	A:38:synonymous>R:0.15327
YFV_Bolivie	NS3	4711	C	5368.50	G:47:synonymous>V:0.09622
YFV_Bolivie	NS3	4732	G	6961.50	C:54:synonymous>V:0.10691

Pour YFV Ouganda et YFV Nigeria, les mutations observées étaient toutes de fréquence inférieure à notre seuil de détection des mutations minoritaires.

Pour YFV Soudan et YFV Ghana, le nombre de répliques n'était pas suffisant pour faire les comparaisons.

Bilan

L'analyse des populations virales dans les moustiques Morne-Rouge (Martinique) infectés avec 5 souches de YFV et examinées dans deux compartiments du moustique, intestin moyen et carcasse a permis de préciser que :

- les 4 YFV africains appartiennent à 2 lignées phylogénétiques distinctes, Afrique de l'Ouest et Afrique de l'Est et les populations virales qui en dérivent conservent leur spécificité phylogéographique ;
- les productions virales issues de cultures cellulaires dérivent très rapidement et deviennent très différentes des génomes de référence (Sanger). L'accumulation des SNVs concerne plutôt le gène NS5 pour YFV d'Afrique de l'Est et plutôt le gène E pour YFV Ghana (Afrique de l'Ouest) et la Bolivie. Peu de ces variants sont retrouvés dans les intestins moyens du moustique ;
- Le niveau de spécificité des populations virales peut être différent entre l'intestin moyen et la carcasse des moustiques, pour certains virus. Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de variants spécifiques communs à tous les réplicas, dans l'un ou l'autre de ces compartiments, pour les virus étudiés ;
- 35 mutations majoritaires partagées entre les carcasses et les intestins moyens ont été détectés et 9 d'entre elles sont absentes des populations virales issues des productions ;
- Enfin, aucun variant viral dans les intestins moyens n'a été identifié en lien avec la capacité de dissémination ou de transmission du virus ; mais en raison de l'absence d'échantillons, tous les cas de figure n'ont pu être étudiés.

Discussion générale

Au cours de cette étude, nous avons mesuré la compétence vectorielle de 14 populations d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* vis-à-vis de cinq souches de YFV. Nous avons ainsi démontré que : **(i)** les moustiques de la Martinique, de la Caraïbe et d'Amérique sont capable de transmettre 5 souches de YFV dès 14 jours après infection, **(ii)** YFV Ghana est la souche virale la moins bien transmise par les moustiques alors que YFV Ouganda et Bolivie sont les plus efficacement transmis et ceci quel que soit la population de moustiques analysées, **(iii)** il existe une corrélation positive entre le nombre de particules virales présentes dans un compartiment (intestin moyen ou carcasse) et le statut infectieux du moustique ; plus il y a de particules virales dans l'intestin moyen, plus le moustique sera apte à disséminer le virus dans la cavité générale et plus il y a de particules virales dans la carcasse du moustique et plus le moustique sera apte à transmettre le virus , **(iv)** la diversité virale observée dans l'intestin moyen est 40 à 100 fois moins importante que celle mesurée dans le repas infectieux proposé et **(v)** le moustique semble capable de sélectionner 9 variants viraux détectés dans l'intestin moyen, retrouvée dans la carcasse qui sont absents du repas infectieux.

L'émergence et la propagation des arbovirus ainsi que leurs vecteurs représentent un problème majeur de santé publique. Durant les quatre dernières décennies, nous avons dû faire face à une augmentation du nombre d'épidémies impliquant les arbovirus. En effet, l'incidence de la dengue a significativement augmenté avec une co-circulation des quatre sérotypes (22) ; (255). D'autres virus tels que le CHIKV ou le ZIKV ont vu leurs aires de répartition s'étendre de manière spectaculaire affectant des régions et territoires jusqu'ici totalement indemne. En une dizaine d'années à peine, ces virus originaires d'Afrique et d'Asie du Sud-Est ont émergé sur les cinq continents. Les perturbations des écosystèmes et l'intensification des échanges internationaux à l'origine de l'expansion des espèces vectrices *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* ont largement contribué à la dissémination mondiale de ces virus augmentant ainsi les contacts « hôte-pathogène » et « vecteur-pathogène » dans différentes régions du monde. Dans ce contexte, les Amériques et la Caraïbe ont subi des vagues successives d'émergence : le CHIKV en 2013 (35) et le ZIKV en 2015 (36), causant ainsi plus de 1 379 788 cas pour le CHIKV (et plus de 559 721 cas pour le ZIKV). Ces épisodes épidémiques ont mis en lumière l'importance de l'étude des maladies à transmission vectorielle et éveillé la crainte qu'un autre arbovirus, le virus de la fièvre jaune, n'émerge

dans la Caraïbe comme par le passé. A l'exception de l'île de Trinidad en 1979, la Caraïbe n'a plus été le théâtre d'épidémies de fièvre jaune depuis les années 50. Cependant aujourd'hui, un risque d'introduction du YFV dans les îles n'est plus à exclure, à l'image de ce qui s'est passé pour CHIKV et ZIKV. Nos travaux nous ont naturellement conduits à poser la question du risque de réémergence de la fièvre jaune dans la Caraïbe. C'est dans ce contexte que se sont effectués ces travaux de thèse qui avaient pour but d'étudier la compétence vectorielle des moustiques de la Caraïbe et des Amériques vis-à-vis du YFV.

Compétence vectorielle des populations de la zone caraïbienne pour le YFV

En analysant la compétence vectorielle de 14 populations de moustiques récoltées dans les îles de la Caraïbe (9 populations d'*Ae. aegypti* de Martinique, 4 populations d'*Ae. aegypti* de la Caraïbe et 1 population d'*Ae. albopictus* de la Caraïbe), infectées avec cinq souches de YFV, nos résultats ont montré pour la première fois que les populations de la Martinique et de la Caraïbe sont fortement réceptives et compétentes pour les souches de YFV américaines et africaines à l'exception de la souche provenant du Ghana. Nous avons également montré que pour YFV Bolivie, les populations de la Caraïbe sont capables de transmettre le virus dès 14 jours post-infection. Il a déjà été démontré que les moustiques provenant de la Guadeloupe étaient capables de transmettre une souche de YFV du génotype Amérique I (YFV-4408 lignée 1E) dès 14 jours post-infection (27). Par ailleurs, pour les trois souches virales d'origine africaine (YFV Nigéria, Soudan et Ouganda), presque toutes les populations de la Martinique sont capables de les transmettre dès 14 jours post-infection. Ainsi, les populations d'*Ae. aegypti* testées provenant de la Caraïbe sont capables de transmettre 6 des 7 génotypes décrits de YFV (à l'exception du génotype Angola). L'introduction d'une souche virale pourrait se matérialiser *via* des cas importés d'Amérique du Sud ou d'Afrique subsaharienne. De façon surprenante, la population de moustiques de Tartane est capable de transmettre le YFV Bolivie dès 7 jours post-infection suggérant une période d'incubation extrinsèque courte, d'une durée inférieure à 7 jours comme cela a été démontré pour les *Ae. aegypti* du Congo et du Brésil pour le génotype Américain I (28). Pour toutes les populations de moustiques testées les taux d'infection et de dissémination observés à 21 jours post-infection sont supérieurs à ceux observés 14 jours post-infection suggérant que le risque de transmission pourrait augmenter avec le temps.

Dans notre étude, nous avons également étudié la compétence vectorielle de deux populations d'Amérique (Gainesville/USA et Nor-Oriental/Colombie). Nous avons montré que ces deux populations sont compétentes pour YFV Bolivie dès 14 jours post-infection (Annexe 4). A 21 jours post-infection, la population de Gainesville semblait plus réceptive que la population Nor-Oriental avec un taux d'infection presque 2 fois plus élevée. Les deux populations disséminaient les virus de façon comparable mais différaient dans leur capacité à transmettre les 5 YFV. La population de Colombie (Nor-Oriental) transmet très bien le YFV Bolivie. En effet, cette population est issue d'une zone endémique pour la fièvre jaune, où on a assisté à une recrudescence des cas de fièvre jaune lors des épidémies de 2016-2017 et 2018-2019. De plus, des moustiques naturellement infectés par le YFV, la DENV, le CHIKV ont été détectés dans les villes et les zones rurales en Colombie (277). La population de Gainesville est également capable de transmettre le YFV Bolivie. Compte-tenu de la plus forte réceptivité de ces deux populations pour le YFV Bolivie, on peut émettre l'hypothèse que l'introduction de YFV Bolivie pourrait vraisemblablement conduire à une réémergence de la fièvre jaune en Colombie et émergence de la maladie en Amérique du Nord.

Le moustique *Ae. albopictus* s'est installé en Amérique du Nord depuis 1985 (167). Depuis 1993, sa présence est observée dans certaines îles de la Caraïbe (la République Dominicaine (172) ; la Barbade (264) ; les îles Cayman (261) ; Cuba (263) ; la Trinidad (266) ; la Jamaïque (265). Aujourd'hui, cette espèce est présente dans sept îles de la Caraïbe dont Haïti (262) et sa progression dans la région laisse présager qu'*Ae. albopictus* atteindra toutes les îles dans les prochaines décennies. Bien qu'*Ae. aegypti* soit le seul vecteur impliqué dans la transmission du YFV urbaine, nous avons montré pour la première fois que l'espèce *Ae. albopictus* de Haïti était parfaitement compétente pour quatre souches de YFV (Nigéria, Ouganda, Soudan et Bolivie). De manière surprenante, *Ae. albopictus* est plus compétent qu'*Ae. aegypti* pour le YFV Bolivie avec une transmission dès 14 jours post-infection, *Ae. aegypti* ne transmettant qu'à 21 jours post-infection. De plus, *Ae. albopictus* présente une compétence vectorielle plus élevée pour YFV Nigéria et YFV Soudan à 21 jours post-infection démontrant ainsi le rôle potentiel d'*Ae. albopictus* dans la transmission du YFV dans la Caraïbe et probablement, en Amérique. En effet, *Ae. albopictus* de Colombie est aussi capable de transmettre le YFV Bolivie dès 14 jours post-infection. De plus, cette espèce est également réceptive à l'infection par les 4 YFV africains et capable de transmettre YFV Ouganda, YFV Nigéria et Soudan (Annexe 5). Ces résultats corroborent des études précédentes menées sur les populations d'*Ae.*

albopictus du Brésil qui démontraient la capacité d'*Ae. albopictus* à transmettre efficacement des souches américaine et africaine de YFV (28) ; (146).

L'île de Trinidad est la seule île de la Caraïbe où est présente une souche de YFV de génotype Amérique I qui circule principalement au sein d'un cycle selvatique depuis 1838. Les moustiques vecteurs *Haemagogous spp* et le réservoir animal, le singe *Alouatta spp* sont également présents sur l'île et sont les mêmes que ceux intervenant dans le maintien du virus dans le cycle selvatique du Brésil. *Ae. aegypti* est présent sur l'île depuis le 17^{ème} siècle et *Ae. albopictus* s'y est établi depuis 2002, montre la présence de tous les acteurs du cycle de transmission du YFV à la Trinidad. Toutefois, à ce jour, aucune étude de compétence vectorielle n'a été menée sur ces moustiques à Trinidad. Il serait fortement recommandé de réaliser des évaluations de compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* pour le virus de génotype Américain I présent sur l'île mais également avec les virus utilisés dans cette étude. En effet en 1989, le virus est sorti du cycle sauvage et a diffusé en Amérique Sud (250). Il a déjà été montré qu'*Ae. albopictus* du Brésil était compétent pour YFV (28) et des moustiques de cette espèce infectés par YFV ont été retrouvés jusqu'à 400m à l'intérieur des forêts du Brésil suggérant qu'*Ae. albopictus* pourrait selon toute vraisemblance jouer le rôle de vecteur relai entre le cycle selvatique/sauvage et le cycle urbain/humain, favorisant ainsi la sortie du virus de la forêt (252).

En cas d'épidémie avérée, la circulation des YFV au sein de la Caraïbe pourrait également représenter un danger pour les régions d'Europe infestées par *Ae. albopictus*. En effet, cette espèce est présente en Europe depuis 1979 (169) et en France depuis 2004 (278). Aujourd'hui, cette espèce est présente dans 25 pays d'Europe (279) et 67 départements de France (Ministère des Solidarités et de la Santé, 2022 ; <https://solidarites-sante.gouv.fr/sante-et-environnement/risques-microbiologiques-physiques-et-chimiques/especes-nuisibles-et-parasites/article/cartes-de-presence-du-moustique-tigre-aedes-albopictus-en-france-metropolitaine>). En effet, des cas de fièvre jaune importés depuis l'Amérique du Sud ont été recensés en Europe entre 2016 et 2018, notamment en France (2), au Danemark (2), en Suisse (1), en Roumanie (1) aux Pays-Bas (1) et au Royaume Unis (1). Sur l'ensemble de ces cas importés, on a noté trois décès (83). Il a été également démontré qu'*Ae. albopictus* de France était capable de transmettre efficacement le YFV provenant du Sénégal dès 14 jours après

infection (280). Le risque pour la France métropolitaine et l'Europe serait particulièrement élevé en cas d'une épidémie de YFV dans la zone caraïbienne en raison des nombreux échanges commerciaux et touristiques avec la Caraïbe. Ce scénario rappelle qu'*Ae. albopictus* est capable de maintenir une transmission local du DENV (281) et du CHIKV (33) en Europe.

En comparant toutes les populations de la Caraïbe (y compris celles de la Martinique) et les populations d'Amérique, nous avons mis en évidence des différences d'infection, de dissémination et de transmission entre les populations. Toutes les populations sont compétentes pour YFV Bolivie et YFV Ouganda mais peu le sont pour YFV Ghana suggérant que les deux premiers virus possèdent le potentiel pour initier une épidémie et se propager dans toute la Caraïbe à la différence de YFV Ghana. Ces résultats suggèrent qu'après l'arrivée de la fièvre jaune en Amérique depuis la côte ouest d'Afrique, le virus aurait co-évolué avec les moustiques américains créant ainsi une meilleure adaptation du virus aux moustiques, puis probablement une meilleure compétence vectorielle pour YFV de génotype américain (282). YFV Ghana ne produit pas le même phénotype que YFV Bolivie même si ces deux virus proviennent d'un ancêtre commun, ces deux génotypes ayant divergé il y a plus de 400 ans (78) ; (283). YFV Ghana correspond à la souche Asibi qui a été isolé d'un patient au Ghana en 1927. Max Theiler et Hugh H. Smith ont utilisé la souche Asibi pour fabriquer le vaccin 17D après atténuation de Asibi par passages sur macaques rhésus, sur souris puis sur œufs embryonnés de poulet (284). En 1937, la souche vaccinale 17D de la Fondation Rockefeller a été obtenue, et il reste le seul vaccin utilisé à ce jour contre YF, induisant une immunité forte et durable (une seule injection peut protéger toute une vie) et surtout, une très bonne tolérance. En 1951, Max Theiler a reçu le prix Nobel pour ses travaux sur le vaccin 17D (285). Le vaccin 17D parvient difficilement à infecter l'intestin moyen d'*Ae. aegypti*, ne dissémine pas dans d'autres tissus et ne parvient pas à être transmis (286). On détecte environ 75 mutations de différence entre la souche Asibi et La souche vaccinale 17D dont 14 non synonymes ; 7 mutations non synonymes sont situées dans le domaine III de la protéine d'enveloppe qui affecteraient le processus d'internalisation à la surface des cellules de l'intestin moyen de *Ae. aegypti* (286). La souche YFV Ghana identifié comme étant la souche Asibi pourrait avoir la propriété intrinsèque d'infecter faiblement le moustique, facilitant le processus d'atténuation conduisant au vaccin 17D.

Au cours du travail de thèse, nous avons également mis en évidence des variations importantes d'efficacité de transmission : (i) entre populations d'*Ae. aegypti* d'une même île (Martinique), (ii) entre populations de différentes îles de la Caraïbe, (iii) entre populations des îles et du continent, et (iv) entre *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. Nos résultats suggèrent que le génotype du moustique joue un rôle déterminant dans la compétence vectorielle. Aujourd'hui, il est largement admis que la compétence vectorielle dépend du génotype du virus, du génotype du moustique et de leurs interactions (connu sous le terme : interaction $G_{\text{moustique}} \times G_{\text{virus}}$), favorisant une adaptation locale des lignées virales avec les populations de moustiques (138); (287) ; (288). A la Martinique, il a été démontré que les moustiques *Ae. aegypti* présentaient une réceptivité différente au DENV-2 (149). La caractérisation génétique des populations d'*Ae. aegypti* au moyen de différents marqueurs moléculaires (microsatellites, SNP,..) pourrait contribuer à définir la structure génétique des moustiques et l'impact sur la compétence vectorielle (150) ; (289).

Il est par ailleurs démontré que les facteurs environnementaux ont un impact sur la compétence vectorielle (connu sous le terme : interaction $G_{\text{moustique}} \times G_{\text{virus}} \times G_{\text{environnement}}$) (142) ; (290). Les facteurs environnementaux comprennent des facteurs biotiques et abiotiques. Parmi les facteurs biotiques, on compte la nature du lieu de développement des stades immatures du moustique, la nature du suc des plantes dont s'alimentent les adultes de moustiques, et la nature du sang absorbé (291). Les micro-organismes présents dans l'eau du gîte, le suc et le sang absorbé peuvent modifier la composition du microbiote intestinal, affectant ainsi la compétence vectorielle. Parmi les facteurs abiotiques, la température joue un rôle prépondérant (292). Le climat dans la région Caraïbe est tropical avec des températures hautes et stables. Néanmoins, il peut y avoir des microclimats selon la topographie de l'île) pouvant influencer sur la biologie du moustique et donc la transmission des virus. Par ailleurs, l'exposition aux toxiques tels que les insecticides peuvent affecter la compétence vectorielle (293). Ainsi depuis les années 1940, la Caraïbe et l'Amérique ont été exposés à des traitements massifs d'insecticides pour contrôler les épidémies de paludisme, de fièvre jaune et de dengue. Le premier insecticide chimique, le DDT fut largement utilisé afin d'éradiquer les moustiques *Anopheles darlingi* et *Ae. aegypti* a développé de forts niveaux de résistance aux insecticides et notamment à la Martinique (196) ; (267) ; (268). Il a été démontré qu'une relation positive peut s'établir entre la compétence vectorielle et les gènes de résistance aux insecticides aussi bien pour les parasites tel que *Plasmodium* (294) que pour les arbovirus tel que le DENV (295) ; (296) ou le ZIKV (297) ; (298) chez *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus*. Ces

résultats ne sont pas généralisables car on peut observer une absence d'effets (299) ou un effet négatif des gènes de résistances sur la compétence vectorielle (299) (300) ; (301). Ces points pourront être examinés pour les moustiques de Martinique infectés par YFV.

Impact des barrières anatomiques sur les virus dans le moustique

Les barrières anatomiques présentes dans les moustiques constituent des facteurs déterminants pour la compétence vectorielle. Après la prise de sang infecté, le virus doit pénétrer dans la cellule épithéliale de l'intestin moyen, se multiplier puis franchir la lame basale pour être libéré dans la cavité générale du moustique. Les points de blocage se situent à l'entrée et à la sortie de l'intestin moyen. Dans la cavité générale, le virus infecte les organes internes avant d'atteindre les glandes salivaires. Le virus doit ainsi pénétrer dans la glande salivaire, s'y multiplier puis être libéré dans la salive excrétée par le moustique lors de la piqûre. De la même manière, les points de blocage sont à l'entrée et à la sortie des glandes salivaires (92). Ces deux barrières utilisent différents mécanismes de réponses immunitaires antivirales pour contenir l'infection (122).

Nos résultats ont montré que de manière générale les valeurs de transmission (TR~35%, TE~30%) sont plus faibles que les valeurs de dissémination (DR~50-95%, DE~50-90%) et les valeurs de dissémination restent proches de celles de l'infection (IR~45-95%). La même tendance a été observée pour le nombre de particules virales contenues dans l'intestin moyen ($\sim 10^3$ - 10^5), la carcasse ($\sim 10^3$ - 10^5) et les salives (~ 10 - 10^3). Ce résultat indique un rôle plus significatif des glandes salivaires dans le blocage et la rétention des particules virales que l'intestin moyen et de ce fait, un rôle clé des glandes salivaires dans la modulation et la limitation de la transmission du YFV par *Ae. aegypti*. En s'aidant d'une approche transcriptomique combinée à une visualisation par microscopie confocale, il serait possible d'identifier les gènes modulés par l'infection par YFV.

Pour préciser l'impact de ces barrières anatomiques dans la modulation de la compétence vectorielle, nous avons déterminé un seuil de particules virales à partir duquel il serait possible de prédire le statut du vecteur. En effet, même s'il est communément admis que l'infection du vecteur dépend de la quantité de particules virales ingérées (302), très peu de

travaux permettent de déterminer un seuil de particules nécessaire et suffisant pour franchir les différentes étapes menant à la transmission du virus par le vecteur (303) ; (158) ; (288). En tenant compte de l'ensemble de nos résultats sans considérer l'origine de la population de moustique ni celle de la souche de YFV, il n'a pas été possible de déterminer une valeur de seuil nécessaire et suffisant pour le passage d'un compartiment à l'autre (intestin moyen, carcasse, salive). Nous avons, de ce fait, réalisé une analyse en tenant compte du statut du moustique (avec/sans dissémination, avec/sans transmission). Pour les populations de la Martinique, nous avons déterminé une corrélation positive entre le nombre de particules virales dans l'intestin moyen et la carcasse, entre le nombre de particules virales dans la carcasse et la salive et entre le nombre de particules virales entre le tube digestif et la salive. Ces résultats suggèrent qu'il existe une relation entre le nombre de particules virales présent dans un compartiment et la capacité de ces particules virales à passer au compartiment suivant permettant ainsi de prédire si les moustiques peuvent disséminer ou transmettre le virus. Il serait indiqué d'approfondir davantage la question en analysant plus de moustiques pour chaque virus (303).

Diversité des populations virales contenues dans chaque compartiment du moustique

Au passage d'une barrière anatomique, en plus de la quantité de virus, la diversité virale est également affectée. En effet, le passage de l'intestin moyen et des glandes salivaires induit deux goulots d'étranglement ou « bottlenecks » où seuls les variants viraux les plus adaptés passent les barrières de l'intestin moyen et des glandes salivaires afin être transmis (39). Ce phénomène a été démontré pour le VEEV (304) ; (305) ; plus une population virale présente une diversité élevée, plus elle sera apte à disséminer dans le moustique. Le passage des barrières anatomiques contribuerait alors à la sélection des variants ayant le meilleur potentiel épidémique comme cela a été montré pour le CHIKV chez *Ae. albopictus* ; (306). Le rôle des barrières anatomiques peut être mis en évidence en étudiant les paramètres de la compétence vectorielle (comme vu précédemment) ou en étudiant la diversité virale présente dans chacun des compartiments. Dans notre étude, nous avons utilisé la technique du « deep sequencing » pour déterminer la diversité génétique présente dans les productions de chaque virus, dans l'intestin moyen et la carcasse. Les populations virales dans la salive ont été examinées de la même manière mais en y ajoutant une étape préliminaire d'amplification par la méthode MALBAC. Nos résultats ont montré un très grand nombre de SNVs dans les productions virales (par rapport à une séquence de référence), la majorité étant des mutations synonymes.

Cela indique une dérive génétique aléatoire très rapide dans les productions virales. En étant cultivées sur des cellules C6/36 d'*Ae. albopictus* déficientes pour la voie antivirale ARNi (307), les productions virales n'ont pas subi de contrainte évolutive. Les YFV venant d'Afrique de l'Ouest (YFV Ghana) et YFV Bolivie accumulent des mutations préférentiellement dans le gène codant la protéine NS5 alors que les YFV venant d'Afrique de l'Est (YFV Soudan et Ouganda) accumulent des mutations dans le gène codant pour la protéine E suggérant un profil mutationnel spécifique de la zone géographique.

De manière surprenante, nos résultats ont révélé un hot spot de mutations dans le gène codant la protéine prM pour le YFV Ghana. La majorité de ces mutations (58 mutations) étaient des mutations non synonymes (31 mutations) dont 22 mutations possédant des fréquences $>$ à 90%. Dans nos analyses de compétence vectorielle, le YFV Ghana était le virus le moins performant et présentait des taux d'infection, de dissémination et de transmission les plus bas et cela, quel que soit la population de moustique ou l'espèce utilisée. La protéine prM (pré-membrane) est présente sur les virions au stade immature et non-infectieux. Cette protéine prM agit comme une chaperonne de la protéine E en protégeant la boucle de fusion de la protéine E des changements de conformation induit par le pH acide de l'environnement du Golgi et de l'endosome. La protéine prM va ainsi prévenir la fusion membranaire prématuré. Lors de la maturation de la prM en protéine M dans le Golgi, grâce à l'augmentation du pH, la protéase furine va induire une dissociation des hétérodimères de prM-E et la formation d'homodimères de E à la surface du virion. La protéine prM sera alors libérée simultanément avec le virion dans le milieu extracellulaire qui sera libéré par exocytose, ne laissant que la protéine M enchâssée dans la membrane. Dans notre étude, nous pouvons imaginer que les mutations non-synonymes retrouvées dans séquence virale codant pour la prM pourraient avoir un impact sur la conformation de cette protéine et masquer le site catalytique utilisé par la protéase furine en empêchant la dissociation des hétérodimères de prM-E induit par le changement de pH dans le Golgi. La maturation du virion serait ainsi stoppée et les virions bloqués dans la cellule au niveau du réticulum endoplasmique ou du de l'appareil de Golgi.

Une autre hypothèse pourrait être que les mutations non-synonymes présentes dans la séquence virale codant pour la prM pourraient avoir un impact sur la conformation de la prM en permettant à la protéine de rester attachée à la protéine M après l'exocytose du virion aboutissant ainsi à une particule virale immature incapable de fusionner avec la membrane d'une nouvelle cellule. La présence de la prM empêcherait l'interaction de la protéine M avec la protéine C en bloquant le changement conformationnel de la protéine E, la formation de la

boucle de fusion hydrophobe et la fusion des membranes. On pourrait envisager d'étudier plus spécifiquement la prM mutée, sa conformation, ses interactions avec la protéine E et le complexe prM-E en analysant leur dichroïsme circulaire et en utilisant des tests calorimétriques, la spectrométrie de masse, d'immunoprécipitation et des techniques d'imagerie.

Des 3728 mutations accumulées dans toutes les productions virales utilisées, seules 530 étaient retrouvées dans les intestins moyens représentant 40 à 100 fois moins de mutations que dans les productions. Parmi ces 530 mutations, seulement 12 mutations étaient spécifiques des tubes digestifs avec des fréquences > 90%. Cependant, dans notre analyse nous n'avions qu'un réplica par production virale induisant une analyse moins précise des mutations communes aux productions et aux intestins moyens ; l'utilisation de plusieurs réplicas de productions virales aurait permis d'affiner et de confirmer le nombre et l'identité des SNVs communs ou différentes entre les productions, les intestins moyens et les carcasses. Par ailleurs, l'analyse des échantillons a été faite sur des moustiques examinés à 21 jours post-infection. Les mutations détectées dans les intestins moyens étaient probablement les variants les plus aptes à se répliquer, ce qui pourrait être à l'origine de l'écart en nombres de SNVs entre les productions virales et les intestins moyens. Comparer la diversité des productions virales avec celles retrouvées dans les intestins moyens à des temps post-infection plus précoces aurait été informatif afin de suivre l'évolution des populations virales.

Nous avons également détecté 35 mutations majoritaires, partagées par les intestins moyens et les carcasses. Cependant, neuf d'entre elles sont absentes des productions virales suggérant que ces dernières auraient été générés après le passage de la barrière de l'intestin moyen. Enfin, nous n'avons pas détecté de variants viraux dans les intestins moyens, en lien avec la capacité de dissémination ou de transmission du virus. Cependant, nous n'avions que très peu de réplicas à analyser, ce qui représente une des limites de notre étude. Nous pourrions également comparer la diversité virale à différents temps post-infection pour une même population de moustique infectée par différents virus dans un premier temps et dans un second pour différentes populations de moustique infectées par un seul virus. En ce qui concerne la diversité virale contenue dans la salive, le nombre de reads obtenus après amplification par la méthode MALBAC n'a pas été suffisant pour analyser la diversité virale ; nous avons utilisé 15 µl du mélange de salive de moustique (5µl de salive dans 45µl de SVF) comprenant souvent très peu de particules virales.

La fièvre jaune est absente de la Caraïbe

Les moustiques de la Caraïbe sont compétents pour les cinq génotypes de YFV. *Ae. aegypti* est présent en fortes densités presque toute l'année et le virus circule sur l'île de la Trinidad et en Amérique du Sud dans un cycle selvatique. La présence d'un second vecteur *Ae. albopictus* également compétent pour YFV qui tend à coloniser les îles et l'Amérique augmente également les risques d'émergence. Malgré des signaux d'alerte, la fièvre jaune demeure absente dans les îles, cette situation n'étant pas sans rappeler observée en Asie où tous les paramètres sont également réunis pour l'établissement d'un cycle de YFV (308) ; (26). Différentes hypothèses peuvent être ainsi émises pour expliquer cette situation paradoxale.

Bien que la fièvre jaune soit absente de la Caraïbe, les personnes venant des pays endémiques pour la maladie (la Guyane, l'Amérique du Sud, l'Afrique ou la Trinidad) doivent obligatoirement se faire vacciner dès l'âge de 1 an afin de prévenir tout risque épidémique. En outre, les personnes qui s'aventurent dans les régions endémiques pour la fièvre jaune doivent également être vaccinées contre la maladie. La couverture vaccinale induite serait ainsi suffisante pour la protection de la population locale contre l'installation de la fièvre jaune dans la Caraïbe. Le nombre de cas importés de fièvre jaune serait alors insuffisant pour initier une épidémie (309) .

Les moustiques de la Caraïbe sont compétents pour les cinq génotypes de YFV mais la transmission demeure faible (entre 0% et 40%). La présence d'autres flavivirus tels que le DENV et le ZIKV pourraient affecter la transmission du YFV par ces vecteurs. En effet, les moustiques peuvent être coinfectés par plusieurs arbovirus et les transmettre en même temps à l'homme (310) ; (165). Les YFV, ZIKV et DENV sont tous les trois des flavivirus et peuvent donc utiliser les mêmes ressources et les mêmes mécanismes (*e.g.* réponses antivirales) pour assurer leur réplication. Les résultats dans la littérature sont parfois contradictoires (311), appelant à approfondir la question.

L'omniprésence de la dengue dans la Caraïbe peut protéger la population d'une infection par le YFV, tous deux étant des flavivirus qui présentent une structure et un cycle viral quasiment identique. De plus, dans la Caraïbe, les épidémies de dengue surviennent tous les six mois à douze mois, ce qui aurait pour effet de maintenir une immunité collective relativement élevée qui protégerait même partiellement la population d'une infection par le YFV.

Conclusion

En conclusion, nous avons réalisé l'étude la plus complète sur la compétence vectorielle de 14 populations de la Caraïbe et deux populations d'Amérique analysée pour cinq génotypes de YFV. Nos résultats ont montré que les populations de la Caraïbe sont compétentes pour quatre souches de YFV (Bolivie, Ouganda, Nigéria et Soudan), et les populations d'Amérique pour 2 ou 3 souches de YFV (Bolivie, Nigéria et Ouganda), dès 14 jours post-infection. De plus, la période d'incubation extrinsèque (PIE) serait comprise entre 7 et 14 jours post-infection. Le YFV Ghana est le virus le moins performant avec les taux d'infection, dissémination et transmission les plus faibles (seuls trois moustiques sur 688 pouvaient transmettre ce virus), indiquant ainsi un très faible potentiel épidémique. Nous avons démontré qu'*Ae. albopictus* pouvait transmettre le YFV et ainsi intervenir comme vecteur secondaire ou vecteur relais entre le cycle selvatique et le cycle urbain.

Dans la Caraïbe, le risque d'introduction du YFV n'est pas négligeable et les cas importés peuvent venir d'Afrique (e.g. YFV Ouganda ou Nigéria) et d'Amérique (e.g. YFV Bolivie). Les populations d'*Ae. aegypti* sont compétentes pour YFV et les nombres de particules virales excrétés dans les salives des moustiques peuvent être supérieurs à 2000 particules avec toutefois des taux de transmission n'excédant pas 40%. Néanmoins, la compétence vectorielle est un paramètre qui doit être considéré en association avec d'autres facteurs tels que les densités de vecteurs, les préférences trophiques des vecteurs, le taux de survie des moustiques, la proportion de la population immunologiquement naïve et les conditions environnementales. Un plan d'actions devra être éprouvé en prévision d'une émergence ; le dépistage précoce des malades associé à l'isolement précoce des cas (importés et autochtones), le contrôle des vecteurs et la mise en place de campagnes de vaccination sont des actions qui devront être réalisées en coordination entre les différentes équipes.

Références bibliographiques

1. V. Houe, M. Bonizzoni, A. B. Failloux, Endogenous non-retroviral elements in genomes of *Aedes* mosquitoes and vector competence. *Emerg Microbes Infect* **8**, 542-555 (2019).
2. W. S. Lee, J. A. Webster, E. T. Madzokere, E. B. Stephenson, L. J. Herrero, Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasit Vectors* **12**, 165 (2019).
3. F. Douam, A. Ploss, Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol* **26**, 913-928 (2018).
4. H. Lecoq, [Discovery of the first virus, the tobacco mosaic virus: 1892 or 1898?]. *C R Acad Sci III* **324**, 929-933 (2001).
5. A. van Kammen, Beijerinck's contribution to the virus concept--an introduction. *Arch Virol Suppl* **15**, 1-8 (1999).
6. N. Sankaran, On the historical significance of Beijerinck and his contagium vivum fluidum for modern virology. *Hist Philos Life Sci* **40**, 41 (2018).
7. C. H. Calisher, A very brief history of arbovirology, focusing on contributions by workers of the Rockefeller foundation. *Vector Borne Zoonotic Dis* **5**, 202-211 (2005).
8. A. N. Clements, R. E. Harbach, History of the discovery of the mode of transmission of yellow fever virus. *J Vector Ecol* **42**, 208-222 (2017).
9. S. C. Weaver, W. K. Reisen, Present and future arboviral threats. *Antiviral Res* **85**, 328-345 (2010).
10. WHO. (2020a).
11. M. G. Guzman *et al.*, Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol* **8**, S7-16 (2010).
12. O. J. Brady *et al.*, Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1760 (2012).
13. S. Bhatt *et al.*, The global distribution and burden of dengue. *Nature* **496**, 504-507 (2013).
14. R. N. Charrel, X. de Lamballerie, D. Raoult, Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases. *N Engl J Med* **356**, 769-771 (2007).
15. C. N. Peyrefitte *et al.*, Chikungunya virus, Cameroon, 2006. *Emerg Infect Dis* **13**, 768-771 (2007).
16. S. AbuBakar *et al.*, Reemergence of endemic Chikungunya, Malaysia. *Emerg Infect Dis* **13**, 147-149 (2007).

17. M. R. Duffy *et al.*, Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* **360**, 2536-2543 (2009).
 18. S. Iloos *et al.*, Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* **44**, 302-307 (2014).
 19. PAHO. (2021 a).
 20. F. Rodhain, [Arboviruses also have an American dream]. *Bull Soc Pathol Exot* **110**, 147-159 (2017).
 21. S. p. France, Surveillance des arboviroses Guadeloupe, Martinique, Saint-Martin, Saint-Barthélemy. Situation épidémiologique - juillet 2022 (2022).
 22. R. J. Quénel P, Cassadou S, Ardillon V, Blateau A, Matheus S, Chappert JL, Flamand C, Carvalho L, Cardoso T, Chaud P, Dussart P, Ledrans M, Épidémiologie de la dengue dans les Départements français d'Amérique. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire* **33-34**, 358-363 (2011).
 23. P. (2016), Pan American Health Organization, World Health Organization.
- Chikungunya: PAHO/WHO data, maps, and statistics. . (2015).
24. PE/CIRE. (2017).
 25. PAHO. (2018).
 26. S. Wasserman, P. A. Tambyah, P. L. Lim, Yellow fever cases in Asia: primed for an epidemic. *Int J Infect Dis* **48**, 98-103 (2016).
 27. P. S. Yen, F. Amraoui, A. Vega Rua, A. B. Failloux, *Aedes aegypti* mosquitoes from Guadeloupe (French West Indies) are able to transmit yellow fever virus. *PLoS One* **13**, e0204710 (2018).
 28. D. Couto-Lima *et al.*, Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep* **7**, 4848 (2017).
 29. F. Amraoui *et al.*, Experimental Adaptation of the Yellow Fever Virus to the Mosquito *Aedes albopictus* and Potential risk of urban epidemics in Brazil, South America. *Sci Rep* **8**, 14337 (2018).
 30. D. J. Gubler, Human arbovirus infections worldwide. *Ann N Y Acad Sci* **951**, 13-24 (2001).
 31. D. J. Gubler, The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res* **33**, 330-342 (2002).
 32. R. Angelini *et al.*, An outbreak of chikungunya fever in the province of Ravenna, Italy. *Euro Surveill* **12**, E070906 070901 (2007).
 33. G. Rezza *et al.*, Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* **370**, 1840-1846 (2007).
 34. ECDC. (2020, 17 aug. 2020).

35. S. Yactayo, J. E. Staples, V. Millot, L. Cibrelus, P. Ramon-Pardo, Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *J Infect Dis* **214**, S441-S445 (2016).
36. N. R. Faria *et al.*, Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science* **352**, 345-349 (2016).
37. C. C. Anez G., Grinev A. , Rios M. , Dengue virus and other arboviruses: a global view of risks. *ISBT Science Series* **7**, 274-282 (2012).
38. J. W. Drake, J. J. Holland, Mutation rates among RNA viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 13910-13913 (1999).
39. L. L. Coffey, N. Forrester, K. Tsetsarkin, N. Vasilakis, S. C. Weaver, Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol* **8**, 155-176 (2013).
40. E. Domingo, C. Perales, Viral quasispecies. *PLoS Genet* **15**, e1008271 (2019).
41. D. Vijaykrishna, R. Mukerji, G. J. Smith, RNA Virus Reassortment: An Evolutionary Mechanism for Host Jumps and Immune Evasion. *PLoS Pathog* **11**, e1004902 (2015).
42. N. Marshall, L. Priyamvada, Z. Ende, J. Steel, A. C. Lowen, Influenza virus reassortment occurs with high frequency in the absence of segment mismatch. *PLoS Pathog* **9**, e1003421 (2013).
43. S. M. McDonald, M. I. Nelson, P. E. Turner, J. T. Patton, Reassortment in segmented RNA viruses: mechanisms and outcomes. *Nat Rev Microbiol* **14**, 448-460 (2016).
44. A. A. Sall *et al.*, Genetic reassortment of Rift Valley fever virus in nature. *Journal of Virology* **73**, 8196-8200 (1999).
45. K. Nomikou *et al.*, Widespread Reassortment Shapes the Evolution and Epidemiology of Bluetongue Virus following European Invasion. *PLoS Pathog* **11**, e1005056 (2015).
46. A. Onafuwa-Nuga, A. Telesnitsky, The remarkable frequency of human immunodeficiency virus type 1 genetic recombination. *Microbiol Mol Biol Rev* **73**, 451-480, Table of Contents (2009).
47. S. C. Weaver *et al.*, Recombinational history and molecular evolution of western equine encephalomyelitis complex alphaviruses. *J Virol* **71**, 613-623 (1997).
48. M. P. Zwart, S. F. Elena, Matters of Size: Genetic Bottlenecks in Virus Infection and Their Potential Impact on Evolution. *Annu Rev Virol* **2**, 161-179 (2015).
49. S. C. Weaver, Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr Top Microbiol Immunol* **299**, 285-314 (2006).
50. N. L. Forrester, L. L. Coffey, S. C. Weaver, Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses* **6**, 3991-4004 (2014).

51. Y. Y. Go, U. B. Balasuriya, C. K. Lee, Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res* **3**, 58-77 (2014).
52. D. Fontenille, M. Diallo, M. Mondo, M. Ndiaye, J. Thonnon, First evidence of natural vertical transmission of yellow fever virus in *Aedes aegypti*, its epidemic vector. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **91**, 533-535 (1997).
53. B. J. Beaty, R. B. Tesh, T. H. Aitken, Transovarial transmission of yellow fever virus in *Stegomyia* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* **29**, 125-132 (1980).
54. T. H. Aitken, R. B. Tesh, B. J. Beaty, L. Rosen, Transovarial transmission of yellow fever virus by mosquitoes (*Aedes aegypti*). *Am J Trop Med Hyg* **28**, 119-121 (1979).
55. A. Ferreira-de-Brito *et al.*, First detection of natural infection of *Aedes aegypti* with Zika virus in Brazil and throughout South America. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **111**, 655-658 (2016).
56. C. T. Smartt *et al.*, Evidence of Zika Virus RNA Fragments in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) Field-Collected Eggs From Camacari, Bahia, Brazil. *J Med Entomol* **54**, 1085-1087 (2017).
57. L. Rosen, Mechanism of vertical transmission of the dengue virus in mosquitoes. *C R Acad Sci III* **304**, 347-350 (1987).
58. N. Arunachalam *et al.*, Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Chennai, Tamil Nadu, India. *Indian J Med Res* **127**, 395-397 (2008).
59. G. Le Goff *et al.*, Natural vertical transmission of dengue viruses by *Aedes aegypti* in Bolivia. *Parasite* **18**, 277-280 (2011).
60. S. Lequime, L. Lambrechts, Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infect Genet Evol* **28**, 681-690 (2014).
61. D. M. Watts, B. F. Eldridge, Transovarial transmission of arboviruses by mosquitoes: a review. *Med Biol* **53**, 271-278 (1975).
62. A. Agarwal, M. Parida, P. K. Dash, Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. *Rev Med Virol*, (2017).
63. J. W. Pereira-Silva *et al.*, First evidence of Zika virus venereal transmission in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **113**, 56-61 (2018).
64. G. D. J. a. V. Nikos, *The Arboviruses: Quo Vadis?*, Arboviruses: Molecular Biology, Evolution and Control (Caister Academic Press, U.K., 2016).
65. I. Schuffenecker *et al.*, Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* **3**, e263 (2006).
66. K. A. Tsetsarkin, D. L. Vanlandingham, C. E. McGee, S. Higgs, A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* **3**, e201 (2007).

67. M. Vazeille *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* **2**, e1168 (2007).
68. K. P. Niyas *et al.*, Molecular characterization of Chikungunya virus isolates from clinical samples and adult *Aedes albopictus* mosquitoes emerged from larvae from Kerala, South India. *Virology* **7**, 189 (2010).
69. K. A. Tsetsarkin, S. C. Weaver, Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by Chikungunya virus and its epidemic emergence. *PLoS Pathog* **7**, e1002412 (2011).
70. L. L. Coffey, A. B. Failloux, S. C. Weaver, Chikungunya virus-vector interactions. *Viruses* **6**, 4628-4663 (2014).
71. J. Lederberg, R. E. Shope, S. C. Oaks, Jr., in *Emerging Infections: Microbial Threats to Health in the United States*. (National Academy Press, Washington (DC), 1992).
72. J. E. Brown *et al.*, Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution* **68**, 514-525 (2014).
73. M. Pfeffer, G. Dobler, Emergence of zoonotic arboviruses by animal trade and migration. *Parasit Vectors* **3**, 35 (2010).
74. J. R. Powell, A. Gloria-Soria, P. Kotsakiozi, Recent History of *Aedes aegypti*: Vector Genomics and Epidemiology Records. *Bioscience* **68**, 854-860 (2018).
75. M. U. Kraemer *et al.*, The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife* **4**, e08347 (2015).
76. S. D. Reiter P. , The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **3**, 494-501 (1987).
77. F. Rodhain, Yellow fever: A brief history of a tropical Virosis. *Presse Med* **51**, 104132 (2022).
78. J. E. Bryant, E. C. Holmes, A. D. Barrett, Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog* **3**, e75 (2007).
79. C. J. T. M. J.S., Yellow Fever, Historical (2017).
80. M. Grandadam *et al.*, Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis* **17**, 910-913 (2011).
81. D. Musso, E. J. Nilles, V. M. Cao-Lormeau, Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect* **20**, O595-596 (2014).
82. M. Malkinson *et al.*, Introduction of West Nile virus in the Middle East by migrating white storks. *Emerg Infect Dis* **8**, 392-397 (2002).
83. A. D. T. Barrett, The reemergence of yellow fever. *Science* **361**, 847-848 (2018).

84. D. J. Gubler, Dengue, Urbanization and Globalization: The Unholy Trinity of the 21(st) Century. *Trop Med Health* **39**, 3-11 (2011).
85. D. J. Gubler, Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev* **11**, 480-496 (1998).
86. A. T. Ciota *et al.*, Differential Effects of Temperature and Mosquito Genetics Determine Transmissibility of Arboviruses by *Aedes aegypti* in Argentina. *Am J Trop Med Hyg* **99**, 417-424 (2018).
87. J. Liu-Helmersson, H. Stenlund, A. Wilder-Smith, J. Rocklov, Vectorial capacity of *Aedes aegypti*: effects of temperature and implications for global dengue epidemic potential. *PLoS One* **9**, e89783 (2014).
88. S. Jansen *et al.*, Experimental transmission of Zika virus by *Aedes japonicus japonicus* from southwestern Germany. *Emerg Microbes Infect* **7**, 192 (2018).
89. B. Wimalasiri-Yapa *et al.*, Chikungunya Virus Transmission at Low Temperature by *Aedes albopictus* Mosquitoes. *Pathogens* **8**, (2019).
90. O. C. Winokur, B. J. Main, J. Nicholson, C. M. Barker, Impact of temperature on the extrinsic incubation period of Zika virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* **14**, e0008047 (2020).
91. T. Shragai, B. Tesla, C. Murdock, L. C. Harrington, Zika and chikungunya: mosquito-borne viruses in a changing world. *Ann N Y Acad Sci* **1399**, 61-77 (2017).
92. J. L. Hardy, E. J. Houk, L. D. Kramer, W. C. Reeves, Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol* **28**, 229-262 (1983).
93. P. S. Mellor, Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol* **123**, 231-247 (2000).
94. J. B. Perrone, A. Spielman, Time and site of assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell Tissue Res* **252**, 473-478 (1988).
95. B. T. Beerntsen, A. A. James, B. M. Christensen, Genetics of mosquito vector competence. *Microbiol Mol Biol Rev* **64**, 115-137 (2000).
96. A. W. Franz, A. M. Kantor, A. L. Passarelli, R. J. Clem, Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* **7**, 3741-3767 (2015).
97. C. Ruckert, G. D. Ebel, How Do Virus-Mosquito Interactions Lead to Viral Emergence? *Trends Parasitol* **34**, 310-321 (2018).
98. A. Rohani, Y. C. Wong, I. Zamre, H. L. Lee, M. N. Zurainee, The effect of extrinsic incubation temperature on development of dengue serotype 2 and 4 viruses in *Aedes aegypti* (L.). *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **40**, 942-950 (2009).
99. F. Z. Xiao *et al.*, The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in *Aedes albopictus*. *Arch Virol* **159**, 3053-3057 (2014).

100. K. Pesko, C. J. Westbrook, C. N. Mores, L. P. Lounibos, M. H. Reiskind, Effects of infectious virus dose and bloodmeal delivery method on susceptibility of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* to chikungunya virus. *J Med Entomol* **46**, 395-399 (2009).
101. F. Aubry *et al.*, Enhanced Zika virus susceptibility of globally invasive *Aedes aegypti* populations. *Science* **370**, 991-996 (2020).
102. M. Dubrulle, L. Mousson, S. Moutailler, M. Vazeille, A. B. Failloux, Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS One* **4**, e5895 (2009).
103. J. H. Bauer, N. P. Hudson, The Incubation Period of Yellow Fever in the Mosquito. *J Exp Med* **48**, 147-153 (1928).
104. K. E. Rudolph, J. Lessler, R. M. Moloney, B. Kmush, D. A. Cummings, Incubation periods of mosquito-borne viral infections: a systematic review. *Am J Trop Med Hyg* **90**, 882-891 (2014).
105. T. Chouin-Carneiro *et al.*, Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis* **10**, e0004543 (2016).
106. A. Kumar *et al.*, Mosquito Innate Immunity. *Insects* **9**, (2018).
107. N. Luplertlop *et al.*, Induction of a peptide with activity against a broad spectrum of pathogens in the *Aedes aegypti* salivary gland, following Infection with Dengue Virus. *PLoS Pathog* **7**, e1001252 (2011).
108. Z. Xi, J. L. Ramirez, G. Dimopoulos, The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog* **4**, e1000098 (2008).
109. X. Pan *et al.*, Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, E23-31 (2012).
110. M. McFarlane *et al.*, Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2994 (2014).
111. R. Fragkoudis *et al.*, Semliki Forest virus strongly reduces mosquito host defence signaling. *Insect Mol Biol* **17**, 647-656 (2008).
112. A. B. Barletta *et al.*, Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors* **10**, 103 (2017).
113. H. R. Sanders *et al.*, 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**, 1293-1307 (2005).
114. V. Avadhanula, B. P. Weasner, G. G. Hardy, J. P. Kumar, R. W. Hardy, A novel system for the launch of alphavirus RNA synthesis reveals a role for the Imd pathway in arthropod antiviral response. *PLoS Pathog* **5**, e1000582 (2009).

115. N. Jupatanakul *et al.*, Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005187 (2017).
116. J. A. Souza-Neto, S. Sim, G. Dimopoulos, An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17841-17846 (2009).
117. P. N. Paradkar, L. Trinidad, R. Voysey, J. B. Duchemin, P. J. Walker, Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 18915-18920 (2012).
118. G. Terradas, D. A. Joubert, E. A. McGraw, The RNAi pathway plays a small part in Wolbachia-mediated blocking of dengue virus in mosquito cells. *Sci Rep* **7**, 43847 (2017).
119. N. Chejanovsky *et al.*, Characterization of viral siRNA populations in honey bee colony collapse disorder. *Virology* **454-455**, 176-183 (2014).
120. C. D. Blair, K. E. Olson, The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses* **7**, 820-843 (2015).
121. C. L. Campbell, T. Harrison, A. M. Hess, G. D. Ebel, MicroRNA levels are modulated in *Aedes aegypti* after exposure to Dengue-2. *Insect Mol Biol* **23**, 132-139 (2014).
122. A. W. Franz *et al.*, Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 4198-4203 (2006).
123. K. H. Yeom, Y. Lee, J. Han, M. R. Suh, V. N. Kim, Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res* **34**, 4622-4629 (2006).
124. K. Etebari, S. Osei-Amo, S. P. Blomberg, S. Asgari, Dengue virus infection alters post-transcriptional modification of microRNAs in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Sci Rep* **5**, 15968 (2015).
125. M. A. Saldana *et al.*, Zika virus alters the microRNA expression profile and elicits an RNAi response in *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005760 (2017).
126. J. Shrinet, S. Jain, J. Jain, R. K. Bhatnagar, S. Sunil, Next generation sequencing reveals regulation of distinct *Aedes* microRNAs during chikungunya virus development. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2616 (2014).
127. M. Hussain, T. Walker, S. L. O'Neill, S. Asgari, Blood meal induced microRNA regulates development and immune associated genes in the Dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **43**, 146-152 (2013).
128. M. C. Siomi, K. Sato, D. Pezic, A. A. Aravin, PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Biol* **12**, 246-258 (2011).
129. A. M. Hess *et al.*, Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. *BMC Microbiol* **11**, 45 (2011).

130. E. M. Morazzani, M. R. Wiley, M. G. Murreddu, Z. N. Adelman, K. M. Myles, Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. *PLoS Pathog* **8**, e1002470 (2012).
131. N. Vodovar *et al.*, Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells. *PLoS One* **7**, e30861 (2012).
132. N. J. Lennemann, C. B. Coyne, Catch me if you can: the link between autophagy and viruses. *PLoS Pathog* **11**, e1004685 (2015).
133. N. Mizushima, B. Levine, Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* **12**, 823-830 (2010).
134. M. W. Eng, M. N. van Zuylen, D. W. Severson, Apoptosis-related genes control autophagy and influence DENV-2 infection in the mosquito vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **76**, 70-83 (2016).
135. S. K. Behura *et al.*, Influence of mosquito genotype on transcriptional response to dengue virus infection. *Funct Integr Genomics* **14**, 581-589 (2014).
136. P. E. Joubert *et al.*, Chikungunya-induced cell death is limited by ER and oxidative stress-induced autophagy. *Autophagy* **8**, 1261-1263 (2012).
137. R. H. Moy *et al.*, Antiviral autophagy restricts Rift Valley fever virus infection and is conserved from flies to mammals. *Immunity* **40**, 51-65 (2014).
138. L. Lambrechts *et al.*, Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol* **9**, 160 (2009).
139. D. L. Vanlandingham *et al.*, Differential infectivities of o'nyong-nyong and chikungunya virus isolates in *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* **72**, 616-621 (2005).
140. D. L. Vanlandingham *et al.*, Determinants of vector specificity of o'nyong nyong and chikungunya viruses in *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg* **74**, 663-669 (2006).
141. A. T. Ciota *et al.*, Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. *Emerg Infect Dis* **23**, 1110-1117 (2017).
142. L. Lambrechts, Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol* **27**, 111-114 (2011).
143. J. A. Souza-Neto, J. R. Powell, M. Bonizzoni, *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect Genet Evol* **67**, 191-209 (2019).
144. P. M. Armstrong, R. Rico-Hesse, Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* **1**, 159-168 (2001).

145. R. B. Tesh, D. J. Gubler, L. Rosen, Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with chikungunya virus. *Am J Trop Med Hyg* **25**, 326-335 (1976).
146. B. Kamgang *et al.*, Potential of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to transmit yellow fever virus in urban areas in Central Africa. *Emerg Microbes Infect* **8**, 1636-1641 (2019).
147. W. J. Tabachnick *et al.*, Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations. *Am J Trop Med Hyg* **34**, 1219-1224 (1985).
148. D. J. Gubler, L. Rosen, A simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *Am J Trop Med Hyg* **25**, 146-150 (1976).
149. A. Yebakima *et al.*, Genetic heterogeneity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Martinique. *Trop Med Int Health* **9**, 582-587 (2004).
150. T. Fansiri *et al.*, Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. *PLoS Genet* **9**, e1003621 (2013).
151. K. Saavedra-Rodriguez *et al.*, Quantitative trait loci mapping of genome regions controlling permethrin resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* **180**, 1137-1152 (2008).
152. C. F. Bosio, R. E. Fulton, M. L. Salasek, B. J. Beaty, W. C. t. Black, Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* **156**, 687-698 (2000).
153. S. H. Merklings *et al.*, Tudor-SN Promotes Early Replication of Dengue Virus in the *Aedes aegypti* Midgut. *iScience* **23**, 100870 (2020).
154. K. Fujino, M. Horie, T. Honda, D. K. Merriman, K. Tomonaga, Inhibition of Borna disease virus replication by an endogenous bornavirus-like element in the ground squirrel genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**, 13175-13180 (2014).
155. C. J. McMeniman *et al.*, Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* **323**, 141-144 (2009).
156. Z. Xi, J. L. Dean, C. Khoo, S. L. Dobson, Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. *Insect Biochem Mol Biol* **35**, 903-910 (2005).
157. L. A. Moreira *et al.*, A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell* **139**, 1268-1278 (2009).
158. L. D. Kramer, G. D. Ebel, Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv Virus Res* **60**, 187-232 (2003).
159. M. G., *The Epidemiology and Control of Malaria*. (Oxford Medical Publications, Oxford, 1957), pp. 201.
160. A. N. Clements, *The biology of Mosquitoes*. (Chapman & Hall, 2000), vol. 1.

161. J. R. Powell, W. J. Tabachnick, History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **108 Suppl 1**, 11-17 (2013).
162. A. Gloria-Soria *et al.*, Global genetic diversity of *Aedes aegypti*. *Mol Ecol* **25**, 5377-5395 (2016).
163. F. Schaffner, A. Mathis, Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect Dis* **14**, 1271-1280 (2014).
164. R. J. M. G. Bliss, J. , The Effects of Freezing on the Larvae of *Aedes Aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **s1-13**, 583-588 (1933).
165. M. Vazeille, L. Mousson, E. Martin, A. B. Failloux, 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 (2010).
166. M. Manni *et al.*, Genetic evidence for a worldwide chaotic dispersion pattern of the arbovirus vector, *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* **11**, e0005332 (2017).
167. C. Paupy, H. Delatte, L. Bagny, V. Corbel, D. Fontenille, *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* **11**, 1177-1185 (2009).
168. N. G. Gratz, Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med Vet Entomol* **18**, 215-227 (2004).
169. J. Adhami, P. Reiter, Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc* **14**, 340-343 (1998).
170. P. Reiter, & Darsie JR, R. F, *Aedes albopictus* in Memphis, Tennessee (USA): an achievement of modern transportation? *Mosquito News* **44**, 396-399 (1984).
171. O. P. Forattini, Identification of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in Brazil. *Rev Saude Publica* **20**, 244-245 (1986).
172. C. J. Peña, First report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) from the Dominican Republic. *Vector Ecol. Newsl.* **24**, 68 (1993).
173. M. Bonizzoni, G. Gasperi, X. Chen, A. A. James, The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol* **29**, 460-468 (2013).
174. A. J. Cornel, R. H. Hunt, *Aedes albopictus* in Africa? First records of live specimens in imported tires in Cape Town. *J Am Mosq Control Assoc* **7**, 107-108 (1991).
175. H. M. Savage, V. I. Ezike, A. C. Nwankwo, R. Spiegel, B. R. Miller, First record of breeding populations of *Aedes albopictus* in continental Africa: implications for arboviral transmission. *J Am Mosq Control Assoc* **8**, 101-103 (1992).
176. D. Fontenille, J. C. Toto, *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse), a potential new Dengue vector in southern Cameroon. *Emerg Infect Dis* **7**, 1066-1067 (2001).

177. T. Coffinet *et al.*, First record of *Aedes albopictus* in Gabon. *J Am Mosq Control Assoc* **23**, 471-472 (2007).
178. J. C. Toto, S. Abaga, P. Carnevale, F. Simard, First report of the oriental mosquito *Aedes albopictus* on the West African island of Bioko, Equatorial Guinea. *Med Vet Entomol* **17**, 343-346 (2003).
179. J. M. Medlock *et al.*, A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis* **12**, 435-447 (2012).
180. A. Wilder-Smith, Dengue vaccine development by the year 2020: challenges and prospects. *Curr Opin Virol* **43**, 71-78 (2020).
181. S. Gao, S. Song, L. Zhang, Recent Progress in Vaccine Development Against Chikungunya Virus. *Front Microbiol* **10**, 2881 (2019).
182. WHO. (2018a).
183. S. Pasteur, "STAMARIL- Modalités de distribution," (2019).
184. S. Bhatt *et al.*, The effect of malaria control on *Plasmodium falciparum* in Africa between 2000 and 2015. *Nature* **526**, 207-211 (2015).
185. N. Andersson *et al.*, Evidence based community mobilization for dengue prevention in Nicaragua and Mexico (Camino Verde, the Green Way): cluster randomized controlled trial. *BMJ* **351**, h3267 (2015).
186. F. L. Soper, The 1964 status of *Aedes aegypti* eradication and yellow fever in the Americas. *Am J Trop Med Hyg* **14**, 887-891 (1965).
187. R. Maharaj, D. J. Mthembu, B. L. Sharp, Impact of DDT re-introduction on malaria transmission in KwaZulu-Natal. *S Afr Med J* **95**, 871-874 (2005).
188. WHO, "Guidelines for testing mosquito adulticides intended for Indoor Residual Spraying (IRS) and Insecticide Treated Nets (ITNs)," (WHO, 2006).
189. K. Ohashi *et al.*, Efficacy of pyriproxyfen-treated nets in sterilizing and shortening the longevity of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **49**, 1052-1058 (2012).
190. L. A. Lacey, *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* **23**, 133-163 (2007).
191. L. Regis, M. H. Silva-Filha, C. Nielsen-LeRoux, J. F. Charles, Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends Parasitol* **17**, 377-380 (2001).
192. C. Chevillon, C. Bernard, M. Marquine, N. Pasteur, Resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae): interaction between recessive mutants and evolution in southern France. *J Med Entomol* **38**, 657-664 (2001).
193. C. M. Oliveira *et al.*, Inheritance and mechanism of resistance to *Bacillus sphaericus* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from China and Brazil. *J Med Entomol* **41**, 58-64 (2004).

194. M. Weill *et al.*, The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Mol Biol* **13**, 1-7 (2004).
195. D. J. P. Labbé P., Alout H., Milesi P., , W. M. Pasteur N., *Evolution of resistance to insecticide in disease vectors. In book : Genetics and Evolution of Infectious Diseases. Edition: 2nd. Chapter 14.* (Elsevier, 2017).
196. S. Marcombe *et al.*, Pyrethroid resistance reduces the efficacy of space sprays for dengue control on the island of Martinique (Caribbean). *PLoS Negl Trop Dis* **5**, e1202 (2011).
197. D. M. Soderlund, D. C. Knipple, The molecular biology of knockdown resistance to pyrethroid insecticides. *Insect Biochem Mol Biol* **33**, 563-577 (2003).
198. R. H. Ffrench-Constant, J. C. Steichen, F. Shotkoski, Polymerase chain reaction diagnostic for cyclodiene insecticide resistance in the mosquito *Aedes aegypti*. *Med Vet Entomol* **8**, 99-100 (1994).
199. F. Oppenoorth, *Biochemistry and genetics of insecticide resistance*. . C o m p rehensive insect physiology biochemistry and pharmacology. (In Kerkut GA., Gilbert LI, Oxford,UK, 1985), vol. 12.
200. J. Hemingway, L. Field, J. Vontas, An overview of insecticide resistance. *Science* **298**, 96-97 (2002).
201. N. Lumjuan, L. McCarroll, L. A. Prapanthadara, J. Hemingway, H. Ranson, Elevated activity of an Epsilon class glutathione transferase confers DDT resistance in the dengue vector, *Aedes aegypti*. *Insect Biochem Mol Biol* **35**, 861-871 (2005).
202. A. L. Devonshire, L. M. Field, Gene amplification and insecticide resistance. *Annu Rev Entomol* **36**, 1-23 (1991).
203. A. Vaughan, J. Hemingway, Mosquito carboxylesterase Est alpha 2(1) (A2). Cloning and sequence of the full-length cDNA for a major insecticide resistance gene worldwide in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *J Biol Chem* **270**, 17044-17049 (1995).
204. W. M. Hammon, A. Rudnick, G. E. Sather, Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science* **131**, 1102-1103 (1960).
205. J. Vontas *et al.*, Transcriptional analysis of insecticide resistance in *Anopheles stephensi* using cross-species microarray hybridization. *Insect Mol Biol* **16**, 315-324 (2007).
206. R. F. Djouaka *et al.*, Expression of the cytochrome P450s, CYP6P3 and CYP6M2 are significantly elevated in multiple pyrethroid resistant populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Southern Benin and Nigeria. *BMC Genomics* **9**, 538 (2008).
207. M. Farenhorst *et al.*, Fungal infection counters insecticide resistance in African malaria mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 17443-17447 (2009).
208. J. H. Wyss, Screwworm Eradication in the Americas. **916**, 186–193 (2006).

209. D. A. Lindquist, M. Abusowa, M. J. Hall, The New World screwworm fly in Libya: a review of its introduction and eradication. *Med Vet Entomol* **6**, 2-8 (1992).
210. A. Msanga, Kiwia, N., Mramba, F., Malele, I., Kitwika, W., Byamungu, M., Dyck, A., Parker, A., Kassim, J., Chalo, O., Jimbika, A., Research note on eradication of tsetse flies using the sterile insect technique: The case of Zanzibar and Mafia Island Tanzania. *Tanzania J. Agric. Sci.* **3**, 173–180 (2000).
211. M. J. Vreysen *et al.*, Sterile insects to enhance agricultural development: the case of sustainable tsetse eradication on Unguja Island, Zanzibar, using an area-wide integrated pest management approach. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e2857 (2014).
212. J. Bouyer, T. Lefrancois, Boosting the sterile insect technique to control mosquitoes. *Trends Parasitol* **30**, 271-273 (2014).
213. R. Leal Mubarqui *et al.*, The smart aerial release machine, a universal system for applying the sterile insect technique. *PLoS One* **9**, e103077 (2014).
214. G. Munhenga *et al.*, Evaluating the potential of the sterile insect technique for malaria control: relative fitness and mating compatibility between laboratory colonized and a wild population of *Anopheles arabiensis* from the Kruger National Park, South Africa. *Parasit Vectors* **4**, 208 (2011).
215. D. A. Dame, C. F. Curtis, M. Q. Benedict, A. S. Robinson, B. G. Knols, Historical applications of induced sterilisation in field populations of mosquitoes. *Malar J* **8 Suppl 2**, S2 (2009).
216. H. K. Phuc *et al.*, Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol* **5**, 11 (2007).
217. A. F. Harris *et al.*, Successful suppression of a field mosquito population by sustained release of engineered male mosquitoes. *Nat Biotechnol* **30**, 828-830 (2012).
218. D. O. Carvalho *et al.*, Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis* **9**, e0003864 (2015).
219. D. Munoz, A. Jimenez, O. Marinotti, A. A. James, The AeAct-4 gene is expressed in the developing flight muscles of female *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol* **13**, 563-568 (2004).
220. G. Fu *et al.*, Female-specific flightless phenotype for mosquito control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4550-4554 (2010).
221. L. Facchinelli *et al.*, Field cage studies and progressive evaluation of genetically-engineered mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2001 (2013).
222. S. Zabalou *et al.*, Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility as a means for insect pest population control. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 15042-15045 (2004).
223. E. A. McGraw, S. L. O'Neill, Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol* **11**, 181-193 (2013).

224. L. Mousson *et al.*, The native Wolbachia symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* **6**, e1989 (2012).
225. T. Walker *et al.*, The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature* **476**, 450-453 (2011).
226. L. Lambrechts *et al.*, Assessing the epidemiological effect of wolbachia for dengue control. *Lancet Infect Dis* **15**, 862-866 (2015).
227. A. D. Barrett, T. P. Monath, Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Adv Virus Res* **61**, 291-315 (2003).
228. T. P. Monath, Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis* **1**, 11-20 (2001).
229. C. L. Gardner, K. D. Ryman, Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med* **30**, 237-260 (2010).
230. T. P. Monath, P. F. Vasconcelos, Yellow fever. *J Clin Virol* **64**, 160-173 (2015).
231. F. B. Patrice Bourée, Sophie Delaigue, Nagiro Djibo, Paula Resende, Le diagnostic de la fièvre jaune Diagnosis of yellow fer. (2011).
232. PAHO, Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection. (2018 a).
233. C. Domingo, R. N. Charrel, J. Schmidt-Chanasit, H. Zeller, C. Reusken, Yellow fever in the diagnostics laboratory. *Emerg Microbes Infect* **7**, 129 (2018).
234. WHO, Yellow fever laboratory diagnostic testing in Africa. (2016).
235. A. P. G. B.-A., Fièvre jaune. *Medecine Tropicale*, (2019).
236. J. D. Goodyear, The sugar connection: a new perspective on the history of yellow fever. *Bull Hist Med* **52**, 5-21 (1978).
237. WHO, Division of Epidemiological Surveillance and Health Situation and Trend Assessment. Global Health Situation and Projections : Estimates., (1992).
238. Y. L. Ho *et al.*, Severe yellow fever in Brazil: clinical characteristics and management. *J Travel Med* **26**, (2019).
239. E. G. Kallas, A. Wilder-Smith, Managing severe yellow fever in the intensive care: lessons learnt from Brazil. *J Travel Med* **26**, (2019).
240. A. Sanna *et al.*, Yellow fever cases in French Guiana, evidence of an active circulation in the Guiana Shield, 2017 and 2018. *Euro Surveill* **23**, (2018).
241. B. de Thoisy, P. Dussart, M. Kazanji, Wild terrestrial rainforest mammals as potential reservoirs for flaviviruses (yellow fever, dengue 2 and St Louis encephalitis viruses) in French Guiana. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **98**, 409-412 (2004).
242. J. M. Heraud *et al.*, First case of yellow fever in French Guiana since 1902. *Emerg Infect Dis* **5**, 429-432 (1999).

243. WHO, Fièvre jaune. (1999).
244. H. R. Carter, the period of incubation of yellow fever: a study from unpublished observations. *Med. Rec. (New York)* **59**, 361–367. (1901).
245. W. Reed, Carroll, J., Agramonte, A., The etiology of yellow fever: a supplemental note. . *Trans. Assoc. Am. Physicians* **16**, 45-71 (1901b).
246. A. Simond, Noc, Contribution à l'étude de l'épidémiologie amarile. Origine, Causes, Maroche et Caractères de l'épidémie de fièvre jaune de la Martinique de 1908. Suite et fin. *Annales de l'Institut Pasteur : Roussettes et Microbes* **12**, (1909b).
247. A. Simond, Noc, Contribution à l'étude de l'épidémiologie amarile. Origine, Causes, Maroche et Caractères de l'épidémie de fièvre jaune de la Martinique de 1908. Partie 1. *Annales de l'Institut Pasteur : journal de microbiologie*, (1909a).
248. J. P. Mutebi, H. Wang, L. Li, J. E. Bryant, A. D. Barrett, Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol* **75**, 6999-7008 (2001).
249. L. Lepiniec *et al.*, Geographic distribution and evolution of yellow fever viruses based on direct sequencing of genomic cDNA fragments. *J Gen Virol* **75 (Pt 2)**, 417-423 (1994).
250. D. Mir *et al.*, Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep* **7**, 7385 (2017).
251. R. Klitting, E. A. Gould, C. Paupy, X. de Lamballerie, What Does the Future Hold for Yellow Fever Virus? (I). *Genes (Basel)* **9**, (2018).
252. T. Pereira Dos Santos *et al.*, Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. *Emerg Microbes Infect* **7**, 191 (2018).
253. S. B. Halstead, Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science* **239**, 476-481 (1988).
254. E. A. Henchal, J. R. Putnak, The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev* **3**, 376-396 (1990).
255. E. Daudens-Vaysse *et al.*, 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. *Euro Surveill* **21**, (2016).
256. T. D. S. Chaves *et al.*, Travelers as Sentinels for Chikungunya Fever, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* **18**, 529-530 (2012).
257. K. B. Gibney *et al.*, Chikungunya fever in the United States: a fifteen year review of cases. *Clin Infect Dis* **52**, e121-126 (2011).
258. W. Shuaib, H. Stanazai, A. G. Abazid, A. A. Mattar, Re-Emergence of Zika Virus: A Review on Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Am J Med* **129**, 879 e877-879 e812 (2016).

259. R. Girod *et al.*, High susceptibility to Chikungunya virus of *Aedes aegypti* from the French West Indies and French Guiana. *Trop Med Int Health* **16**, 134-139 (2011).
260. A. Vega-Rua, K. Zouache, R. Girod, A. B. Failloux, R. Lourenco-de-Oliveira, 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 (2014).
261. P. Reiter, *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? *J Am Mosq Control Assoc* **14**, 83-94 (1998).
262. C. Fernandez Mdel, Y. S. Jean, C. A. Callaba, L. S. Lopez, The first report of *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* in Haiti. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**, 279-281 (2012).
263. R. G. Broche, E. M. Borja, *Aedes albopictus* in Cuba. *J Am Mosq Control Assoc* **15**, 569-570 (1999).
264. F. Rodhain, [Problems posed by the spread of *Aedes albopictus*]. *Bull Soc Pathol Exot* **89**, 137-140; discussion 140-131 (1996).
265. I. Ali, M. Mundle, J. J. Anzinger, S. L. Sandiford, Tiger in the sun: A report of *Aedes albopictus* in Jamaica. *Acta Trop* **199**, 105112 (2019).
266. D. D. Chadee, F. H. Fat, R. C. Persad, First record of *Aedes albopictus* from Trinidad, West Indies. *J Am Mosq Control Assoc* **19**, 438-439 (2003).
267. S. Marcombe *et al.*, Reduced efficacy of pyrethroid space sprays for dengue control in an area of Martinique with pyrethroid resistance. *Am J Trop Med Hyg* **80**, 745-751 (2009).
268. S. Marcombe *et al.*, Insecticide resistance in the dengue vector *Aedes aegypti* from Martinique: distribution, mechanisms and relations with environmental factors. *PLoS One* **7**, e30989 (2012).
269. S. C. Rawlins *et al.*, Sylvatic yellow fever activity in Trinidad, 1988-1989. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **84**, 142-143 (1990).
270. D. D. Chadee, E. S. Tikasingh, R. Ganesh, Seasonality, biting cycle and parity of the yellow fever vector mosquito *Haemagogus janthinomys* in Trinidad. *Med Vet Entomol* **6**, 143-148 (1992).
271. A. J. Auguste *et al.*, Yellow fever virus maintenance in Trinidad and its dispersal throughout the Americas. *J Virol* **84**, 9967-9977 (2010).
272. N. R. Faria *et al.*, Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* **361**, 894-899 (2018).
273. R. Song *et al.*, Late or Lack of Vaccination Linked to Importation of Yellow Fever from Angola to China. *Emerg Infect Dis* **24**, (2018).
274. A. D. Barrett, Yellow Fever in Angola and Beyond--The Problem of Vaccine Supply and Demand. *N Engl J Med* **375**, 301-303 (2016).

275. A. C. Campi-Azevedo *et al.*, Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. *BMC Infect Dis* **14**, 391 (2014).
276. A. D. Barrett, S. Higgs, Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol* **52**, 209-229 (2007).
277. M.-G. J.S., Multidisciplinary approach for surveillance and risk identification of yellow fever and other arboviruses in Colombia. *One Health* **15**, (2022).
278. P. Delaunay, C. Jeannin, F. Schaffner, P. Marty, [News on the presence of the tiger mosquito *Aedes albopictus* in metropolitan France]. *Arch Pediatr* **16 Suppl 2**, S66-71 (2009).
279. J. M. Medlock *et al.*, An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bull Entomol Res* **105**, 637-663 (2015).
280. F. Amraoui, M. Vazeille, A. B. Failloux, French *Aedes albopictus* are able to transmit yellow fever virus. *Euro Surveill* **21**, (2016).
281. G. La Ruche *et al.*, First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill* **15**, 19676 (2010).
282. E. A. Gould, X. de Lamballerie, P. M. Zanotto, E. C. Holmes, Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv Virus Res* **59**, 277-314 (2003).
283. M. R. Nunes *et al.*, Genomic and phylogenetic characterization of Brazilian yellow fever virus strains. *J Virol* **86**, 13263-13271 (2012).
284. J. G. Frierson, The yellow fever vaccine: a history. *Yale J Biol Med* **83**, 77-85 (2010).
285. H. H. Smith, M. Theiler, The Adaptation of Unmodified Strains of Yellow Fever Virus to Cultivation in Vitro. *J Exp Med* **65**, 801-808 (1937).
286. L. Danet *et al.*, Midgut barriers prevent the replication and dissemination of the yellow fever vaccine in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* **13**, e0007299 (2019).
287. M. Vazeille *et al.*, Importance of mosquito "quasispecies" in selecting an epidemic arthropod-borne virus. *Sci Rep* **6**, 29564 (2016).
288. L. B. Dickson, I. Sanchez-Vargas, M. Sylla, K. Fleming, W. C. t. Black, Vector competence in West African *Aedes aegypti* is *Flavivirus* species and genotype dependent. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e3153 (2014).
289. B. R. Evans *et al.*, A Multipurpose, High-Throughput Single-Nucleotide Polymorphism Chip for the Dengue and Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *G3 (Bethesda)* **5**, 711-718 (2015).
290. K. Zouache *et al.*, Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci* **281**, (2014).
291. M. Viglietta, R. Bellone, A. A. Blisnick, A. B. Failloux, Vector Specificity of Arbovirus Transmission. *Front Microbiol* **12**, 773211 (2021).

292. R. Bellone, A. B. Failloux, The Role of Temperature in Shaping Mosquito-Borne Viruses Transmission. *Front Microbiol* **11**, 584846 (2020).
293. C. M. Atyame *et al.*, Insecticide resistance genes affect *Culex quinquefasciatus* vector competence for West Nile virus. *Proc Biol Sci* **286**, 20182273 (2019).
294. H. Alout *et al.*, Insecticide resistance alleles affect vector competence of *Anopheles gambiae* s.s. for *Plasmodium falciparum* field isolates. *PLoS One* **8**, e63849 (2013).
295. I. Moltini-Conclois, R. Stalinski, G. Tetreau, L. Despres, L. Lambrechts, Larval Exposure to the Bacterial Insecticide Bti Enhances Dengue Virus Susceptibility of Adult *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Insects* **9**, (2018).
296. T. Y. Chen, C. T. Smartt, D. Shin, Permethrin Resistance in *Aedes aegypti* Affects Aspects of Vectorial Capacity. *Insects* **12**, (2021).
297. C. Parker-Crockett, C. R. Connelly, B. Siegfried, B. Alto, Influence of Pyrethroid Resistance on Vector Competency for Zika Virus by *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol* **58**, 1908-1916 (2021).
298. H. Knecht, S. L. Richards, J. A. G. Balanay, A. V. White, Impact of Mosquito Age and Insecticide Exposure on Susceptibility of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to Infection with Zika Virus. *Pathogens* **7**, (2018).
299. S. A. Anbalagan R, Subramanian V, Srivastava PK, Krishnan J., Monitoring of Insecticide Resistance and Exploring the Presence of Virus in Field Populations of *Culex gelidus* at Thiruvarur District of Tamil Nadu, India. *J Commun Dis.* **53**, 76-83 (2021).
300. C. J. Stephenson *et al.*, Geographic Partitioning of Dengue Virus Transmission Risk in Florida. *Viruses* **13**, (2021).
301. J. Deng *et al.*, Impact of deltamethrin-resistance in *Aedes albopictus* on its fitness cost and vector competence. *PLoS Negl Trop Dis* **15**, e0009391 (2021).
302. C. C. Lord, C. R. Rutledge, W. J. Tabachnick, Relationships between host viremia and vector susceptibility for arboviruses. *J Med Entomol* **43**, 623-630 (2006).
303. M. Vazeille *et al.*, Zika virus threshold determines transmission by European *Aedes albopictus* mosquitoes. *Emerg Microbes Infect* **8**, 1668-1678 (2019).
304. N. D. Grubaugh *et al.*, Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative Fitness during Host Switching. *Cell Host Microbe* **19**, 481-492 (2016).
305. E. I. Patterson *et al.*, Mosquito bottlenecks alter viral mutant swarm in a tissue and time-dependent manner with contraction and expansion of variant positions and diversity. *Virus Evol* **4**, vey001 (2018).

306. K. A. Stapleford *et al.*, Emergence and transmission of arbovirus evolutionary intermediates with epidemic potential. *Cell Host Microbe* **15**, 706-716 (2014).
307. D. E. Brackney *et al.*, C6/36 *Aedes albopictus* cells have a dysfunctional antiviral RNA interference response. *PLoS Negl Trop Dis* **4**, e856 (2010).
308. L. G. Lataillade *et al.*, Risk of yellow fever virus transmission in the Asia-Pacific region. *Nat Commun* **11**, 5801 (2020).
309. T. P. Monath, Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines* **4**, 553-574 (2005).
310. C. B. F. Vogels *et al.*, Arbovirus coinfection and co-transmission: A neglected public health concern? *PLoS Biol* **17**, e3000130 (2019).
311. C. Ruckert *et al.*, Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nat Commun* **8**, 15412 (2017).

Annexes

AsibiD_IT_S0 -119	ATGTCTGGTCGTAAAGCTCAG	Sens 1
AsibiD_IT_R0-2154	CTTCCTCTTTGTGCCACTG	Rev 1
AsibiD_IT_S1 -2040	CCTCAACCAATGATGATGAAG	Sens 2
AsibiD_IT_R1-3997	CACCTCAGCCATAGTGACAG	Rev 2
GP-YFV 3832-sens	GCAGCCATGGTGGAGATTG	Sens 3
GP-YFV-4711-rev	AACTTCATGAGCCACCATAGG	Rev 3
GP-YFV-4636-sens	GATGGGATTTATGGCATATTCCAGTC	Sens 4
GP-YFV 5595R	GCTCRCTGGGTATGTCCGt	Rev 4
GP-YFV 5494S	GCTAGGGCAAATGAAAGyGCA	Sens 5
GP-YFV 7832R	AGCCACGyTCATGGAACCA	Rev 5
AsibiD_IT_S4-7592	GTGGGAGTCATGTACAATCTA	Sens 6
AsibiD_IT_R4-10354	TCAGATAAGCTCACCCGGTT	Rev 6

Annexe 1 : Liste des amorces utilisées pour l'amplification des génomes viraux pour le séquençage à haut débit.

Bolivie	Intestin moyen	Intestin moyen
replicats	6 Intestins moyen	
Communs	32	
Uniques Max	1564	
Communs uniques	positions variables	Mut mjour>0.1
Total	25	
Couverture > 500		
Gènes		
ancC	2	1 syn
prM		
E	2	
NS1		
NS2a	1	1 del
NS2b		
NS3	4	
NS4a	6	
2k	1	1 syn*
NS4b	4	1 syn*
NS5	4	1 syn*
		* f > 0.9

2k	6860	T	6285.67	C:15:synonymous>L:1.00000
NS4b	7459	C	3263.33	T:191:synonymous>F:1.00000
NS5	7936	C	2442.50	T:100:synonymous>V:1.00000

Ghana	Intestin moyen	Intestin moyen
replicats	Intestin moyen	
Communs	151	
Uniques Max	826	
Communs uniques	positions variables	Mut mjour>0.1
Total	115	
Couverture > 500		
Gènes		
ancC	1	
prM	3	
E	12	1 NS*
NS1	7	
NS2a	8	1 NS*
NS2b		
NS3	47	1 syn*
NS4a	7	
2k		
NS4b	15	1 NS*
NS5	15	1 syn*
		*F>0.9

E	1023	A	3998.00	G:28:D>G:0.99832
NS2a	3482	A	4120.67	G:3:I>V:0.99990
NS3	5881	G	1997.33	A:448:synonymous>K:0.99600
NS4b	7584	A	2681.33	G:244:K>R:0.99977
NS5	8938	A	2839.33	G:445:synonymous>Q:0.99919

Ouganda	Intestin moyen	Intestin moyen
replicats	5 Intestins moyens	
Communs	36	
Uniques Max	1052	
Communs uniques	positions variables	Mut mjour>0.1
Total	15	
Couverture > 500		
Gènes		
ancC	1	
prM		
E		
NS1	1	1 del*
NS2a		
NS2b		
NS3	3	
NS4a	1	1 del
2k		
NS4b	2	1 NS*
NS5	6	1 NS* 3 del*
		* f > 0.9

NS4b	7626	G	3051.40	A:247:E>K:0.99822
NS5	7645	G	3277.40	T:2:R>I:0.99916
NS5	9275	A	1474.00	T:545:E>D:0.07706

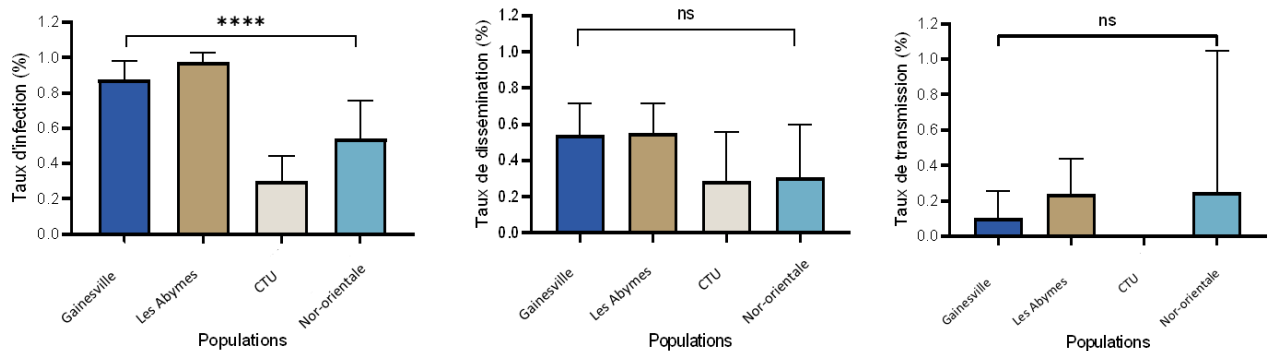
Soudan	Intestin moyen	Intestin moyen
replicats	5 Intestins moyens	
Communs	78	
Uniques Max	1054	
Communs uniques	positions variables	Mut mjour>0.1
Total	78	
Couverture > 500		
Gènes		
ancC	1	
prM		
E	2	
NS1		
NS2a	2	
NS2b		
NS3	69	1 NS 50 syn
NS4a		
2k		
NS4b		
NS5	4	1 NS* 1 del
		* f > 0.9

NS3	5410	C	2398.00	T:280:A>V:0.23536
NS5	8332	C	1418.40	T:231:S>F:0.99961

Annexe 2 : Tableau des SNVs (communs à tous les réplicas) spécifiques (uniques) des populations virales des intestins moyens, pour YFV Bolivie, YFV Ghana, YFV Ouganda, et YFV Soudan, non détectées dans les populations virales des productions.

	Production	Intestins communs					Carcasses communes				
		gène	position	référence	couverture	change -type- freq	gène	position	référence	couverture	change -type- freq
YFV_Bolivie	mutation	NS2a	4039	A	1316.67	G:177:synonymous>G:1.00000	NS2a	4039	A	3050.25	G:177:synonymous>G:0.99792
YFV_Bolivie	mutation	NS3	6140	A	5538.50	C:524:T>P:1.00000	NS3	6140	A	7759.25	C:524:T>P:0.99964
YFV_Bolivie	id virus ref	2k	6860	T	6285.67	C:15:synonymous>L:1.00000	2k	6860	T	9054.75	C:15:synonymous>L:1.00000
YFV_Bolivie	id virus ref	NS4b	7459	C	3263.33	T:191:synonymous>F:1.00000	NS4b	7459	C	5055.00	T:191:synonymous>F:0.99830
YFV_Bolivie	id virus ref	NS5	7936	C	2442.50	T:100:synonymous>V:1.00000	NS5	7936	C	3737.25	T:100:synonymous>V:0.99858
YFV_Soudan	id virus ref	NS5	8332	C	1418.40	T:231:S>F:0.99961	NS5	8332	C	1448.50	T:231:S>F:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	preM	503	C	1986.20	T:7:synonymous>N:1.00000	preM	503	C	2040.00	T:7:synonymous>N:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9083	A	565.20	G:481:synonymous>G:1.00000	NS5	9083	A	880.00	G:481:synonymous>G:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9086	T	594.40	G:482:synonymous>A:1.00000	NS5	9086	T	992.00	G:482:synonymous>A:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9089	G	246.80	T:483:synonymous>R:1.00000					absente
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9091	A	546.80	T:484:Y>F:1.00000	NS5	9091	A	1160.25	T:484:Y>F:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9095	A	754.20	C:485:synonymous>L:1.00000	NS5	9095	A	1078.00	C:485:synonymous>L:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9101	C	434.60	T:487:synonymous>F:0.99619	NS5	9101	C	747.75	T:487:synonymous>F:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9107	C	718.20	T:489:synonymous>A:0.99834	NS5	9107	C	1175.50	T:489:synonymous>A:0.99180
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9110	A	457.60	T:490:synonymous>L:1.00000	NS5	9110	A	1088.25	T:490:synonymous>L:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9113	A	335.20	G:491:synonymous>G:1.00000	NS5	9113	A	982.50	G:491:synonymous>G:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9116	T	476.80	C:492:synonymous>F:1.00000	NS5	9116	T	734.50	C:492:synonymous>F:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9119	A	758.40	G:493:synonymous>L:1.00000	NS5	9119	A	1104.00	G:493:synonymous>L:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9131	T	654.80	C:497:synonymous>H:0.98835	NS5	9131	T	705.50	C:497:synonymous>H:1.00000
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9141	C	755.20	A:501:synonymous>R:0.98030	NS5	9141	C	261.00	A:501:synonymous>R:0.99229
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9158	T	1469.40	A:506:synonymous>G:0.99551	NS5	9158	T	576.75	A:506:synonymous>G:0.99697
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9161	G	1867.20	T:507:synonymous>G:0.99648	NS5	9161	G	715.00	T:507:synonymous>G:0.99473
YFV_Ouganda	mutation	NS5	9164	G	1458.80	T:508:synonymous>V:0.99775	NS5	9164	G	561.50	T:508:synonymous>V:0.99717
YFV_Ghana	id virus ref	E	1023	A	3998.00	G:28:D>G:0.99832	E	1023	A	1446.00	G:28:D>G:0.99521
YFV_Ghana	mutation	NS1	2540	G	4400.67	A:41:E>K:0.99861	NS1	2540	G	7628.00	A:41:E>K:0.99785
YFV_Ghana	id virus ref	NS2a	3482	A	4120.67	G:3:I>V:0.99990	NS2a	3482	A	9384.00	G:3:I>V:1.00000
YFV_Ghana	id virus ref	NS3	5881	G	1997.33	A:448:synonymous>K:0.99600	NS3	5881	G	3288.00	A:448:synonymous>K:0.98586
YFV_Ghana	mutation	NS4b	7125	C	4283.33	T:91:T>I:0.99882	NS4b	7125	C	7060.00	T:91:T>I:0.99825
YFV_Ghana	mutation	NS4b	7192	A	2794.33	G:113:I>M:0.99663	NS4b	7192	A	3268.00	G:113:I>M:0.96439
YFV_Ghana	id virus ref	NS4b	7584	A	2681.33	G:244:K>R:0.99977	NS4b	7584	A	4942.00	G:244:K>R:0.98155
YFV_Ghana	mutation	NS5	8767	A	3408.33	G:388:synonymous>R:0.99971	NS5	8767	A	5610.00	G:388:synonymous>R:0.99943
YFV_Ghana	id virus ref	NS5	8938	A	2839.33	G:445:synonymous>Q:0.99919	NS5	8938	A	3416.00	G:445:synonymous>Q:1.00000
YFV_Nigéria	NA	NS2a	4046	C	5317.50	T:179:synonymous>L:0.99695	NS2a	4046	C	5446.50	T:179:synonymous>L:0.99763
YFV_Nigéria	NA	NS3	4768	A	9345.50	G:66:K>R:0.99911	NS3	4768	A	8403.75	G:66:K>R:1.00000
YFV_Nigéria	NA	NS4b	7623	G	3604.00	A:246:E>K:0.99805	NS4b	7623	G	3338.25	A:246:E>K:0.99775

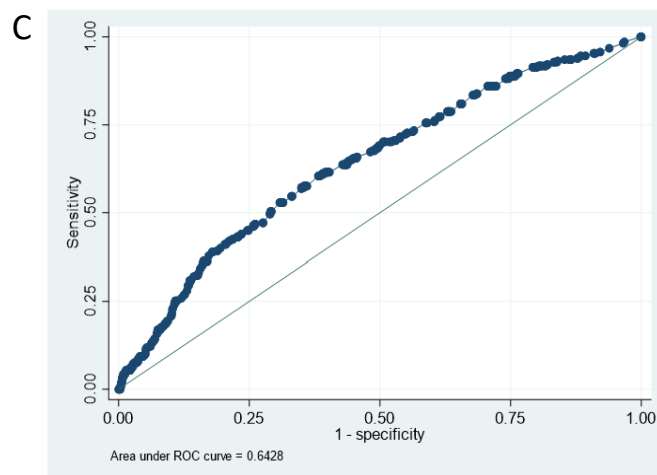
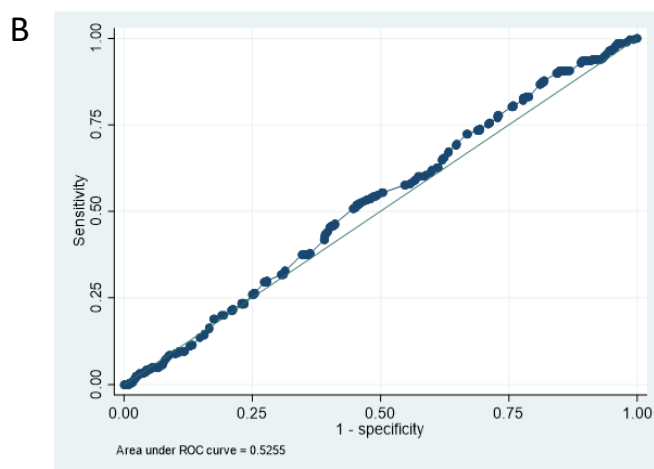
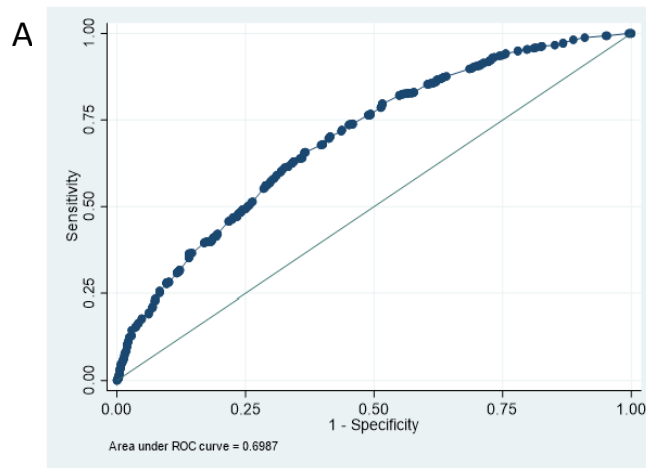
Annexe 3 : Liste des mutations des populations virales communes aux intestins moyens et aux carcasses des moustiques infectés avec chaque virus (Bolivie, Soudan, Ouganda, Ghana et Nigeria). Les mutations non détectées dans les populations virales des productions sont encadrées en noir (le virus des productions étant identique au génome de référence).



Annexe 4 : Taux d'infection de populations d'*Aedes aegypti* de la Caraïbe et d'Amérique examinées 14 jours après un repas infectieux contenant YFV Bolivie fourni à un titre de 10^7 ffu/mL. Test exact de Fisher : ns non significatif, ** $0,001 \leq p < 0,01$, **** $p < 0,0001$.

	N	Taux de transmission (%)	OR Ajusté (95% CI)	P
Virus				<0.001
Bolivia	422	57 (13.5)	1	
Ghana	64	2 (3.1)	0.20 (0.05-0.86)	
Nigeria	252	52 (20.6)	1.61 (1.06-2.44)	
Sudan	278	44 (15.8)	1.16 (0.76-1.78)	
Uganda	469	123 (26.2)	2.20 (1.55-3.12)	
Jpi				0.001
14	562	79 (14.1)	1	
21	923	199 (21.6)	1.62 (1.22-2.17)	

Annexe 5 : Facteurs associés à la transmission. Comparaison entre le jour post-infection et la souche virale. OR : Odd Ratio



Annexe 6 : Courbes ROC permettant d'identifier les moustiques capables de dissémination virale (A) selon la charge virale dans le tube digestif, et de transmission virale selon la charge virale dans le tube digestif (B) et la carcasse(C).

Publications

Article 1

Gabiane G, Failloux AB. Yellow fever in the Americas: risks for the Caribbean islands. *Virologie (Montrouge)*. 2019 Dec 1;23(6):36-37. doi: 10.1684/vir.2019.0800. PMID: 31859260.

La fièvre jaune dans les Amériques : risques pour les îles de la Caraïbe

Yellow fever in the Americas: risks for the Caribbean islands

Gaëlle Gabiane

Anna-Bella Failloux

Institut Pasteur, Laboratoire
de Virologie, Arbovirus
and insectes vecteurs,
25 rue du Docteur Roux,
75724 Paris cedex 15, France

La fièvre jaune (FJ) est une fièvre hémorragique d'origine virale dont le taux de mortalité peut atteindre 50 %. Le virus de la fièvre jaune (YFV ; *Flaviviridae*, *Flavivirus*) est l'exemple historique du premier arbovirus transmis par un moustique vecteur [1]. Le virus est actuellement présent dans 44 pays d'Afrique subsaharienne et d'Amérique du Sud ; il comprend sept génotypes, 5 en Afrique et 2 en Amérique [2]. Isolé pour la première fois en Afrique de l'Ouest en 1927, le YFV est principalement transmis dans un cycle forestier entre les primates non humains et les moustiques zoophiles. Le cycle urbain du YFV implique le moustique anthropophile *Aedes aegypti*. Le virus fut importé dans les Amériques lors de la traite des esclaves, à l'instar du moustique *Ae. aegypti* d'origine africaine. Dans les Amériques, du 18^e au début du 20^e siècle, la maladie a provoqué de nombreuses épidémies urbaines [3]. Le développement de deux vaccins atténués dans les années 1930 ainsi que la mise en place du programme d'éradication global d'*Ae. aegypti*, initié en 1916 par la fondation Rockefeller, puis poursuivi par l'Organisation panaméricaine de la santé à partir de 1940, a permis d'éliminer la FJ en milieu urbain ; les épidémies urbaines de FJ n'avaient plus été signalées en Amérique à partir de 1954 [4]. Cependant, l'assouplissement du programme de lutte au début des années 1970 a facilité la réinfestation de la plupart des pays d'Amérique par *Ae. aegypti* [5]. De même, le moustique tigre *Aedes albopictus* a été introduit sur le continent américain dans les années 1980, en 1985 aux États-Unis [6] et en 1986 au Brésil [7] ; l'espèce est maintenant présente dans 19 pays d'Amérique [8].

Aujourd'hui, en Amérique continentale, les infections humaines par le YFV ne sont contractées que dans le

cycle forestier. Les cas humains sont contaminés par la piqûre de moustiques des genres *Haemagogus* (vecteurs primaires) et *Sabethes* (vecteurs secondaires) vivant dans la canopée. La propagation rapide des vecteurs *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* fait craindre un retour des épidémies urbaines de FJ en Amérique du Sud, comme par le passé [9]. Au Brésil, entre décembre 2016 et mars 2018, plus de 2000 cas humains confirmés ont été signalés dont plus de 500 décès et on note également 4000 primates non-humains (Organisation panaméricaine de la santé, *Fièvre jaune. Actualités épidémiologiques du 20 mars 2018*. www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&Itemid=270&gid=44111&lang=fr). Nous avons démontré que les moustiques anthropophiles *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* ainsi que les moustiques zoophiles *Haemagogus leucocelaenus* et *Sabethes albiprivus* de la côte atlantique du Brésil encore indemne de FJ étaient très réceptifs aux souches américaines et africaines du YFV [10]. Par conséquent, le risque de réémergence d'épidémies urbaines de FJ en Amérique du Sud est majeur avec un virus pouvant être introduit à partir d'un cycle forestier ou par un voyageur revenant d'une région d'Afrique où la FJ est endémique. De plus, le moustique *Ae. albopictus* possède toutes les caractéristiques biologiques pour jouer le rôle de « vecteur relais » entre le cycle forestier et le cycle urbain. Nous avons démontré par des essais de sélection expérimentale que le YFV peut être adapté pour une transmission par *Ae. albopictus* [11].

La dernière flambée épidémique de FJ en zone urbaine dans les Amériques remonte probablement à 1928 au Brésil. En Amérique, des épizooties régulières surviennent environ tous les 5 à 10 ans. Dans la Caraïbe, les premières épidémies ont été répertoriées en 1640 en Guadeloupe, puis en 1655 en Jamaïque et en Martinique en 1687. C'est à Cuba que Carlos Finlay (1881) et plus tard, Walter Reed (1900) ont confirmé

doi:10.1684/vir.2019.0799

Correspondance : A.-B. Failloux
<anna-bella.failloux@pasteur.fr>

le rôle du moustique *Ae. aegypti* dans la transmission du YFV [12]. Dans les Antilles françaises, la Martinique a connu sa dernière épidémie en 1908 [13]. Aujourd'hui, la FJ urbaine n'est plus signalée dans la Caraïbe mais le moustique *Ae. aegypti* y est toujours prédominant. Dans la région, le YFV circule selon un cycle sylvatique sur l'île de Trinidad [14]. Cependant, nous ne pouvons exclure que des cas importés puissent initier un cycle urbain impliquant *Ae. aegypti* dans les autres îles [15]. Des cas importés sont signalés périodiquement dans des pays infestés par les moustiques du genre *Aedes* [16], comme en témoignent les 11 travailleurs chinois infectés lors de l'épidémie en Angola (2016), qui sont rentrés en Chine où ils ont développé la FJ [17]. Nous avons démontré qu'*Ae. aegypti* de Guadeloupe étaient réceptifs au YFV, transmettant des particules virales à partir du 14^e jour après l'infection [18].

La pénurie de vaccins contre la fièvre jaune associée à la distribution mondiale du principal vecteur *Ae. aegypti* devrait nous interpeller sur les moyens de lutter contre l'émergence de la FJ. Jusqu'à présent, les voyageurs infectés assurent de multiples introductions de FJ dans des pays indemnes de FJ sans générer d'infections secondaires. Une meilleure connaissance des caractéristiques génétiques des souches de YFV et des moustiques vecteurs, ainsi que la mise en place d'enquêtes sérologiques sur les primates non humains, pourrait aider à modéliser l'activité du YFV et à prédire les futurs sites d'émergence de la FJ. Ces prédictions aideront à l'identification des sites à risques pour proposer la vaccination aux populations et réaliser une lutte antivectorielle adaptée.

Liens d'intérêt : les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

Références

1. Delaporte F. The History of Yellow Fever : An Essay on the Birth of Tropical Medicine. Cambridge (MA) : MIT Press, 1991. pp. 103-24.
2. Barrett AD, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol* 2007 ; 52 : 209-29.
3. Monath TP, Vasconcelos PF. Yellow fever. *Journal of clinical virology: the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology* 2015 ; 64 : 160-73.
4. Bres PL. A century of progress in combating yellow fever. *Bulletin of the World Health Organization* 1986 ; 64(6) : 775-86.
5. Pinheiro FP, Corber SJ. Global situation of dengue and dengue haemorrhagic fever, and its emergence in the Americas. *World Health Stat Q* 1997 ; 50(3-4) : 161-9.
6. Reiter P, Sprenger D. The used tire trade: a mechanism for the worldwide dispersal of container breeding mosquitoes. *J Am Mosq Control Assoc* 1987 ; 3(3) : 494-501.
7. Consoli RAGB OR. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro. Editora Fiocruz, 1994. p. 228.
8. Carvalho RG, Lourenco-de-Oliveira R, Braga IA. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2014 ; 109(6) : 787-96.
9. Vasconcelos PF, Monath TP. Yellow Fever Remains a Potential Threat to Public Health. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2016 ; 16(8) : 566-7.
10. Couto-Lima D, Madec Y, Bersot MI, Campos SS, Motta MA, Santos FBD, et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep* 2017 ; 7(1) : 4848.
11. Yen PS, Amraoui F, Vega Rúa A, Failloux AB. *Aedes aegypti* mosquitoes from Guadeloupe (French West Indies) are able to transmit yellow fever virus. *PLoS One* 2018 ; 13(9) : e0204710.
12. Clements AN, Harbach RE. History of the discovery of the mode of transmission of yellow fever virus. *J Vector Ecol* 2017 ; 42(2) : 208-22.
13. Lowy I, Rodhain F. Paul-Louis Simond and yellow fever. *Bull Soc Pathol Exot.* 1999 ; 92(5 Pt 2) : 392-5.
14. Auguste AJ, Lemey P, Pybus OG, Suchard MA, Salas RA, Adesiyun AA, et al. Yellow fever virus maintenance in Trinidad and its dispersal throughout the Americas. *J Virol* 2010 ; 84(19) : 9967-77.
15. Vasquez V, Haddad E, Perignon A, Jaureguierry S, Brichler S, Leparc-Goffart I, et al. Dengue, chikungunya, and Zika virus infections imported to Paris between 2009 and 2016: Characteristics and correlation with outbreaks in the French overseas territories of Guadeloupe and Martinique. *Int J Infect Dis* 2018 ; 72 : 34-9.
16. Amraoui F, Vazeille M, Failloux AB. French *Aedes albopictus* are able to transmit yellow fever virus. *Euro surveill* 2016 ; 21 (39). doi: 10.2807/1560-7917.ES.2016.21.39.30361.
17. Song R, Guan S, Lee SS, Chen Z, Chen C, Han L, et al. Late or Lack of Vaccination Linked to Importation of Yellow Fever from Angola to China. *Emerg Infect Dis* 2018 ; 24 (7). doi: 10.3201/eid2407.171868.
18. Delang L, Yen PS, Vallet T, Vazeille M, Vignuzzi M, Failloux AB. Differential Transmission of Antiviral Drug-Resistant Chikungunya Viruses by *Aedes* Mosquitoes. *mSphere* 2018 ; 3(4). pii: e00230-18. doi: 10.1128/mSphere.00230-18.



Article 2

Gabiane G, Yen PS, Failloux AB. Aedes mosquitoes in the emerging threat of urban yellow fever transmission. Rev Med Virol. 2022 Jul;32(4):e2333. doi: 10.1002/rmv.2333. Epub 2022 Feb 6. PMID: 35124859.

REVIEW

WILEY

Aedes mosquitoes in the emerging threat of urban yellow fever transmission

Gaëlle Gabiane^{1,2} | Pei-Shi Yen¹  | Anna-Bella Failloux¹ 

¹Institut Pasteur, Université de Paris, Unit of Arboviruses and Insect Vectors, Paris, France

²Université des Antilles, Campus de Schoelcher, Schoelcher, Martinique

Correspondence

Pei-Shi Yen and Anna-Bella Failloux, Institut Pasteur, Université de Paris, Unit of Arboviruses and Insect Vectors, F-75015 Paris, France.

Email: pei-shi.yen@pasteur.fr and anna-bella.failloux@pasteur.fr

Funding information

Agence Nationale de la Recherche, Grant/Award Number: DSP-2021-269/ARS; Horizon 2020 Framework Programme, Grant/Award Numbers: 731060, 734548; Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases, Grant/Award Number: ANR-10-LABX-62-IBEID

Abstract

This last decade has seen a resurgence of yellow fever (YF) in historical endemic regions and repeated attempts of YF introduction in YF-free countries such as the Asia-Pacific region and the Caribbean. Infected travellers are the main entry routes in these regions where competent mosquito vectors proliferate in appropriate environmental conditions. With the discovery of the 17D vaccine, it was thought that YF would be eradicated. Unfortunately, it was not the case and, contrary to dengue, chikungunya and Zika, factors that contribute to YF transmission remain under investigation. Today, all the signals are red and it is very likely that YF will be the next pandemic in the YF-free regions where millions of people are immunologically naïve. Unlike COVID-19, YF is associated with a high case-fatality rate and a high number of deaths are expected. This review gives an overview of global YF situation, including the non-endemic Asia-Pacific region and the Caribbean where *Aedes aegypti* is abundantly distributed, and also proposes different hypotheses on why YF outbreaks have not yet occurred despite high records of travellers importing YF into these regions and what role *Aedes* mosquitoes play in the emergence of urban YF.

KEYWORDS

Aedes mosquitoes, risk assessment, yellow fever

1 | INTRODUCTION

Yellow fever (YF) has been a historical arboviral threat following massive populations displacements from its cradle of origin in Africa into the New World since the 17th century.¹ The discovery by Carlos Finlay and Walter Reed of yellow fever virus (YFV) transmission by the mosquito *Aedes aegypti* brought hope in the control of YF outbreaks in the Americas at the beginning of the 20th century.^{2,3} Thus,

vector control was the first attempt to eradicate urban YF transmission before the discovery of a YF vaccine. Unfortunately, relaxation of vector control measures and vaccine supply shortage hinder the control of YF. With the growing geographical expansion of *Ae. aegypti*, YF continues to be a burden for human health, causing each year, 51,000–380,000 severe cases and a very high in-hospital case fatality rate (20%–60%),^{4,5} with an estimated global disability-adjusted life year of 314 (95% uncertainty interval [UI] [67.2–900])

Abbreviations: CI, confidence interval; CrI, credible interval; CHIKV, chikungunya virus; DALY, disability-adjusted life year; DENV, dengue virus; ISV, insect-specific virus; JEV, Japanese encephalitis virus; NHP, non-human primate; PAHO, Pan-American Health Organisation; UI, uncertainty interval; YF, yellow fever; YFV, yellow fever virus; ZIKV, Zika virus.

All authors contributed equally to this work.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited and is not used for commercial purposes.

© 2022 The Authors. Reviews in Medical Virology published by John Wiley & Sons Ltd.

in 2017.⁶ Although the current YF epidemics are still restricted to Africa and South America, the past history of YF in the Caribbean and Mediterranean Europe has shown that the sporadic exportation of YF to the non-endemic regions could lead to local outbreaks in the presence of competent vector,^{7–9} particularly in the Caribbean islands which experienced deadly YF epidemics during the colonial era, and with a still on-going sylvatic YF circulation in Trinidad.¹⁰ On the contrary, even though YF has never struck the Asia-Pacific region, the region remains at high risk of emergence as it hosts millions of immunologically naive people living at close proximity with urban mosquitoes competent for YFV.¹¹ These two essential factors for YF urban transmission, along with expanding global transportation raise fears of YF occurrence in cities and its arrival in the Asia-Pacific region. This review compiles the current knowledge on YF and describes the entomological factors which might contribute to YF resurgence and emergence.

2 | DISCOVERY OF *Aedes aegypti*-MEDIATED YELLOW FEVER VIRUS TRANSMISSION

Between 1881 and 1889, YF caused thousands of deaths during the construction of the Panama Canal until the transmission mode of YFV was elucidated.¹² In 1881, Carlos Finlay hypothesised that YF was transmitted by *Ae. aegypti* (which was then called *Culex fasciatus*). Finlay inoculated 102 healthy volunteers with YFV-infected mosquitoes, and found that volunteers could develop YF symptoms.² However, the theory of transmission by mosquitoes was not very well accepted as some experimental designs could be improved, such as unstandardised criteria for mild YF diagnosis, and incorrect assumption on mosquito vector competence.^{2,13} The mosquito-mediated YFV transmission was verified in 1900. Walter Reed and colleagues confirmed Finlay's hypothesis with improved experiments; two members of Reed's research team, James Carroll and Jesse Lazare volunteered for self-experimentation with YFV-infected mosquitoes and developed into severe and lethal symptoms.¹⁴ The death of Jesse Lazare brought enough attention and a more rigorous experimentation was carried out thereafter. After several tests with human volunteers and YFV-infected mosquitoes, Reed proved the route of YFV transmission by mosquitoes.³ In these experiments, YF symptoms could be observed in the volunteers exposed to *Ae. aegypti* having become infected 14–25 days after feeding on symptomatic patients.³ These findings opened a new era in the control of infectious diseases through controlling mosquito vectors.

3 | YELLOW FEVER VIRUS GENOME

YFV was first isolated in 1927, from a symptomatic patient in Ghana.^{15,16} Belonging to the family *Flaviviridae*, YFV is an enveloped virus with an icosahedral capsid of 40–60 nm diameter. The genome of YFV is a positive sense, single-stranded RNA molecule. Except the highly structured 5' and 3' untranslated regions that are essential for

virus replication, the 11 kb YFV genome contains a single open reading frame encoding for three structural proteins (capsid [C], matrix [M], and envelope [E]) and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, and NS5). All the viral proteins have a defined role to allow infecting the host cells and escape the immune system.¹⁷

4 | YELLOW FEVER VIRUS GENOTYPES IN AFRICA AND AMERICA

There are seven YFV genotypes identified: five African genotypes (West Africa I, West Africa II, Angola, East Africa, and East/Central Africa) and two American genotypes (South America I and South America II) (Figure 1). Phylogenetic studies have suggested that among the five African genotypes, the Angola, East Africa, and East/Central Africa genotypes are genetically more heterogeneous than the West Africa genotypes I and II.¹⁸ While the two American genotypes are closely related to each other, the two West African genotypes were less diverged than the other African genotypes to the American genotypes, suggesting that West Africa is the possible origin of the YFV strains circulating in America.¹⁹ Evidence suggests that the West Africa II and East/Central Africa genotypes are enzootic YFV in Africa, whereas the West Africa genotype I might be circulating among human populations, even though nucleotide and amino acid sequence variations between West Africa genotypes I and II are close. Interestingly, the Angola genotype is the most divergent genotype compared to the other African genotypes, however, it does not present significant differences in amino acids sequence; the sequence variation between YFV Angola and East Africa genotype is only 0.4%–0.9% in amino acids but 16.7%–17.4% in nucleotides.¹⁸ In South America, the YFV phylodynamic data suggests that the recent YFV epidemics were initiated by different genotypes originating from different regions. The last outbreaks were mainly caused by the America genotype I from Trinidad and Tobago, which was imported from Northern Brazil in the 1950s and responsible for the outbreaks before the 1990s. The most recent genotype belongs to the America genotype II which can be traced back to 1956; this genotype spread from Peru to the neighbouring countries of Bolivia, Ecuador, Northern Brazil, Trinidad and Tobago, where only sylvatic YFV transmissions were reported.²⁰

5 | YELLOW FEVER VIRUS TRANSMISSION

5.1 | Sylvatic, rural, and urban cycles of yellow fever virus

Three transmission cycles are classically described; they involve different vectors and hosts in different ecological environments. In the sylvatic cycle, the virus is circulating only between NHPs (playing the role of amplification hosts) and zoophilic mosquito species. In the intermediate cycle, the virus can be passed from NHPs to humans

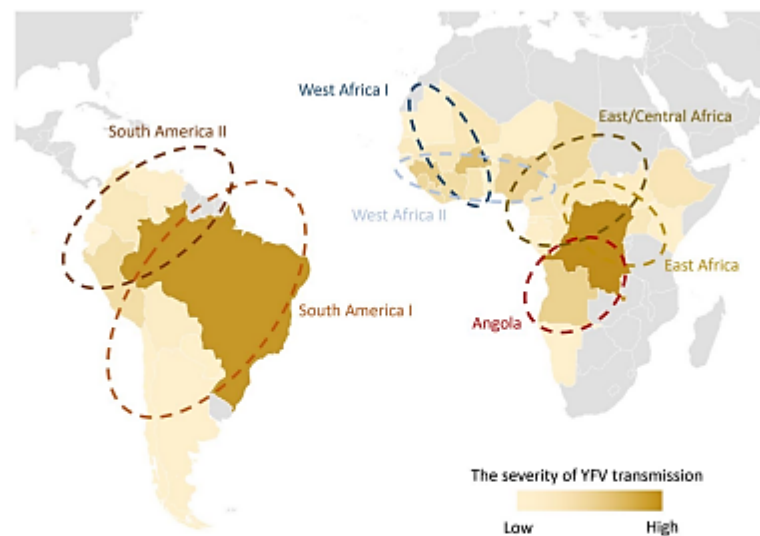


FIGURE 1 Africa and America yellow fever (YF) epidemics from 2000 to 2020 and circulating genotypes. The severity of YF virus transmission was calculated with the annual reported cases that weighted by the year of outbreak, the more recent the heavier. Data were extracted from Global Health Observatory, WHO (<https://www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/yellow-fever---number-of-reported-cases>); the map was created by Microsoft PowerPoint

through the transmission by an anthrozoophilic mosquito; increasing human activities at the fringe between the forest and the human dwellings accentuate spill over events (emergence zone). The urban cycle occurs when infected people are repeatedly confronted to bites of anthropophilic YFV-infected mosquitoes. Up to date, YFV circulation is restricted only in sub-Saharan Africa and South America.

5.2 | *Aedes aegypti* as the main epidemic vector of urban yellow fever virus

A competent mosquito can become a vector by ingesting the virus from an infected host, and being able to transmit the virus to other hosts through the bite. In a mosquito, the ingested virus infects and replicates in mosquito midgut epithelial cells. After several days of incubation, virions are produced and released in the mosquito general cavity named hemocele. With the haemolymph, viral particles disseminate and infect several internal organs and tissues. Finally, the virus reaches the salivary glands where it replicates and is excreted with saliva during blood feeding. Among many mosquito vectors that are able to transmit human pathogens, *Ae. aegypti* is a major vector for various arboviral diseases. As it is highly adapted to artificial containers, has an anthropophilic behaviour, and limited flight range, *Ae. aegypti* proliferates in human habitats where it intervenes in urban epidemics. *Ae. aegypti* is mainly present in tropical and subtropical regions of Africa, Asia, and America,²¹ with a trend of rapid expansion due to the eggs resistance to desiccation²² that facilitates long-distance transportation; it also contributed to the establishment

of *Ae. aegypti* in Mediterranean Europe during the early 17th century to the mid-20th century, until its disappearance after 1950.⁸ *Ae. aegypti* is an efficient vector for YFV transmission; accumulating studies have indicated that its vector competence for YFV depends on the combination of virus genotype and mosquito population.²³ In general, in the YFV epidemic regions, it is believed that African *Ae. aegypti* (from Kenya, South Africa, Guinea, and Capo Verde) were less susceptible to African YFV strains^{24–27} compared to American *Ae. aegypti* (Brazil, Venezuela, and the USA) that are more susceptible to American genotypes.^{26,28,29}

5.3 | *Aedes albopictus* as a potential vector of rural yellow fever virus transmission

YFV can be transmitted by *Aedes albopictus*; like *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* is also an invasive species. Native to Asia, *Ae. albopictus* has invaded the Americas from 1985 through two main routes: via Japan to North America, and via Southeast Asia (Cambodia, Vietnam, and Thailand) to South America. *Ae. albopictus* has similar geographical distribution to *Ae. aegypti* but can also be found in temperate regions.²¹ In Caribbean countries, the presence of *Ae. albopictus* was firstly reported in the Dominican Republic in 1993,³⁰ and has reached several Caribbean countries since then, including Barbados,³¹ Cayman Islands,³² Cuba,³³ Haiti,³⁴ Jamaica,³⁵ and Trinidad.³⁶ Similar to those of *Ae. aegypti*, eggs of *Ae. albopictus* are resistant to desiccation, but in contrast to those of *Ae. aegypti*, eggs of *Ae. albopictus* are able to diapause ensuring a dispersion over long distances and a survival at low winter temperatures^{37,38} In addition, *Ae. albopictus* is

able to colonize artificial and small natural breeding sites, and to feed on animals in the absence of humans as a blood source,³⁹ whereas *Ae. aegypti* is highly anthropophilic and adapted to artificial containers. Therefore, owing to its great ecological and physiological plasticity, *Ae. albopictus* is able to colonize both tropical and even temperate regions. Moreover, *Ae. albopictus* from Africa and America can transmit different strains of YFV.^{26,28,40} On the field, YFV-infected *Ae. albopictus* was found at the edge of a forest in Brazil,⁴¹ suggesting that *Ae. albopictus* has the potential to act as a bridge vector allowing YFV spillover events from the sylvatic cycle to the urban cycle where *Ae. aegypti* is predominant.

5.4 | Yellow fever virus transmission in Africa

Africa has been the historical epicentre of YF,⁴² and is still contributing to more than 90% of clinical cases worldwide each year; in 2018, approximately 100,952 (95% credible interval [CrI] [63,001–158,362]) severe infections and 47,318 (95% CrI [29,126–74,981]) deaths were reported.^{16,43,44} Although the mortality rate of YF in Africa is lower than in South America,⁴⁵ the recent massive YF outbreak in Angola during 2015–2016 still caused 375 deaths, and was then spread to countries such as Democratic Republic of Congo, Uganda, and even China.^{46,47} In Africa, several *Aedes* spp. mosquito species are responsible for sylvatic, rural, and urban YFV transmission cycles, which increase the complexity of YFV control by breaking the transmission between each cycle. Forest canopy dwelling *Aedes* spp. mosquitoes such as *Aedes africanus*, *Aedes furcifer*, *Aedes taylori*, *Aedes luteocephalus*, and *Aedes opok*, are the major vectors for YFV transmission between NHPs in the jungle, whereas *Ae. aegypti*, *Ae. furcifer*, *Aedes vittatus*, *Aedes bromeliae*, and *Aedes keniensis* that feed on both NHPs and humans, are bridge vectors helping YFV to spill out of the sylvatic cycle.⁴⁸ Among these last mosquitoes, *Ae. aegypti* is the only species able to survive in urban areas and mediate YFV transmission among human populations. The situation has been worsened with climate change; an estimation of YF sylvatic spillover transmission based on a YF occurrence model and environmental factors in Africa, indicated that there will be 93.0% (95% confidence interval [CI] [92.7%, 93.2%]) chance of annual deaths to increase in 2050.⁴⁹

5.5 | Yellow fever virus transmission in South America

In South America, *Haemagogus* spp. and *Sabethes* spp. are the mosquitoes that transmit YFV among NHPs in the sylvatic cycle,^{50,51} and the major source of human infections come from a YFV sylvatic transmission in Brazil.⁵² The recent YF epizootic in Brazil between 2016 and 2019 that initiated in Minas Gerais state, affected more than 15,000 NHPs in the forest and even caused 2251 human infections.⁵² Evidence suggested that humans were infected from the sylvatic cycle only 4 days after an epizootic was declared.⁵³

Vaccination is still the prevention measure against YFV infection in South America, particularly in high-risk areas, even though it still cannot stop YFV sylvatic transmission during epizootics.^{53,54} Unlike Africa, the rural cycle at the boundary between rural and urban cycles has an unclear status in South America. A competent mosquito vector could act as a bridge vector for a transmission of YFV from one transmission cycle to another. *Ae. albopictus* can play this role because of its both anthropophilic and zoophilic behaviour. This species can experimentally transmit YFV.²⁸ However, since the mosquito eradication campaigns organised in the early 20th century by the Rockefeller Foundation followed by the Pan-American Health Organization,⁵⁵ which likely had held off YFV urban transmission, YF only persists in a sylvatic cycle and no urban epidemics have been reported up to date.⁵³

5.6 | Yellow fever virus transmission in the Caribbean

Vector-borne diseases played a significant geopolitical role during the colonial era in the Caribbean region. Started from Barbados in 1647, the Caribbean islands suffered from massive urban YF outbreaks.³ It spread to Cuba, Guadeloupe, Jamaica, Martinique, and Saint Kitts.¹ From 1793 to 1798, in the British-dominated Santo Domingo (today Haiti) island, tropical diseases caused the death of about 12,700 British troops, and mostly were believed to be YF.⁵⁶ Later on, in 1804, the French troops lost 50,000–55,000 of soldiers in the island during the most serious epidemic of YF in the Caribbean history, leading to Santo Domingo's independence.⁵⁷ Concomitantly, YF indirectly led to the sale of Louisiana by Napoleon Bonaparte to the United States because of high human losses due to malaria and YF. Although the current YFV transmission in the Caribbean is still restricted to Trinidad where a sylvatic YFV transmission is ensured by *Haemagogus janthinomys* and *Sabethes chloropterus*,¹⁰ growing exchanges between the Caribbean islands increase the risk of urban YFV. Moreover, the risk of YFV spillover transmission is also increased by the abundant distribution of *Ae. aegypti* and newly invaded *Ae. albopictus* in Trinidad.^{36,58} Thus, YFV circulating in Trinidad was the cause of YFV epizootic in America in 1978–1980.²⁰

5.7 | Yellow fever raged in Europe

The history of European YF epidemics has demonstrated the risk of YFV transmission in temperate regions with the presence of competent vectors. In the 19th century, Europe was affected by YF like in the Caribbean. Both YFV and *Ae. aegypti* were introduced as early as 18th century in Europe, mainly in port cities surrounding the Mediterranean Sea.⁵⁵ Outbreaks were reported in Spain (Barcelona, Gibraltar, Sevilla, Cadiz, Malaga), Portugal (Lisbon, Porto), France (Marseille, Brest, Saint-Nazaire, Rochefort, Bordeaux), and Italy (Livorno).⁵⁹ More than 3500 people died in Barcelona in 1821, and

more than 6000 in Lisbon in 1857.⁶⁰ After the 1950s, better management of water collections in cities and vector control with DDT, along with decrease in maritime traffic between harbours of Mediterranean countries could have contributed to eradicate *Ae. aegypti* from Europe.⁷ Its last record was reported in Italy in 1971.⁶¹ However, the mosquito can still be found in South Russia, West Georgia, and North Turkey,⁶²⁻⁶⁴ with gaining ground towards the West.⁶³ Nonetheless, the estimation on the suitability of *Ae. aegypti* in the European region is low, as the minimum temperature and humidity do not reach the requirements of *Ae. aegypti* to establish sustainable populations.⁶⁵ The risk of YFV transmission carried out by *Ae. aegypti* in Europe is considerably low.

6 | THE EXCEPTION OF THE ASIA-PACIFIC REGION

6.1 | The Asian paradox

Even though 75% of global dengue disease burden are reported in the Asia-Pacific region in the last century,⁶⁶ YFV has never settled in Asia despite several opportunities of introduction. While historical records trace more clearly the introduction of YF in America via the slave trade, past interactions between Africa and Asia received much less attention.^{67,68} The history of the slave trade from Africa to Asia can be traced back to 2900 B.C. in Egypt.⁶⁹ From the 17th to the 19th century when YFV was introduced into America, there were more than five million slaves transported to Asia, mostly to countries of the Indian Ocean and South Asia.⁶⁹ Furthermore, after the completion of the Panama Canal in the early 1900s which shortened the duration of travel between Latin America and Asia, many cities in the Asia-Pacific region were considered at high YFV transmission risk.⁷⁰ However, the concern regarding to YFV introduction through the Panama Canal to Asia was discussed, but no confirmed incident was ever reported except of a non-laboratory confirmed YF-like outbreak in Hong Kong in 1865-1866.⁷¹ In 2016, 11 YFV-infected workers returned to China from Angola where a YFV outbreak was active.⁷² Although these incidents were properly managed in China, the probability of priming an epidemic hitting millions of immunologically naive people caught the attention of the scientific community as experienced today with the COVID-19 pandemic.⁷³

6.2 | Mosquito vectors in the Asia-Pacific region

Mosquito species should not be an obstacle for YFV transmission in the Asia-Pacific region where both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* are abundant. Vector competence of Asian *Ae. aegypti* for YFV was successfully demonstrated in laboratory conditions early in 1929.⁷⁴ *Ae. aegypti* mosquitoes collected in Indonesia were susceptible to YFV from West Africa, and able to transmit YFV from an infected patient to monkeys. More recent studies showed that *Ae. aegypti* mosquitoes from Cambodia and Vietnam were more susceptible than Brazilian

populations to the South America genotype I,²⁶ and an *Ae. aegypti* colony from Laos was also able to transmit the West Africa genotype I.⁷⁵ Moreover, a more extensive study analysing *Aedes* spp. from the Asian-Pacific region indicated that both *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* were susceptible to the West Africa genotype I; the *Ae. aegypti* from Cambodia, Vietnam, Laos, Thailand, Singapore, Taiwan, New Caledonia, and French Polynesia were able to transmit YFV, corroborating the status of competent vector assigned to *Ae. aegypti* from the Asia-Pacific region. On the contrary, *Ae. albopictus* mosquitoes from the region were less susceptible to YFV.¹¹

7 | MOSQUITO MICROBIOTA CAN INFLUENCE MOSQUITO VECTOR COMPETENCE

Different mosquito genetic backgrounds in various geographical locations cannot solely explain the absence of YF in Asia-Pacific region, factors other than mosquito genetics that cause regional differences in endemic arboviral diseases are to be elucidated. The impact of mosquito microbiota in non-YF endemic regions on vector competence for YFV, is the next to be investigated to access the future risk of YFV transmission.

Accumulating studies have suggested mosquito microbiota can either directly or indirectly affect mosquito vector competence for arboviruses. From larval to adult stages, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* acquire microbes vertically or from the environment, and harbour them in gut or other organs/tissues.⁷⁶⁻⁸⁰ The composition of microbiota (mainly viruses and bacteria) changes with mosquito age, probably resulting from competition among symbionts for resources^{77,81} or mosquito immunity⁸² with effects on vector competence. Although the molecular mechanisms still need to be elucidated, accumulating evidence has indicated that insect-specific viruses (ISVs) influence mosquito immunity, with effects directly on viral replication and indirectly on mosquito microbiota leading to shape vector competence for arboviruses.⁸³⁻⁸⁸ An example is Nhumirim virus (*Flaviviridae*) that was originally found in *Culex chidesteri*,⁸⁹ was able to reduce Zika virus (ZIKV) transmission but not chikungunya virus (CHIKV) in *Ae. aegypti*, suggesting a species-dependent manner for the interaction between ISVs and arboviruses in mosquitoes. Although not necessarily vertically transmitted, arboviruses are also part of mosquito virome and can also influence the vector competence.⁹⁰ *Ae. aegypti* is able to co-transmit CHIKV, DENV and ZIKV simultaneously, but the effects of one arbovirus on transmission of the other are not significant.⁹¹ On the contrary, the impact of bacteria on mosquito vector competence has been extensively studied. Mosquito bacteria affect vector competence by inducing immune responses,^{80,92-94} competing for nutritive resources,^{95,96} producing secondary metabolites,^{97,98} and even triggering RNAi immunity.^{99,100} Among all mosquito symbionts, *Wolbachia* is the most intensively studied bacteria that suppresses YFV replication in *Ae. aegypti*,^{101,102} even though the molecular mechanism is still unclear. The interactions between mosquito microbiota and arbovirus depends on the composition of microbiota

that a mosquito acquired from different environments. Thus, the microbiota diversity among geographic populations could be another factor that shapes the mosquito vector competence, and subsequently limiting the spreading of YFV.^{103,104}

8 | DISCUSSION

Although competent vectors are abundantly present, the Asia-Pacific and Caribbean regions are still free of YF urban transmission. However, the growing international exchanges have once again raised the risks of YF spreading, threatening immunologically naive populations. It is believed that to establish persistent transmission cycles, both sylvatic and urban, and repeated introductions of YF are critical as experienced in the past between Africa and America (Figure 2). The global expansion of the urban vector, *Ae. aegypti* has challenged the current prevention systems for YF in South America and the Caribbean, threatening them with urban YF outbreaks like in the past. In Trinidad, YFV circulates within a sylvatic cycle and has proved in the past to be able to escape from this jungle cycle.²⁰ This viral strain is responsible for the large outbreaks currently observed in South America, making this scenario more real than ever. In Asia, the air traffic between China and African nations has grown significantly in

the last decades. The risk of YFV importation into China is considerably high as Guangzhou airport welcomes millions of passengers including those from YFV endemic countries, such as Ethiopia and Kenya.¹⁰⁵ Moreover, Guangzhou is the city where *Ae. albopictus* is abundantly distributed and has caused dengue fever outbreaks since 2013.¹⁰⁶ Fortunately, even though the environment favours YFV transmission, the YFV importation in 2016 did not lead to any autochthonous transmission. However, Guangzhou remains a city in Southeast Asia possessing the highest probability of YFV outbreaks.¹⁰⁷ Moreover, the distribution of the main YF vector *Ae. aegypti* is moving north and has reached southern China, in a region only 500 km away from Guangzhou.¹⁰⁸ As it is predicted that the environmental conditions in Guangzhou will become more suitable for *Ae. aegypti* in a few decades,¹⁰⁸ this renders the scenario more realistic than in 2016, and likely more possible than ever. Notably, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* from the Asia-Pacific region are experimentally competent to transmit YFV. Thus, vector populations are seemingly not a brake to the emergence of YF in the region.¹¹ Likewise, in Asia, all the ingredients to fuel a sylvatic cycle are gathered with *Macaca* spp. monkeys being able to play the role of a YFV amplification host.^{7,4,109,110} The establishment of a wild cycle could be a prerequisite for spillovers and human infections in Asia as it has been shown in South America (Figure 3).⁵³

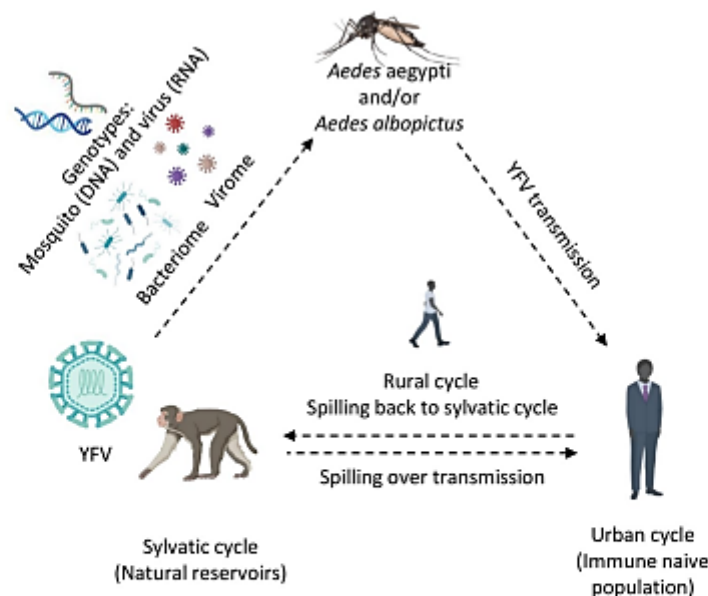


FIGURE 2 The mode of yellow fever (YF) sporadic urban outbreaks. *Aedes* mosquitoes are pivotal to initiate YF virus (YFV) urban outbreaks in non-epidemic areas, and potentially playing the role of bridge vector in rural areas, spilling YFV back to sylvatic cycle. YFV could be therefore circulating between mosquitoes and natural amplification hosts, until it spills over to rural and urban cycles to initiate a persistent outbreak. Mosquito and virus genotypes, bacteriome, and virome are factors that influence the risk of YFV urban transmission and are important targets for surveillance systems to prevent YF outbreak in a non-epidemic area. Icons in this figure were created with [BioRender.com](#), or acquired from science clipart PNG designed by Morphart with [Pngtree.com](#)

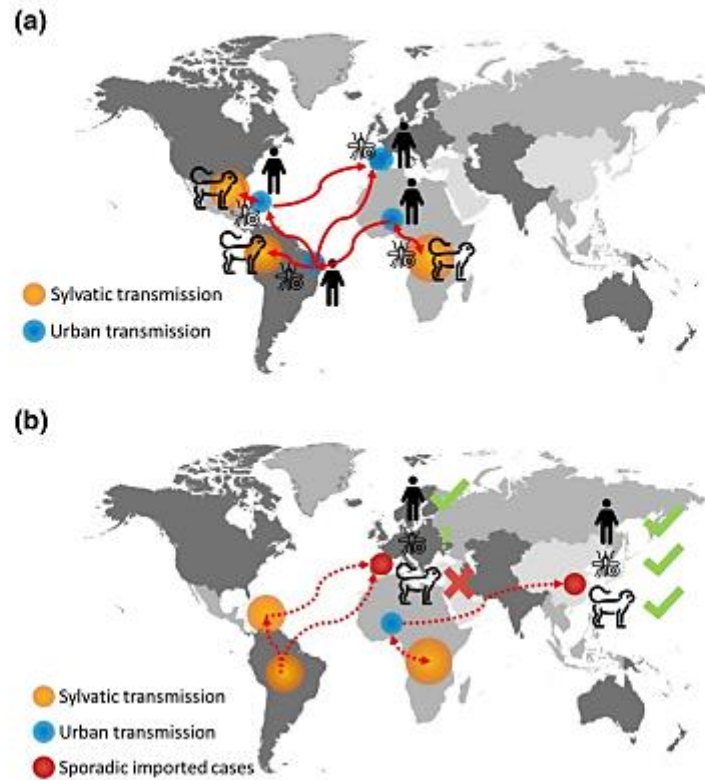


FIGURE 3 Yellow fever (YF) transmission cycles. (a) Past dynamics of transmission. (b) Risk of YF outbreaks in the future. Yellow fever virus (YFV) has two transmission cycles described in Africa and America: sylvatic and urban (the intermediate cycle being described only in Africa). The sylvatic cycle (also named jungle cycle) involves the transmission of YFV between non-human primates and zoophilic mosquitoes. The urban cycles involve the transmission of YFV between humans and anthropophilic mosquitoes, primarily *Aedes aegypti*. Today, outside Africa, only persists a sylvatic cycle in America. However, all components likely to favour YFV circulation in Asia are there, immunologically naive human populations, competent mosquito vectors, and susceptible natural reservoir hosts, in contrast with Europe where there is no reservoir hosts and limited number of competent vectors for YFV. Solid arrows: the direction of YFV spreading in the past. Dashed arrows: the current risk of YFV spreading. The size of circles represents the probability of each transmission cycle to occur: the sylvatic transmission is more likely to occur than the urban and sporadic imported cases. World map in this figure is adapted from [freepnglogos.com](https://www.freepnglogos.com); the icons were designed by Voysla, Freepik, and kerismaker from Flaticon

Globalisation is changing the landscape of global arboviral diseases transmission and challenging the current circulation zone of each arbovirus. Therefore, local endemic viruses might have the chance to interact with introduced viruses from distinct geographic regions, which could change the virome of local mosquito populations, and subsequently affect the vector competence. YFV endemic to Africa and South America and Japanese encephalitis virus exclusively present in Asia, are both *Flaviviruses* that could be transmitted by *Ae. aegypti* in the Asia-Pacific region. Co-infections can occur either simultaneously or sequentially in mosquitoes with an outcome depending on interactions between arboviruses and ISV and microbial communities.

To conclude, the growth of international traffic and expansion of *Ae. aegypti* geographical distribution have posed YF urban outbreaks as a global threat to public health. While vaccination against YF remains the most effective method to limit YFV in endemic areas in response to an ongoing outbreak, mosquito vector surveillance and control are still playing a decisive role to break YFV transmission chain, before or even at the beginning of an outbreak. Information regarding the factors that are affecting mosquito vector competence for YFV could be more widely assessed and monitored as a component of a national surveillance programme. Insecticides are currently the main approach for mosquito control programme despite several other alternatives proposed to reduce the size of the

target population or replace the target population with a pathogen refractory strain. This can be achieved with *Wolbachia*-carrying and genetically modified mosquito control approaches.¹¹¹ To prevent a foreseeable urban YFV transmission, more investment should be made in mosquito vector surveillance and control programme, and vaccine development, in response to different YF transmission scenarios in the future.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Patricia Smiley for correcting English. This work was supported by the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under (grant number 731060) (Infravec2, Research Infrastructures for the control of vector-borne diseases; <http://infravec2.eu/>), the Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant number ANR-10-LABX-62-IBEID), the European Union's Horizon 2020 research and innovation program under ZIKAlliance (grant number 734548), and the "Agence régionale de Santé de Martinique" (grant number DSP-2021-269/ARS Martinique).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Gaëlle Gabiane contributed to the writing. Pei-Shi Yen was involved in the conceptualization and writing. Anna-Bella Failloux contributed to the conceptualization and writing.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

Data sharing is not applicable to this article as no new data were created or analysed in this study.

ORCID

Pei-Shi Yen  <https://orcid.org/0000-0002-2113-7394>

Anna-Bella Failloux  <https://orcid.org/0000-0001-6890-0820>

REFERENCES

- McNeill JR. Yellow jack and geopolitics: environment, epidemics, and the struggles for empire in the American tropics, 1650–1825. *QAH Mag Hist.* 2004;18(3):5.
- Chaves-Carballo E, Carlos Finlay and yellow fever: triumph over adversity. *Mil Med.* 2005;170(10):881–885. <https://doi.org/10.7205/milmed.170.10.881>
- Reed W, Carroll J, Agramonte A. Experimental yellow fever. 1901. *Mil Med.* 2001;166(9 Suppl):55–60.
- Ho YL, Joelsons D, Leite GFC, et al. Severe yellow fever in Brazil: clinical characteristics and management. *J Trav Med.* 2019;26(5). <https://doi.org/10.1093/jtm/taz040>
- Kallas EG, Wilder-Smith A. Managing severe yellow fever in the intensive care: lessons learnt from Brazil. *J Trav Med.* 2019;26(5). <https://doi.org/10.1093/jtm/taz043>
- DALYs GBD, Collaborators H. Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990–2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet.* 2018;392(10159):1859–1922. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)32335-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)32335-3)
- Holstein M. Dynamics of *Aedes aegypti* distribution, density and seasonal prevalence in the Mediterranean area. *Bull World Health Organ.* 1967;36(4):541–543.
- Schaffner F, Mathis A. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *Lancet Infect Dis.* 2014;14(12):1271–1280. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70834-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70834-5)
- Barrett ADT. The reemergence of yellow fever. *Science.* 2018; 361(6405):847–848. <https://doi.org/10.1126/science.aau8225>
- Rawlins SC, Hull B, Chadee DD, et al. Sylvatic yellow fever activity in Trinidad, 1988–1989. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1990;84(1): 142–143. [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(90\)90411-7](https://doi.org/10.1016/0035-9203(90)90411-7)
- Lataillade LG, Vazeille M, Obadia T, et al. Risk of yellow fever virus transmission in the Asia-Pacific region. *Nat Commun.* 2020;11(1): 5801. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-19625-9>
- Gorgas WC. Sanitation at Panama. *JAMA.* 1912;58(13):3.
- Agramonte A. The inside history of a great medical discovery. *Mil Med.* 2001;166(9 Suppl):68–78.
- Mehra A. Politics of participation: Walter Reed's yellow-fever experiments. *Virtual Mentor.* 2009;11(4):326–330. <https://doi.org/10.1001/virtualmentor.2009.11.4.mhst1-0904>
- Barrett AD, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol.* 2007;52:209–229. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.52.110405.091454>
- Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *JAMA.* 2008;300(8):960–962. <https://doi.org/10.1001/jama.300.8.960>
- Cedillo-Barron L, García-Cordero J, Shrivastava G, et al. The role of flaviviral proteins in the induction of innate immunity. *Subcell Biochem.* 2018;88:407–442. https://doi.org/10.1007/978-981-10-8456-0_17
- Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE, Barrett AD. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol.* 2001;75(15):6999–7008. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.15.6999-7008.2001>
- Bryant JE, Holmes EC, Barrett AD. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 2007;3(5):e75. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030075>
- Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenco-de-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of yellow fever virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep.* 2017;7(1):7385. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-07873-7>
- Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, et al. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife.* 2015;4: e08347. <https://doi.org/10.7554/eLife.08347>
- Sota T, Mogi M. Interspecific variation in desiccation survival time of *Aedes (Stegomyia)* mosquito eggs is correlated with habitat and egg size. *Oecologia.* 1992;90(3):353–358. <https://doi.org/10.1007/BF00317691>
- Yen PS, Amraoui F, Vega Rúa A, Failloux AB. *Aedes aegypti* mosquitoes from Guadeloupe (French West Indies) are able to transmit yellow fever virus. *PLoS One.* 2018;13(9):e0204710. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204710>
- Ellis BR, Sang RC, Horne KM, Higgs S, Wesson DM. Yellow fever virus susceptibility of two mosquito vectors from Kenya, East Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2012;106(6):387–389. <https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2012.02.007>
- Jupp PG, Kemp A. Laboratory vector competence experiments with yellow fever virus and five South African mosquito species including *Aedes aegypti*. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2002;96(5): 493–498. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(02\)90417-7](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(02)90417-7)
- Lourenco-de-Oliveira R, Vazeille M, Bispo de Filippis AM, Failloux AB. Oral susceptibility to yellow fever virus of *Aedes aegypti* from

- Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2002;97(3):437-439. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762002000300031>
27. Vazeille M, Yebakima A, Lourenco-de-Oliveira R, et al. Oral receptivity of *Aedes aegypti* from Cape Verde for yellow fever, dengue, and chikungunya viruses. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2013;13(1):37-40. <https://doi.org/10.1089/vbz.2012.0982>
 28. Couto-Lima D, Madec Y, Bersot M, et al. Potential risk of re-emergence of urban transmission of yellow fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Sci Rep*. 2017;7(1):4848. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05186-3>
 29. Johnson BW, Chambers TV, Crabtree MB, et al. Vector competence of Brazilian *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* for a Brazilian yellow fever virus isolate. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2002;96(6):611-613. [https://doi.org/10.1016/s0035-9203\(02\)90326-3](https://doi.org/10.1016/s0035-9203(02)90326-3)
 30. Peña CJ. First report of *Aedes (stegomyia) albopictus* (skuse) from the Dominican republic. *Vector Ecol Newsl*. 1993;24(68).
 31. Rodhain F. [Problems posed by the spread of *Aedes albopictus*]. *Bull Soc Pathol Exot*. 1996;89(2):137-140. discussion 140-1. Problemes poses par l'expansion d'*Aedes albopictus*.
 32. Reiter P. *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? *J Am Mosq Control Assoc*. 1998;14(1):83-94.
 33. Broche RG, Borja EM. *Aedes albopictus* in Cuba. *J Am Mosq Control Assoc*. 1999;15(4):569-570.
 34. Fernandez Mdel C, Jean YS, Callaba CA, Lopez LS. The first report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Haiti. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2012;107(2):279-281. <https://doi.org/10.1590/s0074-02762012002000020>
 35. Ali I, Mundle M, Arzinger JJ, Sandiford SL. Tiger in the sun: a report of *Aedes albopictus* in Jamaica. *Acta Trop*. 2019;199:105112. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105112>
 36. Chadee DD, Fat FH, Persad RC. First record of *Aedes albopictus* from Trinidad, west indies. *J Am Mosq Control Assoc*. 2003;19(4):438-439.
 37. 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):1177-1185. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005>
 38. Waldock J, Chandra NL, Lelieveld J, et al. The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathog Glob Health*. 2013;107(5):224-241. <https://doi.org/10.1179/2047773213Y.0000000100>
 39. Kamgang B, Nchoutpouen E, Simard F, Paupy C. Notes on the blood-feeding behavior of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Cameroon. *Parasite Vector*. 2012;57. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-5-57>
 40. Kamgang B, Vazeille M, Yougang AP, et al. Potential of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) to transmit yellow fever virus in urban areas in Central Africa. *Emerg Microb Infect*. 2019;8(1):1636-1641. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1688097>
 41. Pereira Dos Santos T, Roiz D, Santos de Abreu FV, et al. Potential of *Aedes albopictus* as a bridge vector for enzootic pathogens at the urban-forest interface in Brazil. *Emerg Microb Infect*. 2018;7(1):1-8:191. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0194-y>
 42. Chippaux JP, Chippaux A. Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*. 2018;24:20. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0162-y>
 43. Gaythorpe KA, Hamlet A, Jean K, et al. The global burden of yellow fever. *Elife*. 2021;e64670. <https://doi.org/10.7554/eLife.64670>
 44. Barrett AD, Monath TP. Epidemiology and ecology of yellow fever virus. *Adv Virus Res*. 2003;61:291-315. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)61007-9](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)61007-9)
 45. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis*. 2001;1(1):11-20. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(01\)00016-0](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(01)00016-0)
 46. Vasconcelos PF, Monath TP. Yellow fever remains a potential threat to public health. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016;16(8):566-567. <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.2031>
 47. Song R, Guan S, Lee SS, et al. Late or lack of vaccination linked to importation of yellow fever from Angola to China. *Emerg Infect Dis*. 2018;24(7):1383-1386. <https://doi.org/10.3201/eid2407.171868>
 48. WHO. *Yellow Fever Rapid Field Entomological Assessment During Yellow Fever Outbreaks in Africa*; 2014.
 49. Gaythorpe KA, Hamlet A, Cibrelus L, Garske T, Ferguson NM. The effect of climate change on yellow fever disease burden in Africa. *Elife*. 9. 2020;e55619. <https://doi.org/10.7554/eLife.55619>
 50. WHO. *Risk Assessment on Yellow Fever Virus Circulation in Endemic Countries*; 2011.
 51. Abreu FVS, Ribeiro IP, Ferreira-de-Brito A, et al. Haemagogus leucocelaenus and haemagogus janthinomys are the primary vectors in the major yellow fever outbreak in Brazil, 2016-2018. *Emerg Microb Infect*. 2019;8(1):218-231. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1568180>
 52. Silva NIO, Sacchetto L, de Rezende IM, et al. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virology*. 2020;17(1):9. <https://doi.org/10.1186/s12985-019-1277-7>
 53. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*. 2018;361(6405):894-899. <https://doi.org/10.1126/science.aat7115>
 54. Shearer FM, Moyes CL, Pigott DM, et al. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(11):1209-1217. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30419-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30419-X)
 55. Vainio J, Cutts F. *Yellow Fever*. World Health Organization; 1998.
 56. Geggus D. Yellow fever in the 1790s: the British army in occupied Saint Domingue. *Med Hist*. 1979;23(1):38-58. <https://doi.org/10.1017/s0025727300051012>
 57. Cathey JT, Marr JS. Yellow fever, historical. *International Encyclopedia of Public Health*. 2nd ed., 2017:11.
 58. Focks DA, Chadee DD. Pupal survey: an epidemiologically significant surveillance method for *Aedes aegypti*: an example using data from Trinidad. *Am J Trop Med Hyg*. 1997;56(2):159-167. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1997.56.159>
 59. Bres PL. A century of progress in combating yellow fever. *Bull World Health Organ*. 1986;64(6):775-786.
 60. Kohn GC. *Encyclopedia of Plague and Pestilence: From Ancient Times to the Present*. Rev. ed. Facts on File Library of World History. x. Facts on File; 2001:454.
 61. Callot J, Delecolle JC. [Entomological notes. VI. Septentrional localization of *Aedes Aegypti*]. Notes d'entomologie. VI. Localisation septentrionale d'*Aedes Aegypti*. *Ann Parasitol Hum Comp*. 1972;47(4):665.
 62. Iunicheva Iu V, Riabova TE, Markovich N, et al. [First evidence for breeding *Aedes aegypti* L in the area of Greater Sochi and in some towns of Abkhazia]. *Med Parazitol (Mosk)*. 2008;1(3):40-43.
 63. Akiner MM, Demirci B, Babuadze G, Robert V, Schaffner F. Spread of the invasive mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in the black sea region increases risk of chikungunya, dengue, and zika outbreaks in Europe. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(4):e0004664. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004664>
 64. Ganushkina LA, Patraman IV, Rezza G, Migliorini L, Litvinov SK, Sergiev VP. Detection of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes koreicus* in the area of sochi, Russia. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2016;16(1):58-60. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1761>
 65. Dickens BL, Sun H, Jit M, Cook AR, Carrasco LR. Determining environmental and anthropogenic factors which explain the global

- distribution of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *BMJ Glob Health*. 2018;3(4):e000801. <https://doi.org/10.1136/bmjgh-2018-000801>
66. Chotpitayasunondh T. Introduction on the global dengue epidemiological burden. *Int J Infect Dis*. 2012;16:E4. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2012.05.014>
 67. Chakraborty T, Van Rossum M. Slave trade and slavery in Asia-new perspectives. *J Soc Hist*. 2020;54(1):1-14. <https://doi.org/10.1093/jsh/shaa004>
 68. Cathey JT, Marr JS. Yellow fever, Asia and the East African slave trade. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*. 2014;108(5):252-257. <https://doi.org/10.1093/trstmh/tru043>
 69. Collins RO. The African slave trade to Asia and the Indian Ocean islands. *Afr Asian Stud*. 2006;5:22.
 70. Manson P. The relation of the Panama canal to the introduction of yellow fever into Asia. *Trans Epidemiol Soc Lond*. 1903;22:60-100.
 71. Kuno G. The absence of yellow fever in Asia: history, hypotheses, vector dispersal, possibility of YF in Asia, and other enigmas. *Viruses*. 2020;12(12):1349. <https://doi.org/10.3390/v12121349>
 72. Wilder-Smith A, Leong WY. Importation of yellow fever into China: assessing travel patterns. *J Trav Med*. 2017;24(4). <https://doi.org/10.1093/jtm/tax008>
 73. Wilder-Smith A, Lee V, Gubler DJ. Yellow fever: is Asia prepared for an epidemic? *Lancet Infect Dis*. 2019;19(3):241-242. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(19\)30050-7](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(19)30050-7)
 74. Dinger JE, Schöffner WAP, Snijders EP, Swellengrebel NH. Onderzoek over gele koorts in Nederland. *Ned Tijdschr Geneesk*. 1929;73:3.
 75. Miot EF, Aubry F, Dabo S, et al. A peridomestic *Aedes malayensis* population in Singapore can transmit yellow fever virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13(10):e0007783. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007783>
 76. Valiente Moro C, Tran FH, Raharimalala FN, Ravelonandro P, Mavingui P. Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiol*. 2013;13:70. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-70>
 77. Terenius O, Lindh JM, Eriksson-Gonzales K, et al. Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol Ecol*. 2012;80(3):556-565. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2012.01317.x>
 78. Chouaia B, Rossi P, Montagna M, et al. Molecular evidence for multiple infections as revealed by typing of *Asaia* bacterial symbionts of four mosquito species. *Appl Environ Microbiol*. 2010;76(22):7444-7450. <https://doi.org/10.1128/AEM.01747-10>
 79. Moll RM, Romoser WS, Modrzakowski MC, Moncayo AC, Lerdthusnee K. Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *J Med Entomol*. 2001;38(1):29-32. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-38.1.29>
 80. Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, 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. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001561>
 81. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G. Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog*. 2009;5(5):e1000423. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000423>
 82. Hillyer JF, Schmidt SL, Fuchs JF, Boyle JP, Christensen BM. Age-associated mortality in immune challenged mosquitoes (*Aedes aegypti*) correlates with a decrease in haemocyte numbers. *Cell Microbiol*. 2005;7(1):39-51. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2004.00430.x>
 83. Bolling BG, Olea-Papelka FJ, Eisen L, Moore CG, Blair CD. 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*. 2012;427(2):90-97. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2012.02.016>
 84. Romo H, Kenney JL, Blitvich BJ, Brault AC. Restriction of Zika virus infection and transmission in *Aedes aegypti* mediated by an insect-specific flavivirus. *Emerg Microb Infect*. 2018;7(1):1-13. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0180-4>
 85. Newman CM, Cerutti F, Anderson TK, et al. *Culex* flavivirus and West Nile virus mosquito coinfection and positive ecological association in Chicago, United States. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2011;11(8):1099-1105. <https://doi.org/10.1089/vbz.2010.0144>
 86. Crockett RK, Burkhalter K, Mead D, et al. *Culex* flavivirus and West Nile virus in *Culex quinquefasciatus* populations in the southeastern United States. *J Med Entomol*. 2012;49(1):165-174. <https://doi.org/10.1603/me11080>
 87. Kuwata R, Isawa H, Hoshino K, et al. Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) cells persistently infected with *Culex* flavivirus (Flaviviridae). *J Med Entomol*. 2015;52(2):222-229. <https://doi.org/10.1093/jme/tju059>
 88. Hall-Mendelin S, McLean BJ, Bielefeldt-Ohmann H, Hobson-Peters J, Hall RA, van den Hurk AF. The insect-specific Palm Creek virus modulates West Nile virus infection and transmission by Australian mosquitoes. *Parasites Vectors*. 2016;9(1):414. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1683-2>
 89. Pauvolid-Correa A, Solberg O, Couto-Lima D, et al. Nhumirim virus, a novel flavivirus isolated from mosquitoes from the Pantanal, Brazil. *Arch Virol*. 2015;160(1):21-27. <https://doi.org/10.1007/s00705-014-2219-8>
 90. de Almeida JP, Aguiar ER, Armache JN, Olmo RP, Marques JT. The virome of vector mosquitoes. *Curr Opin Virol*. 2021;49:7-12. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2021.04.002>
 91. Ruckert C, Weger-Lucarelli J, Garcia-Luna SM, et al. Impact of simultaneous exposure to arboviruses on infection and transmission by *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nat Commun*. 2017;8:15412. <https://doi.org/10.1038/ncomms15412>
 92. Barletta ABF, Silva TLAE, Talyuli OAC, et al. Prostaglandins regulate humoral immune responses in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14(10):e0008706. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008706>
 93. Barletta AB, Nascimento-Silva MC, Talyuli OA, et al. Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. *Parasites Vectors*. 2017;10(1):103. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2040-9>
 94. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(7):e1000098. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000098>
 95. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, et al. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*. 2009;139(7):1268-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
 96. Sinkins SP. *Wolbachia* and arbovirus inhibition in mosquitoes. *Future Microbiol*. 2013;8(10):1249-1256. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.95>
 97. 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):389-394. <https://doi.org/10.1603/me09268>
 98. Ramirez JL, Short SM, Bahia AC, et al. *Chromobacterium* Csp,P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004398. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004398>
 99. Mayoral JG, Etebari K, Hussain M, Khromykh AA, Asgari S. *Wolbachia* infection modifies the profile, shuttling and structure of

- microRNAs in a mosquito cell line. *PLoS One*. 2014;9(4):e96107. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0096107>
100. Osei-Amo S, Hussain M, O'Neill SL, Asgari S. Wolbachia-induced aae-miR-12 miRNA negatively regulates the expression of MCT1 and MCM6 genes in Wolbachia-infected mosquito cell line. *PLoS One*. 2012;7(11):e50049. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050049>
 101. van den Hurk AF, Hall-Mendelin S, Pyke AT, et al. Impact of Wolbachia on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(11):e1892. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001892>
 102. Rocha MN, Duarte MM, Mansur SB, et al. Pluripotency of Wolbachia against Arboviruses: the case of yellow fever. *Gates Open Res*. 2019;3:161. <https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12903.2>
 103. Cansado-Utrilla C, Zhao SY, McCall PJ, Coon KL, Hughes GL. The microbiome and mosquito vectorial capacity: rich potential for discovery and translation. *Microbiome*. 2021;9(1):111. <https://doi.org/10.1186/s40168-021-01073-2>
 104. Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G. Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe*. 2011;10(4):307-310. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.09.006>
 105. Brent SE, Watts A, Cetron M, et al. International travel between global urban centres vulnerable to yellow fever transmission. *Bull World Health Organ*. 2018;96(5):343-354B. <https://doi.org/10.2471/BLT.17.205658>
 106. Lai S, Huang Z, Zhou H, et al. The changing epidemiology of dengue in China, 1990-2014: a descriptive analysis of 25 years of nationwide surveillance data. *BMC Med*. 2015;13:100. <https://doi.org/10.1186/s12916-015-0336-1>
 107. Daniels BC, Gaythorpe K, Imai N, Dorigatti I. Yellow fever in Asia-a risk analysis. *J Trav Med*. 2021;taab015. <https://doi.org/10.1093/jtm/taab015>
 108. Liu B, Gao X, Ma J, et al. Modeling the present and future distribution of arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* under climate change scenarios in Mainland China. *Sci Total Environ*. 2019;664:203-214. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.01.301>
 109. Stokes A, Bauer JH, Hudson NP. Transmission of yellow fever to Macacus rhesus: preliminary note. *J Am Med Assoc*. 1928;90(4):253-254.
 110. Davis NC. The transmission of yellow fever: experiments with the "woolly monkey" (*Lagothrix lago-tricha* Humboldt), the "spider monkey" (*Ateles ater* F. Cuvier), and the "squirrel monkey" (*Saimiri sciurus linnaeus*). *J Exp Med*. 1930;51(5):703-720. <https://doi.org/10.1084/jem.51.5.703>
 111. Yen PS, Failloux AB. A review: wolbachia-based population replacement for mosquito control shares common points with genetically modified control approaches. *Pathogens*. 2020;9(5):404. <https://doi.org/10.3390/pathogens9050404>

How to cite this article: Gabiane G, Yen P-S, Failloux A-B. *Aedes* mosquitoes in the emerging threat of urban yellow fever transmission. *Rev Med Virol*. 2022:e2333. <https://doi.org/10.1002/rmv.2333>

Article 3

Houé V, Gabiane G, Dauga C, Suez M, Madec Y, Mousson L, Marconcini M, Yen PS, de Lamballerie X, Bonizzoni M, Failloux AB. Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Emerg Microbes Infect.* 2019;8(1):1265-1279. doi: 10.1080/22221751.2019.1657785. PMID: 31469046; PMCID: PMC6735342.

Evolution and biological significance of flaviviral elements in the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*

Vincent Houé^{a,b}, Gaëlle Gabiane^a, Catherine Dauga^c, Marie Suez^d, Yoann Madec^e, Laurence Mousson^a, Michele Marconcini^f, Pei-Shi Yen^a, Xavier de Lamballerie^{g,h}, Mariangela Bonizzoni^f and Anna-Bella Failloux^g

^aDepartment of Virology, Arboviruses and Insect Vectors, Institut Pasteur, Paris, France; ^bSorbonne Université, Collège Doctoral, Paris, France; ^cInstitut Pasteur, Center for Bioinformatics, BioStatistics and Integrative Biology (C3BI), Paris, France; ^dInstitut de Biologie Paris-Seine, Paris, France; ^eDepartment of Infection and Epidemiology, Institut Pasteur, Epidemiology of Emerging Diseases, Paris, France; ^fDepartment of Biology and Biotechnology, University of Pavia, Pavia, Italy; ^gAix Marseille Université, IRD French Institute of Research for Development, EHESP French School of Public Health, EPV UMR_D 190 'Emergence des Pathologies Virales', Marseille, France; ^hIHU Méditerranée Infection, APHM Public Hospitals of Marseille, Marseille, France

ABSTRACT

Since its genome details are publically available, the mosquito *Aedes albopictus* has become the central stage of attention for deciphering multiple biological and evolutionary aspects at the root of its success as an invasive species. Its genome of 1,967 Mb harbours an unusual high number of non-retroviral integrated RNA virus sequences (NIRVS). NIRVS are enriched in piRNA clusters and produce piRNAs, suggesting an antiviral effect. Here, we investigated the evolutionary history of NIRVS in geographically distant *Ae. albopictus* populations by comparing genetic variation as derived by neutral microsatellite loci and seven selected NIRVS. We found that the evolution of NIRVS was far to be neutral with variations both in their distribution and sequence polymorphism among *Ae. albopictus* populations. The Flaviviral elements AlbFlavi2 and AlbFlavi36 were more deeply investigated in their association with dissemination rates of dengue virus (DENV) and chikungunya virus (CHIKV) in *Ae. albopictus* at both population and individual levels. Our results show a complex association between NIRVS and DENV/CHIKV opening a new avenue for investigating the functional role of NIRVS as antiviral elements shaping vector competence of mosquitoes to arboviruses.

ARTICLE HISTORY Received 10 July 2019; Accepted 12 August 2019


KEYWORDS *Aedes albopictus*; arboviral diseases; genetic structure; vector competence; NIRVS

Introduction

In less than four decades, the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse, 1894) has become a public health concern owing to its ability to transmit several human pathogenic viruses such as Chikungunya virus (CHIKV), Dengue viruses (DENV) and Zika virus (ZIKV) [1]. This vector is responsible of several recent arboviral outbreaks (reviewed by [2]) and astonished by the speed at which it has conquered all continents except Antarctica [3,4], thus becoming one of the world's 100-most invasive species according to the Global Invasive Species Database. Originally native to tropical forests of South-East Asia, *Ae. albopictus* was confined for centuries to few regions in Asia. Starting in the eighteenth or nineteenth centuries, *Ae. albopictus* was introduced in the islands of the Indian Ocean by Asian immigrants. From the late 1970s, this species took advantage of the increase in global trade to invade most tropical and sub-tropical regions of the world [5]. Additionally, the capacity of its eggs to undergo

photoperiodic diapause in winter, favoured *Ae. albopictus* colonization into temperate regions [6]. *Aedes albopictus* was first reported in Europe in 1979 [7], in North America in 1985 [8], in South America in 1986 [9] and in Africa in 1990 [10].

Migratory routes used by *Ae. albopictus* to expand from its Asian cradle can be defined using population genetic approaches [11–13]. Mosquito populations form groups of interbreeding individuals, which coexist in space and time. These genetic units are interconnected through gene flow. The current worldwide distribution of *Ae. albopictus* is a direct consequence of increasing human activities with rapid irradiation of populations [14–18]. Populations established locally presented a high genetic variability evidencing a mixture of individuals of distinct origins with disparate susceptibilities to arboviruses, which are reflected by different vector competences [17]. Vector competence refers to the ability of a mosquito population to become infected after an infectious blood meal, to support viral

CONTACT Anna-Bella Failloux  anna-bella.failloux@pasteur.fr  Department of Virology, Arboviruses and Insect Vectors, Paris F-75015, France
Supplemental data for this article can be accessed at <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1657785>

© 2019 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group, on behalf of Shanghai Shangyixun Cultural Communication Co., Ltd
This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

replication, dissemination and transmission to a new host in a subsequent blood-meal [19]. The level of vector competence depends on the tripartite interactions among the mosquito genotype, the virus genotype and environmental factors under GxGxE interactions [20].

In the early 2000s, non-retroviral integrated RNA virus sequences (NIRVS) were discovered in different metazoans, including mosquitoes [21,22]. *Aedes* mosquitoes can host NIRVS originated from different viruses related to arboviruses: mainly insect-specific viruses (ISVs) including insect-specific flaviviruses (ISFs) and other viruses belonging to the *Mononegavirales* order (such as rhabdoviruses) [22–25]. Additionally, most NIRVS correspond to fragmented viral open-reading frames, are flanked by transposable elements (TEs), enriched in PIWI-interacting RNA (piRNA) clusters and produce piRNAs [29]. piRNA clusters are genomic regions composed of fragmented sequences of TEs which are expressed as long primary single-stranded RNAs and processed into fragments of 24–30 nucleotides called piRNAs. In the model organism *Drosophila melanogaster*, piRNAs are primarily produced in germline cells and target TE transcripts based on sequence complementarity to protect from heritable lesions [26–29]. The landscape of TE fragments within piRNA clusters defines the regulatory properties of *D. melanogaster* strains to TE invasion [30]. The analogy between TE fragments and viral sequences in piRNA supports the hypothesis that viral sequences may contribute to mosquito susceptibility to subsequent viral infections. If viral integrations contribute in controlling virus replication, with consequences on vector competence, positive selection should be expected [31]. On the contrary, if NIRVS stand for fossil records, these sequences should reach fixation and evolve at a neutral rate [32,33].

In this study, we selected 19 *Ae. albopictus* populations that cover the geographical distribution of the species, where CHIKV and DENV were circulating, to study the evolutionary dynamics of seven selected NIRVS [24]. The occurrence of NIRVS in populations was compared to processes driving population genetic differentiation observed on neutral loci (i.e. microsatellites). We showed that (i) based on microsatellite marker polymorphism, populations of *Ae. albopictus* are distributed into two different genetic clusters, one of them divided into four subclusters, without any correlation between genetic and geographical distances, (ii) the distribution of NIRVS in geographic populations and their polymorphism are not related to genetic divergences within and between populations as depicted by microsatellite markers, suggesting that NIRVS are not evolving neutrally, and (iii) all NIRVS studied, except AlbFlavi1 may have influence on vector competence to DENV and CHIKV, at the population level.

Materials and methods

Ethic statements

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

Mosquitoes

To assess genetic variation within and among *Ae. albopictus* populations, 19 samples from different geographic locations were studied (Table 1). These populations ranging from 10 to 30 mosquitoes were selected in the native range of *Ae. albopictus* where arboviral outbreaks and epidemics occurred [17,34,35]. Only the 13 populations of 19–20 mosquitoes and the Foshan colony used as control were selected to characterize NIRVS polymorphism [36].

Mosquitoes were collected in the field as immature stages (larvae, pupae, eggs). Frozen mosquitoes (<13th generation) were used for population genetic and NIRVS analyses. For the pilot experiments for DENV and CHIKV infections, F1 mosquitoes from Tibati population (Cameroon) and F18 mosquitoes from Foshan laboratory strain were used. Larvae obtained after immersion in dechlorinated tap water of field-collected eggs were distributed in pans of 200 individuals. Immature stages were fed every two days with a yeast tablet dissolved in 1 L of dechlorinated tap water and incubated at $26 \pm 1^\circ\text{C}$. Emerging adults were placed in cages and maintained at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ with a light/dark cycle of 12/12 h at 80% relative humidity and supplied with a 10% sucrose solution. Females were exposed three times a week to anesthetized mice (OF1 mice; Charles River Laboratories, MA, USA) as a source of blood for producing eggs.

Microsatellite genotyping

Genomic DNA was extracted from individual mosquito using the Nucleospin Tissue kit (Macherey-Nagel, Hoerdt, France) according to manufacturer's instructions. Briefly, mosquitoes were individually homogenized in 180 μL lysis buffer supplemented with 25 μL of Proteinase K. To bind total nucleic acids, homogenates were passed through columns. Silica membranes were further desalted and DNA was collected in 100 μL of elution buffer. Quality and quantity of DNA were then assessed using the

Table 1. Details on *Aedes albopictus* populations analyzed.

	Population name	Continent	Country	City	Generation	Year of collection	Mosquitoes females	Males
1	Alessandria	Europe	Italy	Alessandria	F2	2012	10	10
2	Ulcinj	Europe	Montenegro	Ulcinj	F1	2013	10	10
3	Cagnes-sur-mer	Europe	France	Cagnes-sur-mer	F13	2000	10	0
4	Montsecret	Europe	France	Montsecret	F4	2002	0	10
5	Bar-sur-Loup	Europe	France	Bar-sur-Loup	F1	2011	10	0
6	Tirana	Europe	Albania	Tirana	F6	2016	15	15
7	Franceville	Africa	Gabon	Franceville	F2	2015	10	10
8	Mfilou	Africa	Congo	Mfilou (Brazzaville)	F3	2012	10	10
9	Bertoua	Africa	Cameroon	Bertoua	F5	2008	10	4
10	Saint-Denis	Africa	La Réunion	Saint-Denis	F2	1998/2006	10	10
11	Rabat	Africa	Morocco	Rabat	F1	2017	15	15
12	Vero Beach	America	USA	VeroBeach	F5	2016	10	10
13	Rio	America	Brazil	Rio de Janeiro	F1	2001	10	9
14	Jurujuba	America	Brazil	Jurujuba	F1	2014	10	0
15	Manaus	America	Brazil	Manaus	F1	2015	15	15
16	PMNI	America	Brazil	PMNI (Nova Iguaçu)	F1	2015	15	15
17	Binh Duong	Asia	Vietnam	Binh Duong (Ben Cat) Phu Hoa	F9	2014	10	10
18	Sarba	Asia	Lebanon	Sarba	F0	2011	10	10
19	Foshan	Asia	China	Foshan	Lab colony	-	10	10
20	Oahu	America	Hawaii	Oahu	Lab colony	1999	10	10

Note: Except the colony Foshan, all 19 populations were genetically characterized using 10 microsatellite markers, and 13 populations (in bold) were selected for studying NIRVS diversity.

Nanodrop 2000 Spectrophotometer (*Thermo Scientific*TM, MA, USA) and a PCR was performed using *histone h3* reference gene (NCBI: XM_019696438.1) as control. Eleven microsatellite loci were amplified using PCR specific primers flanking the repeated region [16]. PCR reaction mixtures in a final volume of 15 μ L contained 50 ng genomic DNA, 1X PCR buffer, 1.5 mM MgCl₂, 0.27 mM dNTPs (InvitrogenTM, CA, USA), 1U Taq polymerase (InvitrogenTM), and 10 μ M of each primer (one was 5' labelled with a fluorescent dye). PCR cycling conditions consisted in a step at 94°C for 5 min, followed by 29 cycles at 94°C for 30 s, 58°C for 30 s, and 72°C for 30 s with a final step at 72°C for 10 min. Aliquots of PCR products were visualized in 2% agarose gels stained with ethidium bromide under UV light. Each PCR product was then diluted 1:10 in ddH₂O water and 2 μ L of this dilution was added to 10 μ L of a mixture of deionized formamide and GeneScan-500 ROX size standard (Applied Biosystems, CA, USA). Genotyping was processed in an ABI3730XL sequence analyser (Applied Biosystems) and data analyzed using GeneScan and GeneMapper softwares.

Genetic diversity of populations

For statistical analyses, mosquitoes collected from each sampling site were assumed to represent local populations.

Amounts of heterozygosity at various levels of population structure were explored by using F_{IS} and F_{ST} values. The F_{IS} inbreeding coefficient indicates the level of heterozygosity within each population. The F_{ST} fixation index measures the reduction in heterozygosity due to random genetic drift between populations. The Wright's F -statistics were computed in Genetix v.4.05.2. software [37] and tested using 10⁴ iterations

according to Weir and Cockerham (1984). The number of alleles (N_A), allelic richness (A_R), expected (H_E), observed (H_O) heterozygosity, F_{IS} by locus and F_{ST} by populations were obtained. The significance of F_{IS} and F_{ST} were analyzed using FSTAT v.2.9.3.2 [38].

Departures from Hardy-Weinberg equilibrium, linkage disequilibrium between loci and molecular variance (AMOVA) over all populations were analyzed with Arlequin v3.5.2.2 to estimate intra- and inter-population variation [39]. The mean frequency of null alleles (a mutation in microsatellite flanking regions leading to an absence of amplification products) per population was also very low (i.e. 0.06) and ranged from 0.000 to 0.118, meaning that the selected microsatellite loci were successfully amplified and appropriate for population genetic analysis. Relationships between geographical and genetic F_{ST} distances were tested between populations using Mantel test implemented in GenAlEx v 6.5 [40].

Graphic representation of relatedness among populations

Genetic relationships between populations were estimated by using PHYLIP 3.69, as previously described [41]. Cavalli-Sforza & Edwards's (CSE) chord distance for each pair of populations was calculated (GENDIST module). The resulting distance matrix was used to create a phylogram based on Neighbour-Joining (NEIGHBOUR module). Node confidence was inferred via 100 bootstrap replicates (modules SEQ-BOOT, GENDIST, NEIGHBOUR and CONSENSE).

Test of isolation by distance

To test the hypothesis whether the geographical pattern of genetic differentiation is caused by isolation

by distance (IBD), we ran Mantel tests for pairwise matrices between geographical distances (kilometres) and genetic differentiation (measured as $F_{ST}/(1-F_{ST})$).

Genetic structure of populations

Genetic population structure was assessed with individual-based Bayesian clustering method implemented in the program STRUCTURE v.2.3.4 [42]. The likelihood of each possible number of genetic populations (K), ranging from 1 to 20, was calculated after 10 independent runs for each value of K, using a burn-in of 500,000 replications, 500,000 Markov Chain Monte Carlo steps, assuming an admixture model, with frequencies correlated between populations and without the use of sampling location as a prior. The most likely number of populations (K) was estimated by the ΔK method described by Evanno et al. [43] with Structure Harvester software (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>). The results were then graphically displayed with DISTRUCT 1.1 [44].

NIRVS in natural populations

Six NIRVS (AlbFlavi1, AlbFlavi2, AlbFlavi4, AlbFlavi10, AlbFlavi36, AlbFlavi41), plus CSA [21], were studied. They were chosen based on their unique occurrence in different regions of the Foshan genome, except for AlbFlavi41, known to be duplicated. Because of its length [21], CSA was characterized using two sets of primers (CSA-NS3 and CSA-JJL), and considered in analysis as two separated datasets (Supplementary Table 1). NIRVS were searched on the same mosquitoes as those used for microsatellite genotyping.

PCR primers flanking each NIRVS (Supplementary Table 1) were designed using PRIMER3 [45]. PCR reactions were performed in a final volume of 25 μ L using 5 ng of DNA, PCR buffer 1X, 2.9 mM $MgCl_2$, 0.25 mM dNTP mix, 0.25 μ M of each primer and 1.25 unit of *Taq* DNA polymerase (InvitrogenTM). Amplifications were done using *T100TM Thermal Cycler* (Bio-Rad) according to the following cycle conditions: 95°C for 5 min, 35 cycles at 95°C for 15 s, 59–64°C for 90 s, 72°C for 90 s, and a final elongation step at 72°C for 10 min. PCR products were electrophoresed on 1.5% of agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under UV light. All negative samples were confirmed with a second-round PCR.

The number of each NIRVS per population (frequency) was represented using Graph Pad Prism version 6 (Graph Pad Software, CA, USA).

NIRVS between populations

NIRVS composition of each population was expressed in terms of relative abundance corresponding to the percentage of each NIRVS relative to the total number

of tested mosquitoes. To assess variations of NIRVS abundance between populations, we calculated Bray Curtis dissimilarities, a metrics, widely used, including data standardization [46]. A dendrogram was generated by using this dissimilarity matrix and neighbour-joining method, to visualize NIRVS compositional differences across populations [46].

Mantel tests between NIRVS and microsatellites

Mantel tests implemented in GenAlEx v 6.5 [40], were used to evaluate the statistical significance of the correlation between two or more distance matrices, using permutation tests. The significance of associations between matrixes of ϕ' st distance among populations as derived by microsatellite markers or NIRVS distribution was tested using the Mantel test with 999 permutations.

NIRVS association with vector competence of *Ae. albopictus* at the population level

Vector competence is assessed using several parameters [47]. The dissemination efficiency (DE) refers to the proportion of mosquitoes able to disseminate the virus beyond the midgut barrier after ingestion of infectious blood meal and active viral replication in midgut epithelial cells. Published data on DEs to DENV and CHIKV were retrieved for mosquito populations with close or identical geographical proximity with the populations analyzed (Supplementary Table 2). DEs were described using median and inter-quartile range (IQR). Logistic linear regression models were used to test association between the presence of NIRVS and DEs at the *Ae. albopictus* population level. *P*-values <0.05 were considered significant.

Sequence polymorphism and evolutionary dynamics of AlbFlavi2 and AlbFlavi36

Sequence polymorphism of AlbFlavi2 and AlbFlavi36

Amplification products for AlbFlavi2 and AlbFlavi36 were purified by using NucleoSpin[®] Gel and PCR Clean-up kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's instructions and sequenced by Eurofins Genomics (Cochin hospital platform, Paris, France). If the quality of chromatogram profiles assessed with Geneious[®] 10.1.3 did not meet the standard required, amplicons were subsequently cloned into pCRTMII-TOPO[®] vector using TOPO[®] TA Cloning[®] Kit (Thermo Fisher Scientific) and transformed into One Shot[®] TOP10 Chemically Competent *E. coli* (InvitrogenTM). Sequences were aligned in Geneious[®] 10.1.3 using MUSCLE algorithm [48]. *p*-distance values, representing proportion of nucleotide sites at which two

sequences being compared are different, were calculated after alignments using MEGA 10.0.5.

Phylogeny based on AlbFlavi2 and AlbFlavi36

DNA sequences from AlbFlavi2 and AlbFlavi36 were aligned with MUSCLE algorithm [48]. Exogenous virus sequences were used as outgroup to determine the direction of character transformations. Phylogenetic trees were obtained by parsimony analysis implemented in the PAUP* software package (version 4.0), by using gap as 5th state or not (data not shown) and nearest neighbour interchange (NNI) for tree rearrangements [49].

Pilot experiment assessing the association between AlbFlavi2/Albflavi36 and vector competence of *Ae. albopictus* at the individual level

Logistic linear regression models were used to test association between the presence of AlbFlavi2 and AlbFlavi36 and viral dissemination in single mosquitoes from the Foshan colony and a field-collected African population (Tibati collected in Tibati, Cameroon in 2018). Foshan and Tibati mosquitoes were experimentally infected with DENV (DENV-2, Accession number: MK268692 [50]) and CHIKV (06.21, Accession number: AM258992 [51]) provided in blood meals as described in Amraoui et al. 2019 [52]. All surviving mosquitoes were examined individually at 14 days post-infection to define (i) the infectious status; presence of infectious particles in heads was estimated by focus fluorescent assay on C6/36 *Ae. albopictus* cells [52], and (ii) the presence of AlbFlavi2 and/or AlbFlavi36 by PCR on DNA extracted from bodies and thorax. Statistical analyses were conducted using the Stata software (StataCorp LP, Texas, and USA). *P*-values <0.05 were considered significant.

Results

Characterization of populations using microsatellite data

A total of 363 individuals (Table 1) were genotyped at 11 microsatellite markers. Ten of the 11 microsatellite loci, by showing a frequency upper to 0.95 for the most common allele, were considered polymorphic and as such, were included in the analysis. Only the A17 locus was monomorphic and then excluded from the analyses. No significant linkage disequilibrium between any pairs of loci was observed indicating that the 10 loci were statistically independent from each other. Each locus was tested for within-population deviations from HWE implementing Bonferroni correction for multiple testing: 20 deviations out of 190

Table 2. Genetic diversity at each microsatellite locus for all mosquito populations.

	N_A	N	Allelic richness	PIC	H_o	H_e	F_{IS}
A1	4	288		0.44	0.16	0.47	0.59
A2	10	360	2.43	0.55	0.63	0.62	-0.15
A3	18	341	3.14	0.74	0.62	0.78	0.08
A5	19	334	2.90	0.75	0.52	0.78	0.13
A6	11	330	2.59	0.68	0.54	0.68	-0.04
A9	9	326	2.73	0.65	0.59	0.70	0.01
A11	9	323	2.81	0.71	0.53	0.75	0.15
A14	9	351	1.71	0.41	0.17	0.40	0.38
A15	6	347	1.25	0.13	0.04	0.15	0.57
A16	14	279		0.83	0.66	0.84	0.04
Mean	10.9	327.9	2.44	0.59	0.45	0.62	0.17

Notes: N_A , number of alleles; N , number of individuals examined at a locus; PIC, polymorphism information content; H_o , observed heterozygosity; H_e , expected heterozygosity; F_{IS} , the inbreeding coefficient. Values in bold are significant at the 0.1% after Bonferroni correction.

combinations were found but did not cluster at any population or locus.

The loci displayed a mean PIC of 0.59 suggesting that they were sufficiently informative for assessing the degree of variability and structuring of mosquito populations (Table 2). The number of alleles, averaged over all loci, ranged from 4 to 19, with a mean value of 10.9 per locus, and a mean allelic richness at 2.44 (Table 2). Eight of the 10 loci presented a significant difference between observed and expected heterozygosity, with a mean F_{IS} of 0.17 (*p*-value <0.001; Table 2), supporting an excess of homozygotes in *Ae. albopictus* populations.

Population diversity

The overall mean number of alleles per population was 3.7 varying between 2.0 and 5.0. Private alleles were rarely found, their mean frequency per population ranged from 0.00 to 0.079 (Table 3). Mean F_{IS} value per population was -0.09, with values ranging from -0.0285 to 0.338 (Table 3). Estimation of the molecular variance within and among populations (AMOVA) revealed that most of the variation (89.6%) was detected within individuals whereas only 10.4% occurred among populations.

Population genetic structure

The overall differentiation across all 19 populations was high ($F_{ST} = 0.239$) with F_{ST} being highly significant (*p*-value <0.001), suggesting a significant genetic structure. To identify genetic clusters among tested individuals, we implemented 25 independent simulations in the software Structure according to the method of Evanno; the uppermost level of structuring in the model was observed at $K = 2$ ($\Delta K = 2293.4$; Supplementary Figure 1(A)). The best assignment of individuals made by Structure led to two clusters: (i) cluster 1, which includes populations from Brazil (i.e. PMNI and Manaus), Northern Africa (i.e. Rabat) and a population from Albania, and (ii) cluster 2, which includes the remaining populations (Figure 1 and

Table 3. Analysis of genetic variability of different geographical populations of *Aedes albopictus*.

Populations	Country	Continent	N	n_a	n_a/N	n_p	n_p/N	A_p	H_o	H_E	A_n	F_{IS}
Vero Beach	USA	America	20	4.4	0.22	2	0.10	0.07	0.048	0.53	0.08	0.12***
Oahu	Hawaii		20	2.6	0.13	0	0.00	0.00	0.25	0.34	0.08	0.30***
Manaus	Brazil		30	3.4	0.11	3	0.10	0.07	0.32	0.47	0.12	0.34***
PMNI			30	3.6	0.12	1	0.03	0.03	0.39	0.51	0.11	0.25***
Rio			19	3.4	0.18	0	0.00	0.00	0.42	0.50	0.08	0.18***
Jurujuba			10	3.3	0.33	0	0.00	0.00	0.47	0.42	0.00	-0.06
Montsecrét	France	Europe	10	2.0	0.20	0	0.00	0.00	0.50	0.37	0.01	-0.29
Cagnes-sur-Mer			10	2.8	0.28	1	0.10	0.06	0.55	0.46	0.01	-0.14
Bar-sur-Loup			10	3.8	0.38	2	0.20	0.08	0.50	0.52	0.05	0.13*
Alessandria	Italy		20	4.1	0.21	2	0.10	0.05	0.43	0.50	0.06	0.18***
Ulcinj	Montenegro		20	3.1	0.16	0	0.00	0.00	0.40	0.39	0.03	0.02
Tirana	Albania		30	3.8	0.13	3	0.10	0.07	0.35	0.43	0.08	0.21***
Rabat	Morocco		30	3.2	0.11	0	0.00	0.00	0.42	0.47	0.06	0.11***
Bertoua	Cameroon		14	4.3	0.31	1	0.07	0.07	0.46	0.52	0.08	0.16***
Franceville	Gabon	Africa	20	4.8	0.24	1	0.05	0.03	0.44	0.56	0.08	0.25***
Mfilou	Congo		20	4.0	0.20	0	0.00	0.00	0.60	0.55	0.02	-0.06
Saint-Denis	La Réunion		20	5.1	0.26	6	0.30	0.05	0.52	0.55	0.07	0.08
Sarba	Lebanon	Asia	10	3.5	0.35	4	0.40	0.08	0.55	0.44	0.00	-0.18
Binh Duong	Vietnam		20	5.0	0.25	3	0.15	0.08	0.2	0.41	0.05	0.11**
Mean			19.1	3.7	0.022	1.5	0.09	0.04	0.45	0.47	0.06	-0.09

Notes: N, population size; n_a , mean number of alleles; n_a/N , mean number of alleles/individual; n_p , number of private alleles; n_p/N , mean number of private alleles/individual; A_p , mean frequency of private alleles; H_o , mean observed heterozygosity; H_E , mean expected heterozygosity; A_n , mean frequency of null alleles; F_{IS} , the inbreeding coefficient.

** p -value ≤ 0.01 ; *** p -value ≤ 0.001 .

Supplementary Figure 1(B)). Although Structure identified only two clusters, their genetic differentiation was significantly high ($F_{ST} = 0.12$, p -value ≤ 0.001). Additionally, these two genetic clusters were found to deviate significantly (p -value ≤ 0.01) from Hardy-Weinberg proportions, with F_{IS} values of 0.23 and 0.36, respectively after implementing 10^4 permutations on allele frequencies in the software GENETIX. This result suggested a Wahlund effect which indicated a genetic substructure. As a consequence, we re-analyzed the two clusters separately and detected substructures in Cluster 2 (Figure 1 and Supplementary Figure 1 (C)). Sub-structuring of Cluster 2 emphasized differentiation among populations from South America (Jurujuba and Rio), Europe (i.e. all French and Italian populations), Africa (Bertoua and Mfilou) and Asia. On the contrary, populations from Florida (Vero Beach), Middle East (Sarba), La Reunion Island (Saint Denis) and Gabon (Franceville) appeared genetically mixed suggesting that these sites may represent cross-roads in *Ae. albopictus* colonization out of Asia (Figure 1).

Spatial and genetic data

When considering the genetic differentiation according to geographical distances using Mantel test, only 21% of the genetic variability was explained by the geographical distance (p -value = 0.03).

NIRVS analysis

We further chose to study NIRVS distribution in 13 *Ae. albopictus* populations selected previously for assessing genetic diversity based on epidemiological data of arboviral outbreaks and *Ae. albopictus* widespread

out if its native range [17,34,35]; we analyzed 10 females and 10 males per population (Table 1). NIRVS distribution was not homogenous across populations (Figure 2, Supplementary Figure 2). AlbFlavi1 (Figure 2(A)) and CSA-JJL (Figure 2(H)) were the most widespread NIRVS, being detected in 85–100% of tested mosquitoes, respectively. On the opposite, AlbFlavi10 was the rarest NIRVS, being found in 17% of the tested mosquitoes. Despite displaying the highest presence of AlbFlavi2 and AlbFlavi4 (present in most populations), Brazilian populations showed the lowest number of NIRVS, with the absence of AlbFlavi36 and AlbFlavi10 and the lower frequency of AlbFlavi41 compared to the other *Ae. albopictus* populations (Figure 2).

Interestingly, when targeting the CSA locus, no amplification was obtained for Brazilian mosquitoes using the NS3-CSA primer set (Supplementary Table 1; Figure 2(G)), which was not consistent with the results obtained with the JJL-CSA primer set that amplified the same NIRVS but targeting a different region (Figure 2(H)). This suggests then that recombination events occurred at this genomic position for Manaus, Rio and PMNI mosquitoes.

Comparison between microsatellite data and NIRVS abundance profiles

To define whether NIRVS evolve under selective pressures or randomly, we compared (i) the relatedness between populations based on microsatellite polymorphism (Figure 3(A)) with (ii) the similarity between populations based on NIRVS abundance profiles (Figure 3(B)). At the population level, the Neighbour-Joining clustering analyses applied to genetic frequencies (Figures 1 and 3(A), Supplementary

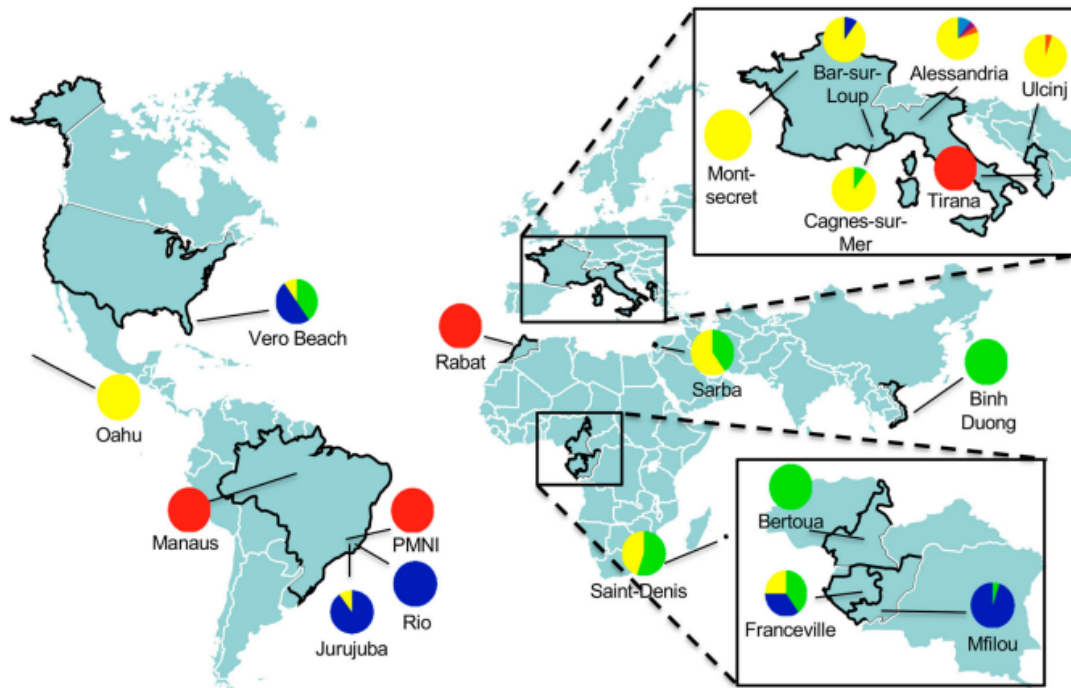


Figure 1. Estimated population structure of 363 individuals (19 populations) using 10 microsatellite markers. Map with sampling sites of populations with colour pie charts showing genotype frequencies, according to Cluster 1 (red) and Cluster 2, which the latest subdivided into 4 subclusters (blue, green, yellow and orange), deduced from the ΔK curve obtained (Supplementary Figure 1(A–C)).

Figure 1(B)) mainly revealed two clusters of populations: one with Tirana, Rabat, Manaus and PMNI populations, and the second with the remaining populations (i.e. Binh Duong, Oahu, Vero Beach, Rio, Franceville, Alessandria, Ulcinj and Mfilou). Regarding NIRVS contents, two major clusters distantly related from each other were also obtained (Figure 3 (B)), one including only Brazilian populations (i.e. Manaus, PMNI and Rio) sharing a low abundance of NIRVS, and the other including geographically distant populations. Therefore, populations from Vero Beach and Rio shared closely related genetic relationships and harboured clearly different abundance profiles of NIRVS (Figure 3(A,B)). Conversely, genetic distinct populations from Vero Beach, Rabat and Alessandria shared the same contents of NIRVS. In short, closely related populations can have different NIRVS contents and geographic and/or genetic distant populations can contain similar NIRVS abundance profiles. Thus, we observed significantly different relatedness between populations according to the marker used, that may indicate that random genetic drift was not the main force shaping these NIRVS distribution. In addition, no correlation was identified between the two matrices ($R^2 = 0.0006$), showing that NIRVS composition of populations was not related to the genetic structure caused by random genetic drift (Supplementary Figure 2).

Relationships between NIRVS landscape and vector competence (from published data)

Our results showed that NIRVS were not neutrally distributed across populations supporting the hypothesis of a biological function of NIRVS, such as antiviral functions, as it has been previously suggested. To analyze whether NIRVS contribute to the control of arboviral replication, we used logistic regression models to evaluate potential association between NIRVS distribution frequencies among populations and dissemination efficiencies (DEs) of DENV and CHIKV in corresponding or geographically close populations selected from the literature (Supplementary Table 2). On this basis, we classified our tested populations depending on their frequencies of each NIRVS using the median. Several associations between NIRVS and DENV DEs were found. Whereas high AlbFlavi2 and CSA-JJL frequencies were significantly associated with high DEs, high AlbFlavi10, AlbFlavi36, AlbFlavi41 and CSA-NS3 frequencies were however correlated to low DENV DEs (Table 4). Opposite associations to CHIKV DEs were also observed but with fewer NIRVS. Indeed, high frequencies of AlbFlavi4 were associated with high CHIKV DEs while high distribution of AlbFlavi36 and CSA-NS3 among populations was correlated to low CHIKV DEs. Together, these results indicated

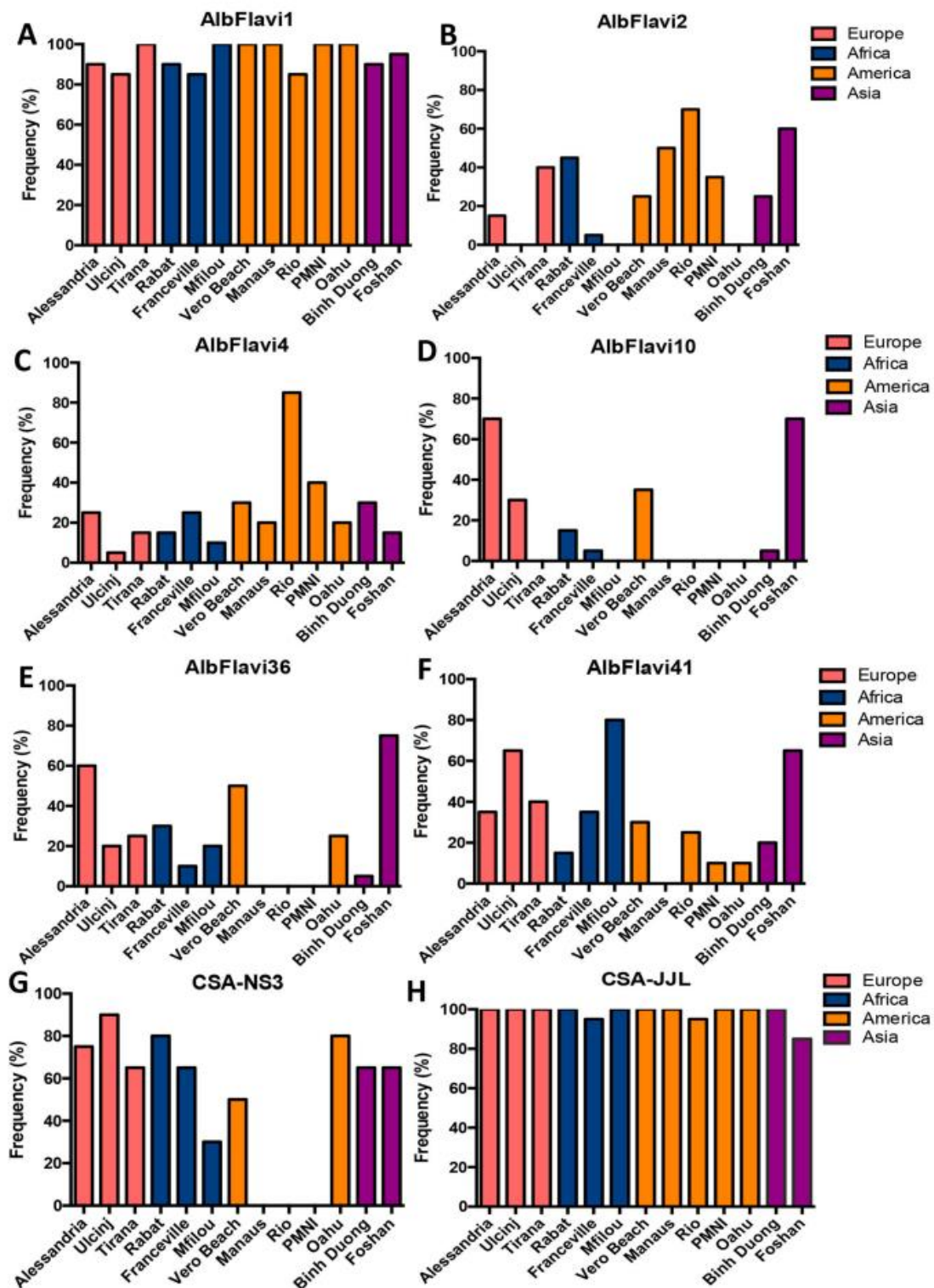


Figure 2. NIRS variability among *Aedes albopictus* populations. The frequency of AlbFlavi1 (A), AlbFlavi2 (B), AlbFlavi4 (C), AlbFlavi10 (D), AlbFlavi36 (E), AlbFlavi41 (F) and CSA (G and H) was assessed for 20 individuals in each *Ae. albopictus* population (except the Rio population with 19 individuals). Populations were clustered according to their continent of origin. Oahu and Foshan correspond to laboratory colonies. The variability of CSA was assessed using two sets of primers: CSA-NS3 (G) and CSA-JJL (H).

that the presence of NIRS was associated with changes in DEs of arboviruses in *Ae. albopictus* at the population level.

Focus on AlbFlavi2 and AlbFlavi36

Besides its association to high DENV DEs, we further focused on AlbFlavi2 located in a piRNA cluster and

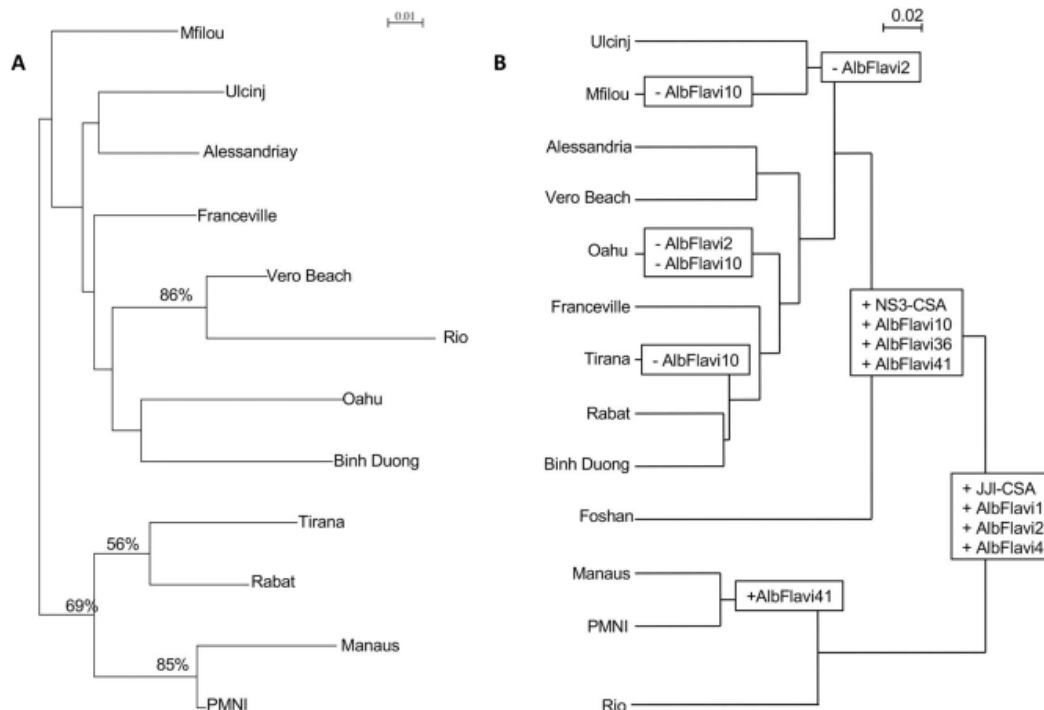


Figure 3. *Aedes albopictus* population clustering based on microsatellite and NIRVS loci. (A) Dendrogram of *Ae. albopictus* populations based on the analysis of 8 microsatellite loci of 12 *Aedes albopictus* populations using Cavalli-Sforza & Edwards's genetic distance and Neighbour-Joining method. Bootstrap values were indicated when >50%. (B) Dendrogram of *Ae. albopictus* populations based on Bray-Curtis distance representing dissimilarities between NIRVS composition and abundances.

Table 4. Association between NIRVS and arboviral dissemination efficiencies in *Aedes albopictus* populations (logistic regression models).

NIRVS	N	OR (95% CI)	p-value
<i>DENV</i>			
AlbFlavi1	707	0.82 (0.61–1.11)	NS
AlbFlavi2		3.07 (2.3–4.2)	***
AlbFlavi4		1.46 (1.0–2.1)	NS
AlbFlavi10		0.46 (0.3–0.6)	***
AlbFlavi36		0.46 (0.3–0.6)	***
AlbFlavi41		0.43 (0.29–0.62)	***
CSA-NS3		0.68 (0.5–0.9)	**
CSA-JJI		3.87 (1.0–14)	*
<i>CHIKV</i>			
AlbFlavi1	360	1.53 (0.9–2.6)	NS
AlbFlavi2		1.3 (0.7–2.1)	NS
AlbFlavi4		2.14 (1.2–3.6)	**
AlbFlavi10		0.60 (0.3–1.0)	NS
AlbFlavi36		0.36 (0.2–0.6)	***
AlbFlavi41		0.61 (0.4–1.0)	NS
CSA-NS3		0.56 (0.3–1.0)	*
CSA-JJI		0.68 (0.3–1.7)	NS

Notes: Dissemination efficiencies (DE) data were assessed from the same or geographically close *Ae. albopictus* populations (see Supplementary Table 2). Populations were characterized as high or low frequencies for each NIRVS by using the median and were analyzed with DE data by logistic regression models to find any association. Odds ratio (OR) >1 and <1 indicated positive and negative association respectively. 95% CI: 95% confidence intervals; N: sample size.

presenting a large geographical distribution encompassing all continents. Moreover, AlbFlavi36 located in an intergenic region was not found in populations from South America and presented an opposite pattern of association to DENV DEs; it was used for

comparison to AlbFlavi2. Therefore, sequence polymorphism, evolution and potential association to vector competence to arboviruses were assessed in *Ae. albopictus* at the individual level.

Sequence polymorphism and evolution of AlbFlavi2 and AlbFlavi36

AlbFlavi2 and AlbFlavi36 of individual mosquitoes were successfully amplified in 10 out of the 13 *Ae. albopictus* populations studied (Figure 2). Sequences of AlbFlavi2 and AlbFlavi36 amplified fragments were aligned with the closely related exogenous viral sequences: the Kamiti River virus (KRV) for AlbFlavi2 and the Aedes Flavivirus (AeFV) for AlbFlavi36.

The p-distance calculated between AlbFlavi2 sequences revealed a moderate diversity, with values ranging from 0% to 3.9% (data not shown). All AlbFlavi2 sequences underwent deletion events that were sometimes shared by several individuals from different populations or observed in a specific *Ae. albopictus* population (Figure 4; Supplementary AlbFlavi36).

The p-distance values calculated between AlbFlavi36 sequences were low and varied only from 0% to 0.9% (data not shown). Therefore, AlbFlavi36 sequences mapping to an intergenic region [24] appeared more similar between individuals than AlbFlavi2 sequences (which are integrated in piRNA cluster 27 [53]).

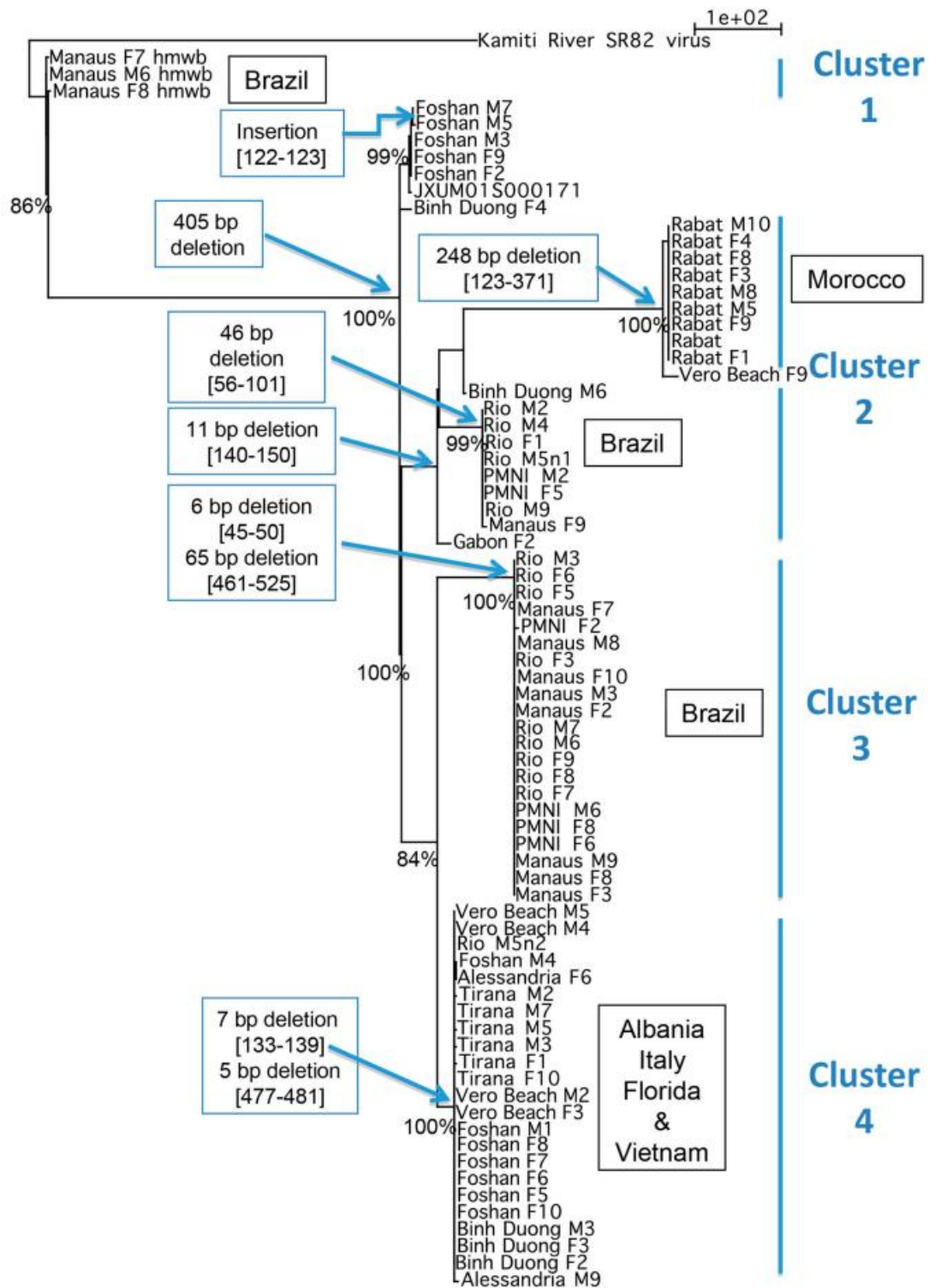


Figure 4. Divergence of AlbFlavi2 among *Aedes albopictus* individuals. Phylogram of AlbFlavi2 sequences based on parsimony with gaps considered as 5th nucleotides. Each node was found in 98–100% of the trees obtained through NNI rearrangements. Significant bootstrap values were indicated at nodes. hmwb: high molecular weight band Values; in brackets: alignment coordinates of deletion. The same result was obtained by parsimony without gap as 5th nucleotide, except for the sequence cluster of mosquitoes from Morocco.

We further performed phylogenetic analysis to describe the evolutionary history of AlbFlavi2 and AlbFlavi36 (Figure 4; Supplementary Figure 4). As

expected, AlbFlavi2 displayed higher divergence than AlbFlavi36. The resulted trees based on AlbFlavi2 supported four major clusters sharing sequences with the

same deletion events (Figure 4). One of them, defined by a 11 bp deletion was subdivided into two subclusters of sequences sharing respectively a 248 bp and a 46 bp deletion. Overall, these clusters did not show any strict relationship with geographical origin of populations.

AlbFlavi2 from Brazilian populations (PMNI, Manaus and Rio) appeared clearly polyphyletic. Three clusters represented only sequences from Brazil: an older cluster of sequences sharing a 405 bp insertion and two other clusters of sequences sharing respectively a 46 bp and a 6–65 bp deletions. Only AlbFlavi2 from Rabat population formed a monophyletic group, a unique cluster of sequences characterized by a 248 bp deletion.

One cluster contained most of the sequences from Tirana (Albania), Vero Beach (USA), Alessandria (Italy) and Binh Duong (Vietnam). However, some sequences from Binh Duong, Vero Beach and

Alessandria populations, were also isolated or found in other clusters. Moreover, half of the AlbFlavi2 sequences from Foshan formed a unique cluster whereas the other half shared the heterogeneous cluster of sequences described above.

The polymorphism of AlbFlavi36 was low in *Ae. albopictus* populations and all the sequences showed close relationships with each other, without any significant bootstrap values (Supplementary Figure 4). However, sequences from African mosquitoes (Congo, Gabon and Morocco) in branching deeply in the tree may be more ancient than sequences of Asian (Binh Duong, Foshan) and European mosquitoes.

Collectively, phylogenetic studies revealed different histories of NIRVS in mosquito populations and particularly, complex history of Albflavi2 evolving by both mutation and deletion events.

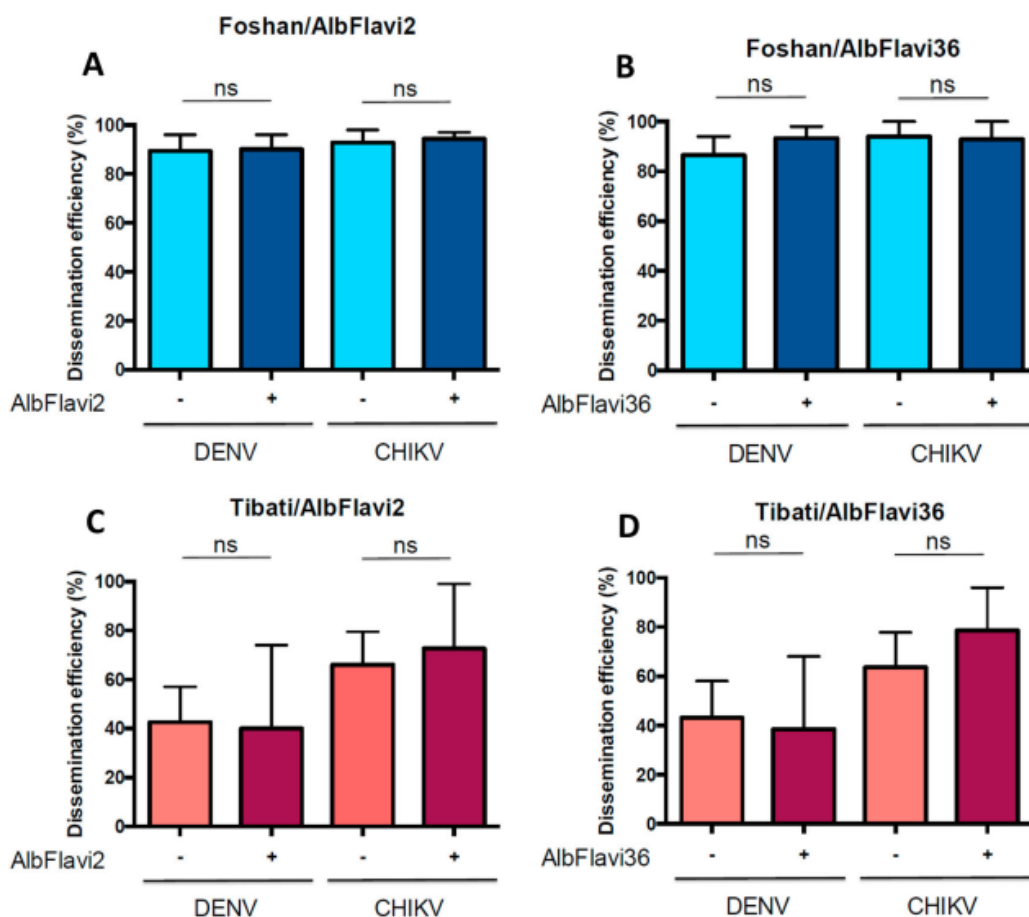


Figure 5. Pilot analysis showing the association between frequencies of AlbFlavi2/AlbFlavi36 and DENV/CHIKV dissemination efficiencies (DE) in *Aedes albopictus* populations. The Foshan colony and the Tibati population (Cameroon, generation F1) were used for the analysis. (A) Presence/absence of AlbFlavi2 and DEs to DENV and CHIKV obtained for the Foshan colony. (B) Presence/absence of AlbFlavi36 and DEs to DENV and CHIKV obtained for the Foshan colony. (C) Presence/absence of AlbFlavi2 and DEs to DENV and CHIKV obtained for the Tibati population. (D) Presence/absence of AlbFlavi36 and DEs to DENV and CHIKV obtained for the Tibati population. DEs were obtained for both viruses at 14 days post-infection. In total, 191 and 122 individuals were examined for presence of AlbFlavi2/AlbFlavi36 after infection DENV and CHIKV, respectively. Interactions of populations and frequencies of AlbFlavi2/AlbFlavi36 with DEs were tested using logistic regression models.

Association between AlbFlavi2/Albflavi36 and vector competence in *Ae. albopictus* at the individual level

To further investigate the biological role of AlbFlavi2 and AlbFlavi36, we extended our analyses of association between the presence of these two NIRVS and viral dissemination from a population level to an individual level. To do so, mosquitoes of the Foshan colony strain and the field-collected Tibati population (Cameroon) were infected with DENV-2 and CHIKV. At 14 days post-infection, mosquito dissemination status and the presence of both AlbFlavi2 and AlbFlavi36 were determined for 313 mosquitoes (Figure 5). When comparing DENV dissemination, Foshan better disseminated than Tibati (respectively 89.8% and 42.2%; p -value $< 10^{-4}$; data not shown). However, the presence of AlbFlavi2 or AlbFlavi36 in mosquitoes from Foshan or Tibati was not significantly associated to DENV dissemination (p -values > 0.209 ; Figure 5(A–D)). Moreover, the same results were obtained regarding the association between AlbFlavi2/AlbFlavi36 presence and CHIKV dissemination (p -values > 0.3 ; Figure 5(A–D)). In all, using both laboratory colony and field-collected mosquitoes, no association was found between any of the two NIRVS (AlbFlavi2 and AlbFlavi36) and DENV/CHIKV dissemination.

Discussion

The presence of sequences with similarities to Flaviviruses in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes and their enrichment in piRNA clusters support the hypothesis that viral integrations, at least some, are not simply viral fossils, but could have a biological role [24,25,54]. Here we demonstrated that the NIRVS studied are not neutrally distributed among *Ae. albopictus* populations and all of them (except AlbFlavi1) were significantly associated to vector competence to DENV and CHIKV.

NIRVS are not neutral markers

NIRVS are endogenous viral sequences located in protein-coding gene exons, intergenic regions, and PIWI-interacting RNA (piRNA) clusters [55]. Contrary to the other categories, piRNA genes are evolving rapidly under positive selection to generate a high diversity of piRNAs [56–63]. Approximately 30 sequences of flaviviral ORFs (primarily NS1 and NS5) were detected in the Foshan colony [24] including the early-detected Flavivirus-like sequences [21,64]. It has been suggested that the variable number and frequency of NIRVS across *Ae. albopictus* populations contribute to variations of genome size among mosquitoes [36]. Our study targeted seven NIRVS (AlbFlavi1, AlbFlavi2, AlbFlavi4, AlbFlavi10, AlbFlavi36, AlbFlavi41, CSA), for which their

evolution under selection pressures or simply by genetic drift remained unknown.

Contrary to NIRVS deriving from flaviviruses in *Ae. aegypti* (unpublished data), the presence of the tested NIRVS was highly variable among worldwide populations, with the lowest number being detected in mosquitoes from Brazil. This suggests that these NIRVS have not reached fixation in any of the *Ae. albopictus* populations tested (with potential exception for AlbFlavi1 and a fragment of CSA). Interestingly, Brazilian populations (Manaus, Rio, and PMNI) displayed the lowest number of NIRVS studied with a total absence of AlbFlavi10, AlbFlavi36 and CSA-NS3. Considering the ancient origin of NIRVS, estimated between 6.5 thousands to 2.5 million years ago [65], we hypothesized that they might have been less exposed to ISFs in the past, leading to fewer NIRVS in their genomes or that populations may have acquired NIRVS in the past which have been lost over time.

We showed that the microsatellite polymorphism of populations did not match with the NIRVS abundance profiles. Therefore, because microsatellites are sequences that neutrally evolve in the genome, we speculate that the evolution of NIRVS is far from neutral and NIRVS could provide benefits to the host. NIRVS may have been produced for specific purposes in the host rather than being the consequences of random endogenization of exogenous viral fragments.

The focus on NIRVS from piRNA cluster (AlbFlavi2) and intergenic region (AlbFlavi36) revealed different sequence polymorphism and evolutionary histories despite their relatively wide distribution among *Ae. albopictus* populations. Whereas AlbFlavi36 appeared monophyletic with highly conserved sequences among populations, the phylogenetic analyses showed a particularly complex history for Albflavi2 evolving by both mutation and deletion events. We postulate that owing to its high variability, AlbFlavi2 may act similarly to TE fragments and piRNA genes, and evolve according to exposures to related exogenous virus burden.

Association between NIRVS and vector competence to arboviruses

Similar to some endogenous retroviruses (ERVs) that have an effect on viruses from different subfamilies and genera [66], we questioned whether NIRVS deriving from ISF sequences affect the dissemination of different arboviruses and contribute to the regulation of vector competence of *Ae. albopictus* mosquitoes. Because NIRVS located in piRNA clusters, such as AlbFlavi2, produce piRNAs, are differentially distributed among populations and appeared older integrations than NIRVS located in codons [65], they were proposed to function as novel mosquito antiviral immune factors. However, contradictory results were obtained using both population- and individual-level analysis.

At the population level, many NIRVS were present in *Ae. albopictus* populations. The frequency of some of them appears correlated (positively or negatively) to DENV dissemination. Whereas some NIRVS were associated with high viral dissemination (i.e. AlbFlavi2 and CSA-JJL), others were significantly related to low viral dissemination (AlbFlavi10, AlbFlavi36, AlbFlavi41 and CSA-NS3), suggesting different functions of NIRVS deriving from ISFs. Moreover, fewer NIRVS were positively (i.e. AlbFlavi4) and negatively (i.e. AlbFlavi36 and CSA-NS3) correlated to CHIKV dissemination. These results are consistent with the contradictory results obtained in studies assessing the impact of exogenous ISFs on arbovirus fitness in mosquitoes. Indeed, whereas some ISFs have shown to repress arboviral replication [67], others have been proved to facilitate infection [68]. Further experiments should be performed to confirm these results, as only 20 mosquitoes per population were tested for NIRVS distribution.

At the level of individuals, our pilot experiment based on mosquitoes from both laboratory colony and field did not show any significant association between dissemination of DENV and CHIKV, and NIRVS, AlbFlavi2 or AlbFlavi36. While this does not seem surprising for the alphavirus CHIKV considering that NIRVS examined are homologous to flavivirus sequences, it is still questionable for DENV. Since it appears that they do not evolve neutrally and were preserved from purifying selection, NIRVS such as CSA has demonstrated to produce a transcript of 4671 nt long [21,69]; its functional role should be investigated. Lastly, other components should be considered such as the virome [70] in addition to the anatomical barriers in the mosquito such as the salivary glands for viral transmission [19].

To conclude, our results clearly show that NIRVS in *Ae. albopictus* follow processes different from that of neutral genes such as microsatellites and most NIRVS are far from reaching fixation. Flaviviral integrations are differentially distributed among *Ae. albopictus* populations and are here suggested to be associated with the vector competence to arboviruses by mechanisms that remain to be elucidated. Finally, this study opens the way to new perspectives on evolution and biological functions of NIRVS, in part on vector competence.

Acknowledgements

We are grateful to Basile Kamgang for providing mosquito samples, and Dominique Higuët, Anna Malacrida, Giuliano Gasperi for discussions. We also thank Charlotte Balthère, Valérie Caro and Aurélie Kwasiborski for help in genotyping mosquitoes.

Author contributions

ABF and XDL designed the experiments; VH performed the research; GG did the microsatellite genotyping; CD did the phylogenetic reconstruction; MS

and MM did the analysis of genetic structure; YD did the statistical analysis; LM and PSY provided a technical help; MB edited the paper; VH, CD, ABF wrote the paper.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This study was supported by the Institut Pasteur, the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant number ANR-10-LABX-62-IBED to A-BF), the European Union's Horizon 2020 research and innovation program, ZIKAlliance program under ZIKAlliance grant agreement no. 734548 to A-BF, and the European Research Council, NIRV_HOST_INT Council (grant agreement number 682394 – NIRV_HOST_INT to VH and MB).

ORCID

Michele Marconcini  <http://orcid.org/0000-0002-6785-9106>

Mariangela Bonizzoni  <http://orcid.org/0000-0003-0568-8564>

Anna-Bella Failloux  <http://orcid.org/0000-0001-6890-0820>

References

- Paupy C, Delatte H, Bagny L, et al. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect.* 2009;11:1177–1185. doi:10.1016/j.micinf.2009.05.005.
- Bonizzoni M, Gasperi G, Chen X, et al. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol.* 2013;29:460–468. doi:10.1016/j.pt.2013.07.003.
- Caminade C, Medlock JM, Ducheyne E, et al. Suitability of European climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *J R Soc Interface.* 2012;9:2708–2717. doi:10.1098/rsif.2012.0138.
- Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, et al. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2007;7:76–85. doi:10.1089/vbz.2006.0562.
- Lounibos LP. Invasions by insect vectors of human disease. *Annu Rev Entomol.* 2002;47:233–266. doi:10.1146/annurev.ento.47.091201.145206.
- Hawley WA. The biology of *Aedes albopictus*. *J Am Mosq Control Assoc Suppl.* 1988;1:1–39.
- Adhami J, Reiter P. Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc.* 1998;14:340–343.
- Sprenger D, Wuithiranyagool T. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *J Am Mosq Control Assoc.* 1986;2:217–219.
- Consoli RAGB OR. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Rio de Janeiro. Editora FIOCRUZ. 1994;228.

- [10] Cornel AJ, Hunt RH. *Aedes albopictus* in Africa? First records of live specimens in imported tires in Cape Town. *J Am Mosq Control Assoc.* 1991;7:107–108.
- [11] Goubert C, Minard G, Vieira C, et al. Population genetics of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*, an invasive vector of human diseases. *Heredity (Edinb).* 2016;117:125–134. doi:10.1038/hdy.2016.35.
- [12] Jackson H, Strubbe D, Tollington S, et al. Ancestral origins and invasion pathways in a globally invasive bird correlate with climate and influences from bird trade. *Mol Ecol.* 2015;24:4269–4285. doi:10.1111/mec.13307.
- [13] Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2013;108(Suppl 1):11–17. doi:10.1590/0074-0276130395.
- [14] Maynard AJ, Ambrose L, Cooper RD, et al. 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.* 2017;11:e0005546. doi:10.1371/journal.pntd.0005546.
- [15] Kotsakiozi P, Richardson JB, Pichler V, et al. Population genomics of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*: insights into the recent worldwide invasion. *Ecol Evol.* 2017;7:10143–10157. doi:10.1002/ece3.3514.
- [16] Manni M, Gomulski LM, Aketarawong N, et al. Molecular markers for analyses of intraspecific genetic diversity in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors.* 2015;8:188. doi:10.1186/s13071-015-0794-5.
- [17] Manni M, Guglielmino CR, Scolari F, et al. Genetic evidence for a worldwide chaotic dispersion pattern of the arbovirus vector, *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2017;11:e0005332. doi:10.1371/journal.pntd.0005332.
- [18] Mousson L, Dauga C, Garrigues T, et al. Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet Res.* 2005;86:1–11. doi:10.1017/S0016672305007627.
- [19] Kramer LD, Ebel GD. Advances in virus research. *Adv Virus Res.* 2003;60:187–232.
- [20] Zouache K, Fontaine A, Vega-Rúa A, et al. Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci.* 2014;281. doi:10.1098/rspb.2014.1078.
- [21] Crochu S, et al. Sequences of flavivirus-related RNA viruses persist in DNA form integrated in the genome of *Aedes* spp. mosquitoes. *J Gen Virol.* 2004;85:1971–1980. doi:10.1099/vir.0.79850-0.
- [22] Katzourakis A, Gifford RJ. Endogenous viral elements in animal genomes. *PLoS Genet.* 2010;6:e1001191. doi:10.1371/journal.pgen.1001191.
- [23] Fort P, Albertini A, Van-Hua A, et al. Fossil rhabdoviral sequences integrated into arthropod genomes: ontogeny, evolution, and potential functionality. *Mol Biol Evol.* 2012;29:381–390. doi:10.1093/molbev/msr226.
- [24] Palatini U, Miesen P, Carballar-Lejarazu R, et al. Comparative genomics shows that viral integrations are abundant and express piRNAs in the arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *BMC Genomics.* 2017;18:512. doi:10.1186/s12864-017-3903-3.
- [25] Whitfield ZJ, Dolan PT, Kunitomi M, et al. The diversity, structure, and function of heritable adaptive immunity sequences in the *Aedes aegypti* genome. *Curr Biol.* 2017;27:3511–3519. doi:10.1016/j.cub.2017.09.067. e3517.
- [26] Brennecke J, Aravin AA, Stark A, et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell.* 2007;128:1089–1103. doi:10.1016/j.cell.2007.01.043.
- [27] Pelisson A, Sarot E, Payen-Groschene G, et al. A novel repeat-associated small interfering RNA-mediated silencing pathway downregulates complementary sense gypsy transcripts in somatic cells of the *Drosophila* ovary. *J Virol.* 2007;81:1951–1960. doi:10.1128/JVI.01980-06.
- [28] Saito K, Nishida KM, Mori T, et al. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev.* 2006;20:2214–2222. doi:10.1101/gad.1454806.
- [29] Vagin VV, Sigova A, Li C, et al. A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline. *Science.* 2006;313:320–324. doi:10.1126/science.1129333.
- [30] Zanni V, Eymery A, Coiffet M, et al. Distribution, evolution, and diversity of retrotransposons at the flamenco locus reflect the regulatory properties of piRNA clusters. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2013;110:19842–19847. doi:10.1073/pnas.1313677110.
- [31] Frank JA, Feschotte C. Co-option of endogenous viral sequences for host cell function. *Curr Opin Virol.* 2017;25:81–89. doi:10.1016/j.coviro.2017.07.021.
- [32] Aswad A, Katzourakis A. Paleovirology and virally derived immunity. *Trends Ecol Evol.* 2012;27:627–636. doi:10.1016/j.tree.2012.07.007.
- [33] Katzourakis A. Paleovirology: inferring viral evolution from host genome sequence data. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 2013;368:20120493. doi:10.1098/rstb.2012.0493.
- [34] Musso D, Rodriguez-Morales AJ, Levi JE, et al. Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. *Lancet Infect Dis.* 2018;18:e355–e361. doi:10.1016/S1473-3099(18)30269-X.
- [35] Fritzell C, Rousset D, Adde A, et al. Current challenges and implications for dengue, chikungunya and Zika seroprevalence studies worldwide: A scoping review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018;12:e0006533. doi:10.1371/journal.pntd.0006533.
- [36] Chen XG, Jiang X, Gu J, et al. Genome sequence of the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, reveals insights into its biology, genetics, and evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2015;112:E5907–E5915. doi:10.1073/pnas.1516410112.
- [37] GENETIX 4.05 Logiciel Sous Windows TM Pour la Génétique des Populations. 1996–2004.
- [38] FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). 2001.
- [39] Excoffier L, Lischer HE. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 2010;10:564–567. doi:10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x.
- [40] Peakall R, Smouse PE. Genalex 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics.* 2012;28:2537–2539. doi:10.1093/bioinformatics/bts460.
- [41] Vazeille M, Zouache K, Vega-Rúa A, et al. Importance of mosquito “quasispecies” in selecting an epidemic arthropod-borne virus. *Sci Rep.* 2016;6:29564. doi:10.1038/srep29564.

- [42] Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 2000;155:945–959.
- [43] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol Ecol*. 2005;14:2611–2620. doi:10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x.
- [44] Rosenberg N. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Mol Ecol Notes*. 2004;4:137–138. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x.
- [45] Rozen S, Skaletsky H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. *Methods Mol Biol*. 2000;132:365–386.
- [46] Ricotta C, Podani J. On some properties of the Bray-Curtis dissimilarity and their ecological meaning. *Ecol Complex*. 2017;31:201–205.
- [47] Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, et al. 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*. 2014;88:6294–6306. doi:10.1128/JVI.00370-14.
- [48] Edgar RC. MUSCLE: a multiple sequence alignment method with reduced time and space complexity. *BMC Bioinformatics*. 2004;5:113. doi:10.1186/1471-2105-5-113.
- [49] PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4. Sunderland (MA), 1998.
- [50] Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, et al. Variation in oral susceptibility to dengue type 2 virus of populations of *Aedes aegypti* from the islands of Tahiti and Moorea, French Polynesia. *Am J Trop Med Hyg*. 1999;60:292–299.
- [51] Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, et al. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med*. 2006;3:e263. doi:10.1371/journal.pmed.0030263.
- [52] Amraoui F, Ben Ayed W, Madec Y, et al. Potential of *Aedes albopictus* to cause the emergence of arboviruses in Morocco. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019;13:e0006997. doi:10.1371/journal.pntd.0006997.
- [53] Liu P, Dong Y, Gu J, et al. Developmental piRNA profiles of the invasive vector mosquito *Aedes albopictus*. *Parasit Vectors*. 2016;9:524. doi:10.1186/s13071-016-1815-8.
- [54] Olson KE, Bonizzoni M. Nonretroviral integrated RNA viruses in arthropod vectors: an occasional event or something more? *Curr Opin Insect Sci*. 2017;22:45–53. doi:10.1016/j.cois.2017.05.010.
- [55] Houe V, Bonizzoni M, Failloux AB. Endogenous non-retroviral elements in genomes of *Aedes* mosquitoes and vector competence. *Emerg Microbes Infect*. 2019;8:542–555. doi:10.1080/22221751.2019.1599302.
- [56] Lee YC, Langley CH. Long-term and short-term evolutionary impacts of transposable elements on *Drosophila*. *Genetics*. 2012;192:1411–1432. doi:10.1534/genetics.112.145714.
- [57] Vermaak D, Henikoff S, Malik HS. Positive selection drives the evolution of rhino, a member of the heterochromatin protein 1 family in *Drosophila*. *PLoS Genet*. 2005;1:96–108. doi:10.1371/journal.pgen.0010009.
- [58] Lewis SH, Quarles KA, Yang Y, et al. Pan-arthropod analysis reveals somatic piRNAs as an ancestral defence against transposable elements. *Nat Ecol Evol*. 2018;2:174–181. doi:10.1038/s41559-017-0403-4.
- [59] Heger A, Ponting CP. Evolutionary rate analyses of orthologs and paralogs from 12 *Drosophila* genomes. *Genome Res*. 2007;17:1837–1849. doi:10.1101/gr.6249707.
- [60] Obbard DJ, Gordon KH, Buck AH, et al. The evolution of RNAi as a defence against viruses and transposable elements. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 2009;364:99–115. doi:10.1098/rstb.2008.0168.
- [61] Kolaczowski B, Hupalo DN, Kern AD. Recurrent adaptation in RNA interference genes across the *Drosophila* phylogeny. *Mol Biol Evol*. 2011;28:1033–1042. doi:10.1093/molbev/msq284.
- [62] Yi M, Chen F, Luo M, et al. Rapid evolution of piRNA pathway in the teleost fish: implication for an adaptation to transposon diversity. *Genome Biol Evol*. 2014;6:1393–1407. doi:10.1093/gbe/evu105.
- [63] Simkin A, Wong A, Poh YP, et al. Recurrent and recent selective sweeps in the piRNA pathway. *Evolution*. 2013;67:1081–1090. doi:10.1111/evo.12011.
- [64] Roiz D, Vazquez A, Seco MP, et al. Detection of novel insect flavivirus sequences integrated in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *Virol J*. 2009;6:93. doi:10.1186/1743-422X-6-93.
- [65] Pischetta E, Scolari F, Valerio F, et al. Insights into an unexplored component of the mosquito repeatome: distribution and variability of viral sequences integrated into the genome of the arboviral vector *Aedes albopictus*. *Front Genet*. 2019;10:93. doi:10.3389/fgene.2019.00093.
- [66] Yap MW, Colbeck E, Ellis SA, et al. Evolution of the retroviral restriction gene Fv1: inhibition of non-MLV retroviruses. *PLoS Pathog*. 2014;10:e1003968. doi:10.1371/journal.ppat.1003968.
- [67] Hobson-Peters J, Yam AWY, Lu JWF, et al. A new insect-specific flavivirus from northern Australia suppresses replication of West Nile virus and Murray Valley encephalitis virus in co-infected mosquito cells. *PLoS One*. 2013;8:e56534. doi:10.1371/journal.pone.0056534.
- [68] Kuwata R, Isawa H, Hoshino K, et al. Analysis of mosquito-borne flavivirus superinfection in *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae) cells persistently infected with Culex Flavivirus (Flaviviridae). *J Med Entomol*. 2015;52:222–229. doi:10.1093/jme/tju059.
- [69] Suzuki Y, Frangeul L, Dickson LB, et al. Uncovering the repertoire of endogenous flaviviral elements in *Aedes* mosquito genomes. *J Virol*. 2017;91. doi:10.1128/JVI.00571-17.
- [70] Bolling BG, Weaver SC, Tesh RB, et al. Insect-specific virus discovery: significance for the arbovirus community. *Viruses*. 2015;7:4911–4928. doi:10.3390/v7092851.

Autres travaux

Mercier A, Obadia T, Carraretto D, Velo E, **Gabiane G**, Bino S, Vazeille M, Gasperi G, Dauga C, Malacrida AR, Reiter P, Failloux AB. Impact of temperature on dengue and chikungunya transmission by the mosquito *Aedes albopictus*. *Sci Rep.* 2022 Apr 28;12(1):6973. doi: 10.1038/s41598-022-10977-4. PMID: 35484193; PMCID: PMC9051100.

Bellone R, Lequime S, Jupille H, Göertz GP, Aubry F, Mousson L, Piorkowski G, Yen PS, **Gabiane G**, Vazeille M, Sakuntabhai A, Pijlman GP, de Lamballerie X, Lambrechts L, Failloux AB. Experimental adaptation of dengue virus 1 to *Aedes albopictus* mosquitoes by in vivo selection. *Sci Rep.* 2020 Oct 27;10(1):18404. doi: 10.1038/s41598-020-75042-4. PMID: 33110109; PMCID: PMC7591890.

Goehrig D, Nigri J, Samain R, Wu Z, Cappello P, **Gabiane G**, Zhang X, Zhao Y, Kim IS, Chanal M, Curto R, Hervieu V, de La Fouchardière C, Novelli F, Milani P, Tomasini R, Bousquet C, Bertolino P, Hennino A. Stromal protein β ig-h3 reprogrammes tumour microenvironment in pancreatic cancer. *Gut.* Apr;68(4):693-707. 2019. doi: 10.1136/gutjnl-2018-317570. Epub 2018 Nov 10. PMID: 30415234.

Galloux M, **Gabiane G**, Sourimant J, Richard CA, England P, Moudou M, Aumont-Nicaise M, Fix J, Rameix-Welti MA, Eleouët JF. Identification and characterization of the binding site of the respiratory syncytial virus phosphoprotein to RNA-free nucleoprotein. *J Virol.* Apr;89(7):3484-96. 2015. doi: 10.1128/JVI.03666-14. Epub 2015 Jan 7. PMID: 25568210.

Communication scientifiques

Oral :

08 Décembre 2021 : Virology Day – Yellow Fever in the Caribbean : what are the entomological risks?

05 Décembre 2019 : Rencontre scientifique sur la Fièvre Jaune /risques épidémiques de la fièvre jaune en Amérique du Sud et dans la Caraïbe : état des lieux et perspectives de recherche – Hôtel de la CTM – Martinique - Compétence Vectorielle d’Aedes Aegypti de Martinique : Premiers Résultats

Poster :

16-18 Mai 2022 : Journée Départementale de Virologie - Virus de la fièvre jaune dans la Caraïbe : les risques entomologiques? - Gaelle Gabiane, Fabrice Sonor, Manuel Etienne, Juliette Smith-Ravin, Alain Blateau, André Yébakima, Anna-Bella Failloux.

28-29 Avril 2021 : Journée Francophone de Virologie - Virus de la fièvre jaune dans la Caraïbe : les risques entomologiques? - Gaelle Gabiane, Fabrice Sonor, Manuel Etienne, Juliette Smith-Ravin, Alain Blateau, André Yébakima, Anna-Bella Failloux.