



Émergence du virus chikungunya en Amérique et en Europe

Anubis Vega Rua

► **To cite this version:**

Anubis Vega Rua. Émergence du virus chikungunya en Amérique et en Europe. Virologie. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2015. Français. <NNT : 2015PA066197>. <tel-01341062>

HAL Id: tel-01341062

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01341062>

Submitted on 4 Jul 2016

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 Pierre et Marie Curie

École doctorale 515 : Complexité du Vivant

Unité d'Arbovirus et Insectes Vecteurs, Institut Pasteur Paris

Émergence du virus chikungunya en Amérique et en Europe.

Par Anubis VEGA RUA

Thèse de doctorat de Bactériologie, Virologie, Parasitologie

Dirigée par Anna Bella FAILLOUX

Présentée et soutenue publiquement le 2 juillet 2015

Devant un jury composé de :

M. Dominique Higué, Professeur	Président du Jury
M. Christophe Paupy, Chargé de Recherche	Rapporteur
M. Rémi Charrel, Professeur	Rapporteur
M. Xavier de Lamballerie, Professeur	Examineur
Mme. Isabelle Leparç-Goffart, Chercheur	Examineur
M. François Rougeon, Professeur émérite	Examineur
M. Ricardo Lourenço-de-Oliveira, Directeur de Recherche	Examineur
Mme. Anna Bella Failloux, Directeur de Recherche	Directeur de thèse

“La recherche est un processus sans fin dont on ne peut jamais dire comment il évoluera. L'imprévisible est dans la nature même de la science.”

François Jacob

Remerciements

Je remercie tout d'abord Anna Bella Failloux pour m'avoir permis de passer ces trois merveilleuses années dans son équipe, où l'enthousiasme, le dynamisme, la bonne humeur et la solidarité m'ont permis d'avoir l'épanouissement scientifique et humain que je cherchais. Merci Anna Bella pour ton soutien, ta confiance en moi, et ta présence. J'ai eu de la chance d'être encadrée par toi. Je suis consciente de la chance que j'ai de t'avoir comme encadrant.

Je tiens à remercier M. Christophe Paupy et M. Rémi Charrel d'avoir accepté d'être rapporteurs de ce mémoire. Merci également à M. Dominique Higuët, Mme Isabelle Leparç-Goffart, M. Xavier de Lamballerie, M. François Rougeon et à M. Ricardo Lourenço-de-Oliveira d'avoir accepté d'examiner ce travail. Mes remerciements vont également au Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche français pour avoir financé ma thèse.

Ricardo, a ti te escribo especialmente en español. Conocerte fue una de las grandes dichas de mi tesis. Estoy muy obligada por todo lo que has hecho por mí, ya sea desde un punto de vista científico o humano. Aquí tendrás una amiga para siempre.

Lolo...snif sniff...ça va être dur pour moi de me retrouver dans un bureau toute seule. Je n'aurai jamais imaginé qu'une véritable cubaine et une véritable parisienne pouvaient avoir des caractères si compatibles! Merci pour...oups la liste est longue! Merci pour ta compagnie, ta patience, pour assurer l'animation et le rangement du labo, et surtout pour ton soutien et tes conseils de toute sorte.

Marie, merci beaucoup pour tes conseils, pour m'avoir appris tant des choses... grâce à toi je sais comment travailler proprement dans un P3 ! Mais surtout, je te remercie pour ton soutien, ta disponibilité et pour ta bonne humeur. Tu vas beaucoup me manquer...

Un grand merci à Faustine, à Célestine et à Fadila pour être toujours à l'écoute, pour vos conseils, et pour rendre la vie de tous les jours plus agréable. Vous allez me manquer les filles!

Thanks to the lab boys, Pei-Shi and Henri for your jokes, advices and for surviving in our matriarchy!

Karima, merci pour nos longues discussions et pour ton aide sans conditions. Tu as été, et tu l'es toujours, une force motrice de ma production scientifique, mais en plus, tu es une précieuse amie.

Ilaria, un enorme bacio per te sorella mia. Grazie mille per il tuo aiuto quando eri con me in laboratorio! Tu sei molto importante per me.

Gracias a mis amigos Camilo, Lucia, Raúl y a mi compatriota Yovan por, entre otras cosas, traer la alegría de América latina aquí al Pasteur.

Merci à nos voisins les IVistes: Vincent, Albin, Isabelle, Sébastien, Davy, Laura et bien sûr à Louis pour la science, l'animation et la gentillesse. Merci également à Paul Reiter pour nos discussions.

Merci à Catherine et Christelle pour votre aide dans le laboratoire. Jocelyne, merci pour ta gentillesse incomparable et ta compagnie.

Merci également à tous ces jeunes adorables que j'ai eu la chance de rencontrer pendant la thèse : Aurélien, Sappho, Raouf, Camille, Azdeen, Rénée, Najma, Basile...

Un grand merci également à toutes ces équipes qui m'ont accueilli chaleureusement et qui ont contribué à cette thèse :

Merci à Valérie Caro, à Laure Diancourt, à Jean-Michel Thiberge, à Anne-Sophie et à tout le reste de l'équipe PGP pour sa contribution à cette thèse et notamment pour le génotypage de « ma plaque du jour ».

Je remercie l'équipe d'Anna Malacrida et Giuliano Gasperi à l'Université de Pavie en Italie pour m'avoir accueilli dans leur laboratoire et pour sa contribution à une partie des travaux présentés dans cette thèse. Grazie mille!

Merci à Christine Schmitt et Isabelle Bonne pour les heures passées devant le microscope et pour les belles acquisitions.

Je souhaiterais aussi remercier celles et ceux qui m'ont soutenue et aidée au quotidien, en dehors des longues heures passées à Pasteur :

Merci à mes amies parisiennes-irano-malgaches pour votre gaieté constante, c'est un plaisir de faire partie des 'pats! Un grand merci à la Bretagne : ma belle famille et mes amis bretons, sans oublier les provençaux et les alsaciens.

Gracias a mis "mamis" queridas Lisandra, Lauri, Tanita y Aloyma por el cariño y el apoyo. Ya está visto y comprobado que ni la distancia puede separarnos. Tani, a ti te debo un agradecimiento más que especial por toda la ayuda que me diste con mi manuscrito de tesis, ni 5 huevos de Fabergé pueden pagar lo que has hecho. ¡Te agradezco de todo corazón! Muchas gracias a Manu también.

Un beso inmenso y un agradecimiento aun más grande para mi familia en Cuba, en especial a Mima y a mis padres. Nunca olvidaré que esta tesis existe gracias a ustedes. Gracias por el amor incondicional que siempre me han profesado y que me ha dado la fuerza para seguir adelante. Mamá, no existen palabras para agradecerle todo tu esfuerzo y dedicación. Nunca duden que ustedes son lo más grande que yo tengo.

Adrien, le plus grand remerciement est sans doute pour toi. Tu as été toujours là dans les moments de joie, de stress, de doutes...et tu as su toujours me comprendre, t'adapter et trouver la bonne solution pour m'aider à surmonter les difficultés durant cette thèse. Merci de t'intéresser au moustique et pour les incomptables relectures du manuscrit qui ont fait que maintenant tu connais ce sujet aussi bien que moi. Je sens que je ne te remercierai jamais suffisamment, mais merci pour ces trois années merveilleuses.

Enfin, merci aux moustiques pour le temps passé ensemble!

Résumé

Le virus chikungunya (CHIKV) transmis par les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* constitue un problème majeur de santé publique. Depuis 2004, des épidémies de CHIKV ont été rapportées en Afrique, en Asie, dans les îles de l'Océan Indien, et en Europe. Seule l'Amérique semblait épargnée malgré la présence de fortes densités de moustiques vecteurs et de multiples importations du virus dans le continent par des voyageurs de retour de pays où le virus circulait. Nous avons abordé le risque d'émergence du CHIKV en Amérique à partir d'une évaluation exhaustive de la compétence vectorielle en infectant 35 populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* locaux avec différentes souches de CHIKV. Nous avons souligné que les populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* d'Amérique sont compétentes vis-à-vis du CHIKV avec un rôle prépondérant des glandes salivaires comme « filtre » de la transmission. De plus, le génotypage des moustiques par microsatellites a indiqué une forte différenciation génétique des populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique et a permis l'identification d'un cluster génétique de populations d'*Ae. albopictus* se caractérisant par une compétence vectorielle faible vis-à-vis des souches de CHIKV de génotype Est-Centre-Sud-africain. En octobre 2013, les premiers cas de CHIKV sont signalés dans la Caraïbe qui deviendra le point de départ d'une épidémie couvrant plus de 40 pays d'Amérique. Contre toute attente, le génotype asiatique de CHIKV est impliqué dans l'épidémie alors que le génotype Est-Centre-Sud-africain est devenu prédominant après son émergence en 2004. Nous avons évalué la réceptivité de 11 populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* d'Amérique vis-à-vis de CHIKV de génotype asiatique et avons mis en évidence que les deux espèces étaient suffisamment compétentes pour assurer une large diffusion du virus sur le continent. Par ailleurs, on note qu'*Ae. albopictus* était susceptible de faciliter la propagation du CHIKV vers les régions tempérées du continent et vraisemblablement, vers l'Europe. Néanmoins, la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* de France vis-à-vis de CHIKV asiatique est affectée négativement par des températures plus basses que celles habituellement observées dans les pays tropicaux.

Mot clés : *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, chikungunya, Amériques, Europe, compétence vectorielle

Summary

Chikungunya virus (CHIKV) mainly transmitted by the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*, is a major public health problem. Since 2004, CHIKV epidemics have been reported in Africa, Asia, the Indian Ocean Islands, and Europe. Only the Americas seemed spared despite the high densities of mosquitoes and multiple introductions of the virus in the continent by travelers returning from countries where the virus was circulating. We have addressed the risk of CHIKV emergence in the Americas from a comprehensive evaluation of vector competence by infecting 35 local populations of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* with different strains of CHIKV. We showed that populations of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* from the Americas were susceptible to CHIKV, underlying the predominant role of salivary glands as a “filter” of transmission. In addition, genotyping of *Ae. albopictus* populations with microsatellites indicated a high genetic differentiation of the species across America and allowed the identification of a genetic cluster grouping *Ae. albopictus* populations characterized by a low vector competence to transmit CHIKV strains belonging to the East-Central-South-African genotype. In October 2013, the first cases of CHIKV were reported in the Caribbean that will become the starting point of an epidemic covering over 40 countries in the Americas. Against all odds, the Asian CHIKV genotype was involved in the outbreak, while the East-Central-South-African genotype was predominant after its emergence in 2004. We evaluated the susceptibility of 11 populations of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* for an Asian CHIKV genotype and showed that the two species were competent enough to ensure wide dissemination of the virus on the continent. Furthermore, we showed that *Ae. albopictus* was likely to facilitate the spread of CHIKV to temperate regions of the continent and possibly, to Europe. However, the vector competence of French *Ae. albopictus* for an Asian CHIKV genotype was negatively affected by temperatures lower than those usually found in tropical countries.

Key words: *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, chikungunya, Americas, Europe, vector competence

Liste d'abréviations

% : Pourcentage	MAYV : virus Mayaro
°C : Degré Celsius	MgCl ₂ : Chlorure de magnésium
A : alanine	ml : Millilitres
ADN : Acide désoxyribonucléique	mM : Millimolaire
ADNmt : ADN mitochondrial	nt : nucléotides
Ae. : <i>Aedes</i>	NTR : région non traduite
ARN : Acide ribonucléique	ONNV : virus O'nyong nyong
ARNdb : ARN double brin	ORF : phase ouverte de lecture
ARNi : ARN interference	PAHO : organisation panaméricaine de la santé
ARNm : ARN messenger	PBS : tampon phosphate salin
ARNss : ARN simple brin	PCR : Réaction en chaîne par polymérase
BFV : le virus Barmah Forest	PFU : unité formant plaque
C6/36 : cellules d' <i>Aedes albopictus</i>	Ph : potentiel hydrogène
CHIK : chikungunya (maladie)	pi : post-infection
CHIKV : virus du chikungunya	Q : Glutamine
DDT : dichlorodiphényltrichloroéthane	QTL : Locus de caractères quantitatifs
DEN : dengue (maladie)	RRV : virus Ross River
DENV : virus de la dengue	RVFV : virus de la fièvre de la vallée du Rift
DENV-1 : DENV sérotype 1	S : Svedberg
DENV-2 : DENV sérotype 2	SINV : virus Sindbis
DENV-3 : DENV sérotype 3	smRNA : petits ARN
DENV-4 : DENV sérotype 4	SNP : Polymorphisme nucléotidique
DHF : dengue hémorragique	sp. : espèce
DSS : syndrome de choc de la dengue	spp. : espèces
ECSA : Est/Centre/Sud Afrique	SVF : sérum de veau foetal
EEEV : virus de l'encéphalite équine de l'est	T : thréonine
EEOV : virus de l'encéphalite équine de l'ouest	V : valine
G x G : interaction génotype x génotype	VEEV : virus de l'encéphalite équine de Venezuela
K : lysine	Vero : lignée des cellules du rein de singe vert
kb : kilobase	WNV : virus West Nile
L : leucine	YFV : virus de la Fièvre Jaune
ln : logarithme népérien	μl : Microlitres
	μM : Micromolaire

Table des matières

INTRODUCTION GÉNÉRALE ET OBJECTIFS	1
PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE	7
CHAPITRE 1 ARBOVIRUS ET TRANSMISSION VECTORIELLE	9
1.1 Les Arbovirus	11
1.2 La capacité et la compétence vectorielles	13
1.2.1 Définitions	13
1.2.2 Transmission des arbovirus par les moustiques	18
1.2.3 Évaluation de la compétence vectorielle	22
1.3 Les arbovirus en Amérique	25
CHAPITRE 2 LE VIRUS DU CHIKUNGUNYA	31
2.1 Les alphavirus	33
2.2 Le virus du chikungunya	34
2.2.1 Cycle de répllication et organisation du génome	34
2.2.2 Phylogénie, émergence et distribution mondiale	36
2.2.3 Pathogénèse et tropisme cellulaire chez l'homme	41
2.2.4 Cycle de transmission	43
CHAPITRE 3 LES MOUSTIQUES VECTEURS, <i>Aedes aegypti</i> ET <i>Aedes albopictus</i>	45
3.1 Classification taxonomique et biologie	47
3.2 Distribution, bio-écologie et importance médicale	50
3.2.1 <i>Ae. aegypti</i>	50
3.2.2 <i>Ae. albopictus</i>	52
3.3 Principes de génétique des populations et mesures de la variabilité génétique	54
3.3.1 Les Marqueurs Microsatellites	59

3.4	Colonisation et variabilité génétique d' <i>Ae. aegypti</i> et <i>Ae. albopictus</i> en Amérique	60
3.4.1	<i>Ae. aegypti</i>	60
3.4.2	<i>Ae. albopictus</i>	62
PARTIE 2 : MÉMOIRE EXPÉRIMENTAL		67
CHAPITRE 4 RISQUE POTENTIEL D'ÉMERGENCE DU VIRUS CHIKUNGUNYA EN AMÉRIQUE		69
4.1	Contexte	71
4.2	Démarche Expérimentale	72
4.3	Résultats	74
4.4	Conclusions	74
4.5	Article 1	76
CHAPTER 5 PROPAGATION DU VIRUS CHIKUNGUNYA EN AMÉRIQUE ET RISQUE D'INTRODUCTION EN EUROPE		99
5.1	Contexte	101
5.2	Démarche Expérimentale	102
5.3	Résultats	104
5.4	Conclusions	105
5.5	Article 2	108
CHAPITRE 6 VARIABILITÉ GÉNÉTIQUE D' <i>Ae. albopictus</i> EN AMÉRIQUE		127
6.1	Contexte	129
6.2	Démarche expérimentale	131
6.2.1	Fréquences alléliques et écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg	133
6.2.2	Le déséquilibre de liaison	133
6.2.3	Structuration génétique des populations	134
6.2.4	Tests statistiques	135
6.3	Résultats	135
6.3.1	Variabilité génétique des populations d' <i>Ae. albopictus</i>	135
6.3.2	Equilibre de Hardy-Weinberg	135
6.3.3	Déséquilibre de liaison	137

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES

6.3.4	Différenciation génétique	137
6.3.5	Structuration des populations	137
6.3.6	Structure génétique des populations et Compétence vectorielle	141
6.4	Conclusions	143
CHAPTER 7 DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES		147
BIBLIOGRAPHIE		159
ANNEXES		175

Liste des tableaux

1	Principales épidémies de CHIKV (1952-2012)	39
2	Mosquito populations used (article 1).	81
3	Dissemination efficiency of three CHIKV isolates in 22 <i>A. aegypti</i> and 13 <i>A. albopictus</i> populations from 10 American countries at day 7 post-infection. . . .	85
4	Dissemination efficiency of three CHIKV isolates in 22 <i>A. aegypti</i> and 13 <i>A. albopictus</i> populations from 10 American countries at day 10 post-infection. . . .	86
5	Mosquito populations used (article 2).	112
6	Viral populations in the saliva of mosquitoes used.	120
7	Populations d' <i>Ae. albopictus</i> utilisées.	131
8	Loci microsatellites et amorces utilisés.	132
9	Valeurs du coefficient de consanguinité (F_{IS}) pour les 11 loci microsatellites testés chez <i>Ae. albopictus</i>	136
10	Valeurs des indices de fixation F_{ST} pour les 11 loci microsatellites testés chez <i>Ae. albopictus</i>	138
11	Regroupement génétique des populations pour les analyses de compétence vectorielle et valeurs d'efficacité de transmission vis-à-vis de trois isolats de CHIKV.	142
12	Valeurs des indices de fixation F_{ST} pour les clusters génétiques d' <i>Ae. albopictus</i> d'Amérique.	143

Liste des figures

1	Les groupes majeurs d'arthropodes vecteurs d'arboviroses.	12
2	Facteurs influençant la capacité et la compétence vectorielles.	14
3	Interactions génotype/génotype entre le virus de la dengue et <i>Ae. aegypti</i>	16
4	Effet de la population de moustiques, la souche virale et de la température sur l'efficacité de transmission.	17
5	Les différentes étapes du développement du virus dans le moustique vecteur.	19
6	Principales voies de signalisation et d'interférence par ARN à l'origine de la défense antivirale chez le moustique.	20
7	Protocole d'infection expérimentale de moustiques en laboratoire du niveau de sécurité 3.	23
8	Technique de salivation forcée de moustiques.	25
9	Carte non exhaustive des arbovirus présents en Amérique et dans le monde.	26
10	Incidence moyenne de la dengue pour 100 000 habitants par pays.	28
11	Organisation du génome du virus du chikungunya.	35
12	Cycle de réplication du chikungunya virus.	37
13	Relations phylogénétiques entre 80 souches de CHIKV isolées lors des épidémies (1955-2007).	38
14	Distribution géographique du CHIKV et émergences récentes (2004-2011).	41
15	Cinétique et pathogénèse du CHIKV chez l'homme.	42
16	Cycles de transmission du CHIKV.	44
17	Classification taxonomique, femelles adultes et scutum d' <i>Aedes albopictus</i> et <i>Aedes aegypti</i>	48
18	Morphologie schématique des stades pré-imaginaux du genre <i>Aedes</i> et cycle de développement du moustique.	50
19	Morphologie et anatomie interne d'une femelle de moustique	51

20	Distribution géographique mondiale d' <i>Ae. aegypti</i> et <i>Ae. albopictus</i>	53
21	Statut de la campagne d'éradication d' <i>Ae. aegypti</i> vers 1961.	61
22	Phylogénie des <i>Ae. aegypti</i> basée sur des SNPs et le séquençage des gènes nucléaires.	63
23	Histoire de la colonisation des Amériques par <i>Ae. albopictus</i>	65
24	Mosquito populations tested (article 1).	79
25	Dissemination and transmission efficiencies of two CHIKV isolates and two clones of the respective viral isolates in <i>A. albopictus</i> mosquitoes from Paquetá, Rio de Janeiro, Brazil.	83
26	Transmission efficiency of three CHIKV isolates in 35 <i>A. albopictus</i> and <i>A. aegypti</i> populations from 10 American countries at day 7 post-infection.	87
27	Transmission efficiency of CHIKV_0621 and CHIKV_115 isolates in 35 <i>A. aegypti</i> and <i>A. albopictus</i> populations from 10 American countries at day 7 post-infection.	88
28	Viral loads of three CHIKV isolates in saliva of <i>A. albopictus</i> and <i>A. aegypti</i> mosquitoes from 35 populations from the Americas at day 7 postinfection.	90
29	Représentation schématique des régimes de température utilisés pour l'incubation d' <i>Ae. albopictus</i> de France après infection expérimentale avec le CHIKV.	104
30	Transmission efficiencies and viral loads in saliva of <i>Aedes aegypti</i> from Saint-Martin at different days after infection with CHIKV_LR and CHIKV_SM.	116
31	Transmission efficiencies and viral loads of CHIKV_SM in saliva of <i>Ae. aegypti</i> collected in the Caribbean and the continental America.	117
32	Susceptibility of <i>Aedes aegypti</i> compared to <i>Aedes albopictus</i> from the same locality when infected with CHIKV_SM and CHIKV_LR.	118
33	Effect of temperature on CHIKV transmission by <i>Ae. albopictus</i> from Bar-sur-Loup (France).	119
34	Analyse en composantes principales de la distance génétique pour 11 loci microsatellites chez les populations d' <i>Ae. albopictus</i>	139
35	Estimation de la valeur de K et représentation graphique des clusters génétiques (K=4) avec STRUCTURE V 2.3.2, CLUMPP et DISTRICT	140
36	Dendrogramme basé sur la proportion des allèles partagés entre les populations d' <i>Ae. albopictus</i> d'Amérique.	141

37 Efficacité de transmission (moyenne \pm intervalle de confiance 95%) de clusters génétiques d'*Ae. albopictus* d'Amérique vis-à-vis deux souches de CHIKV. 143

38 Contexte épidémiologique à l'égard du CHIKV dans les Amériques. 149

Introduction générale et objectifs

Introduction générale et objectifs

Si dès la plus haute Antiquité, la transmission de certaines maladies de l'animal à l'homme ne faisait aucun doute, l'origine de ces maladies et la façon dont la transmission avait lieu restaient un mystère. Dès le premier siècle, le savant romain Varron soupçonnait « de petits animaux que les yeux ne peuvent voir » d'être à l'origine de diverses « pestilences » pour l'homme et les animaux. Mais ce n'est qu'au XVIII^{ème} siècle que la notion de *contagium vivum* est développée (BLANCOU & MESLIN 2000). Discerner le mode de transmission des agents pathogènes à l'origine de maladies s'est avéré être une tâche bien plus difficile, surtout pour les virus transmis par des arthropodes vecteurs (arbovirus), en raison de la petite taille de ces derniers et de la difficulté de démontrer le rôle du vecteur dans la transmission. En 1881, le scientifique cubain Carlos Juan Finlay a émis une hypothèse sur le rôle du moustique *Aedes aegypti* dans la transmission de la maladie virale « fièvre jaune ». Cette hypothèse a été confirmée plus tard en 1900 par le médecin américain Walter Reed, donnant lieu ainsi à l'identification du premier arbovirus (BLANCOU & MESLIN 2000; SALUZZO 2009). Grâce à cette découverte et au concours ultérieur de nombreux scientifiques, l'arbovirologie, science étudiant les arbovirus et les maladies qu'ils provoquent (arboviroses), s'est considérablement développée au cours du siècle dernier. En effet, seulement six arbovirus étaient connus en 1930, et déjà en 1980, on en avait identifié 504 (SALUZZO & DODET 1997).

Aujourd'hui les maladies à transmission vectorielle et notamment les arboviroses, figurent parmi les principales causes de morbidité et de mortalité chez l'homme et les animaux (WEAVER & REISEN 2010). Parmi elles, plus d'une centaine sont transmises par les moustiques, proclamés comme l'espèce animale la plus mortelle dans le monde (*The deadliest animal in the world*. KAMEROW 2014). En effet, les moustiques transmettent des arboviroses telles que la dengue, qui affecte plus de 100 millions de personnes chaque année (GUZMAN *et al.* 2010), ou encore le chikungunya. Cette dernière, connue aussi comme la « maladie de l'homme courbé » en raison des arthralgies persistantes et incapacitantes qu'elle provoque chez le patient, est causée par le virus du même nom essentiellement transmis par les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. L'intensification des transports transcontinentaux de voyageurs et l'expansion de la distribution géographique de ces deux vecteurs ont favorisé l'émergence et la ré-émergence du virus du chikungunya (CHIKV) dans le monde. En effet, depuis 2004, des épidémies ont été rapportées en Afrique (PEYREFITTE *et al.* 2007), en Asie (ABUBAKAR *et al.* 2007; YERGOLKAR *et*

al. 2006), dans les îles de l'Océan Indien (SCHUFFENECKER *et al.* 2006), et de façon surprenante, en Europe (GRANDADAM *et al.* 2011; REZZA *et al.* 2007). Par ailleurs, cette circulation du virus a été à l'origine de nombreux cas d'importation dans les Amériques (GIBNEY *et al.* 2011), constituant ainsi une menace pour l'ensemble du continent.

Les premiers signalement d'arbovirus dans les Amériques datent du XVI^{ème} siècle (BRYANT *et al.* 2007). Aujourd'hui, des arbovirus tels que la fièvre jaune, le virus du Nil Occidental et d'autres arbovirus causant des encéphalites, ou encore le virus de la dengue (DENV) y sont présents et sont responsables des nombreux cas humains (GUBLER 2002). En effet, 68% des cas de dengue reportés dans le monde par l'Organisation Mondiale de la Santé entre 2000 et 2006 sont en Amérique, et en 30 ans, le nombre de cas a été multiplié par 4,6 (SAN MARTÍN *et al.* 2010). De plus, une recrudescence des formes graves de la dengue, à savoir la dengue hémorragique et le syndrome de choc, a été également constatée sur le continent américain (ARMSTRONG & RICO-HESSE 2001; COLOGNA *et al.* 2005; RICO-HESSE *et al.* 1997). Ceci démontre la situation délicate des Amériques à l'égard du DENV, due notamment à la difficulté de contrôler les taux d'infestation élevés des deux principaux moustiques vecteurs, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. En effet, tous les pays des Amériques excepté le Canada ont reporté la présence d'*Ae. aegypti* (BRACCO *et al.* 2007), et *Ae. albopictus* est aujourd'hui présent dans au moins 19 pays d'Amérique (CARVALHO *et al.* 2014).

Étant donné que le CHIKV partage les mêmes vecteurs que le DENV (*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*), la question de l'émergence du CHIKV dans les Amériques est pertinente. Plusieurs éléments indiquent que l'Amérique est une région propice à l'établissement du CHIKV : (i) la population est immunologiquement naïve pour ce virus, (ii) les deux espèces vectrices du CHIKV sont présentes à de fortes densités, coexistant également dans de nombreux territoires, (iii) les cas importés sont rapportés durant les périodes où l'activité des moustiques est à leur maximum, et (iv) les conditions environnementales dont notamment la température dans ces régions tropicales et subtropicales, sont favorables au développement des moustiques et à la réplication virale dans le vecteur (BHATT *et al.* 2013; GIBNEY *et al.* 2011). Néanmoins, pour analyser finement le risque d'établissement du CHIKV dans les Amériques, une étape essentielle consiste à définir le mécanisme de transmission du virus par les moustiques locaux. La compétence vectorielle, définie comme la capacité du moustique à être infecté par l'agent pathogène et à le transmettre à un nouvel hôte réceptif, est différente pour chaque couple moustique-virus, et peut va-

rier selon les espèces de moustiques considérées ou entre des populations de moustiques appartenant à la même espèce.

Malheureusement, à ce jour les données disponibles décrivant la réceptivité des moustiques des Amériques vis-à-vis du CHIKV sont très parcellaires et concernent uniquement les moustiques des États Unis et des Antilles Françaises (GIROD *et al.* 2011 ; REISKIND *et al.* 2008 ; RICHARDS *et al.* 2010). Dans le reste du continent, cette information est inexistante en raison du manque d'infrastructures nécessaires pour effectuer ce genre d'évaluation ou de l'interdiction de manipulation du CHIKV sur le continent. Cependant, connaître la réceptivité des moustiques locaux vis-à-vis d'un virus donné contribue non seulement à l'identification des « hot spots » à risque épidémique, mais permet aussi de mieux appréhender l'émergence du virus en choisissant une stratégie de lutte antivectorielle plus adéquate et efficace.

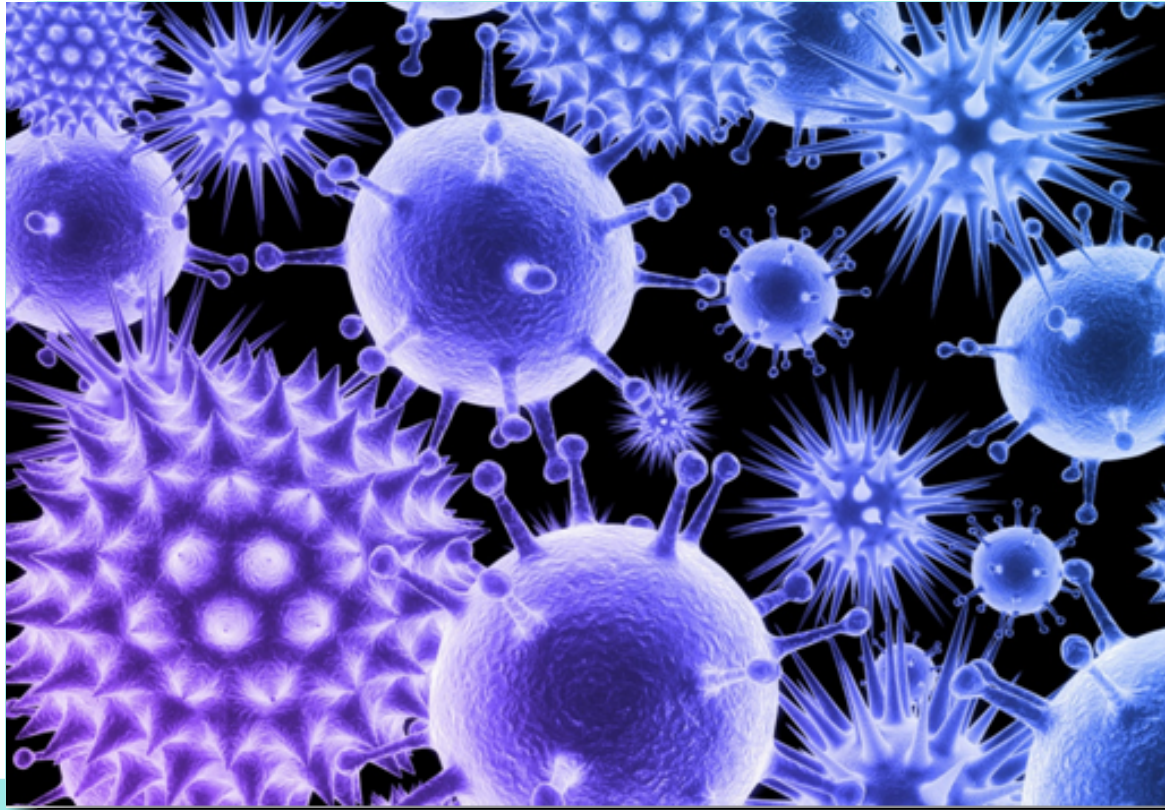
Cette thèse centrée sur la question de l'émergence du CHIKV dans les Amériques, est constituée de deux parties : une synthèse bibliographique et un mémoire expérimental. La synthèse bibliographique est organisée en trois chapitres : (i) le premier porte sur les arbovirus, les facteurs modulant leur transmission vectorielle par les moustiques, et sur le contexte épidémiologique du continent Américain à l'égard des arbovirus, (ii) le deuxième chapitre aborde des généralités concernant le CHIKV et (iii) le troisième chapitre se concentre sur les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, décrit le contexte épidémiologique des Amériques à l'égard des moustiques vecteurs de CHIKV, et rappelle l'état de l'art des connaissances par rapport à la variabilité génétique de ces moustiques sur le continent.

Le mémoire expérimental compte également trois chapitres qui répondent aux objectifs principaux de cette thèse. Le premier chapitre s'inscrit dans le contexte épidémiologique particulier des Amériques avant octobre 2013, date de la première émergence de CHIKV. **L'objectif a été d'évaluer le risque d'émergence du CHIKV sur le continent américain.** Pour cela, nous avons effectué une évaluation de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* issues de 10 pays d'Amérique continentale vis-à-vis de trois souches de CHIKV appartenant à différents génotypes. A l'issue de ce travail, en décembre 2013, les premiers cas du CHIKV ont été détectés sur l'île de Saint-Martin et le virus s'est rapidement répandu dans le reste des Antilles Françaises. Curieusement, la souche à l'origine des cas appartenait au génotype asiatique (LEPARC-GOFFART *et al.* 2014). L'intensification de la circulation du virus dans les Caraïbes menace les régions infestées par les moustiques *Ae. aegypti* et

Ae. albopictus à la fois en Amérique et en Europe. En effet, le nombre de cas de CHIKV importés d'Amérique vers l'Europe a augmenté de manière significative depuis la détection des premiers cas autochtones de CHIKV dans le Nouveau Monde (PATY *et al.* 2014). Ce contexte épidémiologique particulier a motivé la deuxième partie de ma thèse qui vise à **(i) comparer la réceptivité de populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* des Amériques vis-à-vis des souches de CHIKV de génotypes ECSA et asiatique, et (ii) évaluer le risque de transmission locale du CHIKV dans d'autres régions d'Amérique et en Europe.** Pour cela, nous avons étudié la capacité des populations d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* des Amériques et d'Europe (France) à transmettre la souche de CHIKV circulant dans les Caraïbes. Par ailleurs, nous avons examiné la diversité génétique de la population virale présente dans la salive des moustiques infectés et nous avons inclus le paramètre « température » pour l'évaluation de la compétence vectorielle des populations de moustique de régions tempérées (France). Enfin, le troisième chapitre a pour but **l'étude de la variabilité génétique des *Ae. albopictus* d'Amérique et d'analyser son éventuelle relation avec la compétence vectorielle vis-à-vis du CHIKV.** Pour cela, nous avons utilisé des marqueurs microsatellites récemment décrits pour *Ae. albopictus* (MANNI *et al.* 2015). Les résultats des deux premiers chapitres du mémoire expérimental ont fait l'objet de deux publications, l'une parue au « Journal of Virology » et l'autre acceptée dans le journal « Plos Neglected Tropical Diseases ». La publication des résultats présentés dans le chapitre 3 est en cours de préparation.

L'ensemble des résultats obtenus lors de cette thèse sont ensuite discutés dans le contexte des connaissances actuelles en termes d'émergence et épidémiologie du CHIKV en Amérique et dans le monde. Un regard approfondi est porté sur les barrières à la transmission virale chez les moustiques, ainsi que sur les interactions entre le génotype du vecteur, le génotype du virus et des facteurs environnementaux comme la température. Enfin, plusieurs perspectives de suite de ces travaux et de développement de nouveaux sujets sont proposées.

Partie 1 : Synthèse Bibliographique



Chapitre 1

CONTENU DU CHAPITRE

Arbovirus et Transmission vectorielle

- Ce chapitre présente dans un premier temps des généralités sur les arbovirus et les facteurs modulant leur transmission vectorielle par les moustiques, suivies ensuite d'une description des méthodes utilisées pour estimer la compétence vectorielle en laboratoire. Enfin, le contexte épidémiologique des Amériques à l'égard des arbovirus est abordé .

Chapitre 1

Arbovirus et Transmission vectorielle

1.1 Les Arbovirus

Les arbovirus (de l'anglais Arthropod-Borne Virus) représentent un groupe de virus différents d'un point de vue taxonomique mais partageant un cycle de transmission faisant intervenir un hôte vertébré et un arthropode vecteur hématophage. La transmission horizontale nécessitant la piqûre du vecteur pour que le virus soit transmis à l'hôte vertébré est le mécanisme qui permet en premier lieu la maintenance et la circulation de ces virus dans la nature. Deux autres mécanismes de transmission des arbovirus ont été également rapportés : la transmission verticale et la transmission vénérienne. La transmission verticale implique le passage du virus d'une femelle infectée à sa progéniture. La transmission vénérienne, quant à elle, a lieu lorsqu'un mâle infecté (*i.e.* progéniture mâle infectée par transmission verticale) transmet directement le virus à la femelle lors de l'accouplement (WEAVER & REISEN 2010). Hormis quelques rares exceptions, tous les arbovirus appartiennent à cinq familles de virus, à savoir *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, mais tous les virus appartenant à ces familles ne sont pas des arbovirus (GUBLER 2002). Les arbovirus sont tous des virus à ARN à l'exception du virus de la peste porcine africaine de la famille des *Asfarviridae* qui est un virus à ADN. Avec un taux d'erreur variant entre 10^{-3} et 10^{-5} substitutions par nucléotide, une population virale accumule environ une mutation par génome. Une population virale ne peut donc pas être homogène sur le plan moléculaire et va de ce fait constituer une quasi-espèce (DOMINGO 1992). La réplication virale est supposée être différente dans un hôte vertébré et dans un hôte invertébré. Le passage par un hôte suggère une sélection spécifique fixée par ce dernier. Ainsi, l'alternance d'hôtes imposerait une sélection purificatrice où les variants porteurs de mutations bénéfiques pour un hôte et délétères pour l'autre seront éliminées de la population virale. L'alternance d'hôtes tendra à limiter le taux d'évolution

en imposant un compromis adaptatif (STRAUSS & STRAUSS 1994).

Parmi les arthropodes vecteurs, on trouve des insectes comme les moustiques, les phlébotomes et les culicoïdes, mais aussi des arachnides tels que les tiques (Figure 1.1). Les moustiques sont les vecteurs les plus importants d'un point de vue médical en raison du grand nombre d'arbovirus qu'ils transmettent.

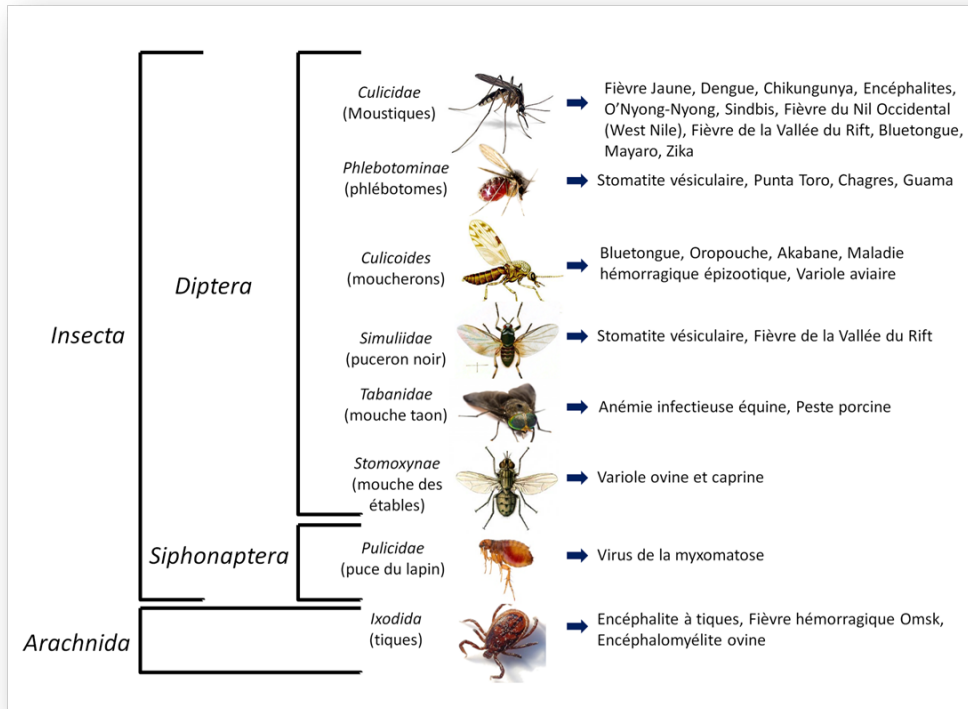


FIGURE 1 – Les groupes majeurs d'arthropodes vecteurs d'arboviroses. Adapté de MELLOR (2000).

Les arbovirus constituent un problème de santé publique en raison des différentes maladies ou arboviroses qu'ils provoquent. Ces arboviroses, différentes quant à leur symptomatologie et épidémiologie, sont responsables des pathologies parfois sévères chez l'homme et les animaux (*i.e.* fièvres hémorragiques), et peuvent avoir des conséquences sanitaires et économiques importantes. Parmi les 534 arbovirus connus, environ 134 sont pathogènes pour l'homme. Comme la plupart de ses vecteurs, les arbovirus sont essentiellement présents dans la zone intertropicale (GUBLER 2002).

1.2 La capacité et la compétence vectorielles

1.2.1 Définitions

La transmission vectorielle d'un agent pathogène est un phénomène complexe fortement dépendant des relations qui lient le pathogène, le vecteur et son hôte vertébré. Les relations entre ces trois composants sont également influencées par l'environnement (FAILLOUX *et al.* 1999). La capacité vectorielle, définie comme l'efficacité du vecteur à transmettre un agent pathogène en conditions naturelles, est un élément indispensable pour caractériser la dynamique d'un système vectoriel donnée. Grâce à une modélisation mathématique proposée par GARRETT-JONES & GRAB (1964), la quantification de la capacité vectorielle (C) est possible en utilisant la formule suivante :

$$C = \frac{ma^2bp^n}{-\ln p} \quad (1.1)$$

Où :

- m → la densité des vecteurs par rapport à l'hôte vertébré
- a → la probabilité journalière qu'un vecteur pique l'hôte
- b → la proportion de vecteurs infectés
- p → la probabilité journalière de survie du vecteur
- n → la durée de la période d'incubation extrinsèque
- $1/-\ln p$ → la probabilité de survie du vecteur au-delà de la période d'incubation extrinsèque

Cette équation mathématique démontre que la capacité vectorielle dépend à la fois (i) de facteurs extrinsèques tels que la disponibilité de l'hôte vertébré, de son état immunitaire, de la température et la pluviométrie, de l'abondance de vecteurs et (ii) des facteurs intrinsèques comme la longévité du vecteur, ses préférences trophiques, la fréquence des repas sanguins et enfin la compétence vectorielle (Figure 2). La compétence vectorielle est définie comme l'aptitude intrinsèque d'un arthropode vecteur à ingérer, assurer la répllication et la transmission de l'agent pathogène à un vertébré lors d'une piqûre (HARDY *et al.* 1983). Elle est dépendante de fac-

teurs intrinsèques d'origine génétique qui contrôlent la réceptivité du vecteur pour l'agent pathogène, et de facteurs extrinsèques comme la dose virale ingérée par le vecteur et la température d'incubation des vecteurs après ingestion de l'agent pathogène.



FIGURE 2 – Facteurs influençant la capacité et la compétence vectorielles.

L'étude de la réceptivité des moustiques vis-à-vis de différents arbovirus a montré à plusieurs reprises que la relation arbovirus/vecteur est très spécifique. En effet, des espèces différentes et des populations d'une même espèce de moustiques ne présentent pas la même compétence vectorielle vis-à-vis d'un arbovirus donné (WEAVER & BARRETT 2004). Par exemple, les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* sont les vecteurs principaux du chikungunya (CHIKV) alors que *Culex pipiens* est réfractaire à l'infection avec ce virus qui ne dissémine pas au-delà du tube digestif chez ces moustiques (TALBALAGHI *et al.* 2010; VAZEILLE *et al.* 2008). Un des exemples le plus curieux est celui du virus O'nyong nyong (ONNV), un des rares arbovirus d'importance médicale pouvant être transmis par des moustiques du genre *Anopheles* (BRAULT *et al.* 2004). En effet, les anophèles sont connus pour leur rôle dans la transmission du parasite responsable du paludisme des primates, mais ils sont réfractaires à une grande partie des arbovirus d'importance médicale. Il est important de noter que le ONNV est phylogénétiquement très proche du CHIKV, pourtant les anophèles ne peuvent pas transmettre ce dernier *Alphavirus* (VANLANDINGHAM *et al.* 2005, 2006). Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence des différences de réceptivité entre des populations de moustiques appartenant à une même espèce vis-à-vis d'un arbovirus donné : CHIKV (TESH *et al.* 1976), le vi-

rus de la fièvre jaune (YFV) (TABACHNICK *et al.* 1985), le virus de la dengue (DENV) (GUBLER & ROSEN 1976), et le virus West-Nile (WNV) (CIOTA & KRAMER 2013).

Le génotype viral joue également un rôle important dans la compétence vectorielle. En effet, il a été démontré que certaines populations d'*Ae. aegypti* sont plus réceptives aux souches de DENV-2 originaires d'Asie du Sud-Est qu'aux souches américaines (ARMSTRONG & RICOHESSE 2001). Des différences de compétence vectorielle ont été également mises en évidence pour *Ae. albopictus* de Ta Prohm (Cambodge) vis-à-vis de souches de DENV-2 provenant des Seychelles, du Cambodge et de Thaïlande (VAZEILLE *et al.* 2003). Un des exemples le plus surprenant est celui de l'adaptation du CHIKV au vecteur *Ae. albopictus* via un nouveau variant viral détecté lors de l'épidémie de la Réunion en 2005-2006 (SCHUFFENECKER *et al.* 2006). Un seul changement d'acides aminés (alanine par valine) à la position 226 de la protéine d'enveloppe viral E1 du CHIKV a favorisé la dissémination, la transmission et donc la compétence vectorielle du variant viral E1-226V par rapport au variant E1-226A chez *Ae. albopictus* (TSETSARKIN *et al.* 2007; VAZEILLE *et al.* 2007). Depuis l'épidémie de La Réunion, *Ae. albopictus* a été impliqué comme vecteur principal dans de nombreuses épidémies de CHIKV (KUMAR *et al.* 2011; REZZA *et al.* 2007). Cet exemple illustre l'importance de la contribution du génotype viral dans la compétence vectorielle et comment un changement unique dans le génome du virus peut entraîner des conséquences dans la transmission virale par le vecteur.

Par ailleurs, plusieurs études ont révélé que la structure génétique des populations de moustiques pouvait conduire aussi à une structuration spatiale de la population virale (CHEVILLON & FAILLOUX 2003; FANSIRI *et al.* 2013), suggérant ainsi que la compétence vectorielle n'était pas seulement la résultante des effets additifs dus aux génotypes du virus et du vecteur, mais dépendait également des interactions entre leurs deux génotypes (Figure 3) (LAMBRECHTS *et al.* 2009). Ainsi, la spécificité de la compétence vectorielle tient compte du génotype du vecteur, du génotype de l'agent pathogène et de leurs interactions. Ces interactions, aussi appelées interactions G x G, donnent lieu à une compétence vectorielle unique (LAMBRECHTS *et al.* 2009). Les mécanismes génétiques qui sous-tendent les différences de réceptivité à l'infection chez les moustiques restent très peu connus. Cependant, plusieurs études ont suggéré que la réceptivité des *Ae. aegypti* vis-à-vis du DENV serait sous le contrôle de plusieurs QTL (Quantitative Trait Loci) localisés sur les chromosomes II et III de ce moustique (BOSIO *et al.* 2000; FANSIRI *et al.* 2013).

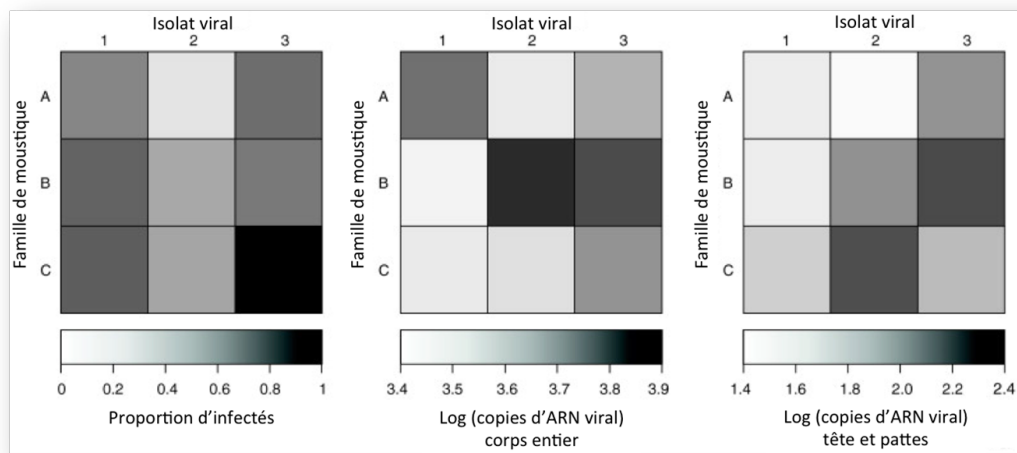


FIGURE 3 – Interactions génotype/génotype entre le virus de la dengue et *Ae. aegypti*. Les matrices représentent des mesures expérimentales de trois indices de la compétence vectorielle pour chacune des combinaisons possibles entre les trois familles de moustiques et les trois isolats de virus. Les valeurs phénotypiques sont représentées par une échelle de gris dont les valeurs sont indiquées ci-dessus. D'après LAMBRECHTS (2011).

La flore bactérienne du moustique peut également moduler la compétence vectorielle. En effet, il a été démontré que la réplication virale du CHIKV est plus faible chez les femelles *Ae. albopictus* naturellement infectées par la bactérie endosymbionte *Wolbachia* sp. en comparaison à celles traitées aux antibiotiques et donc dépourvues de cette bactérie (MOUSSON *et al.* 2010; ZOUACHE *et al.* 2012). L'exemple le plus saisissant est celui d'*Aedes aegypti*. Cette espèce est naturellement dépourvue de *Wolbachia*. Deux lignées stables d'*Ae. aegypti* transfectées par *Wolbachia* ont été obtenues, l'une infectée par la souche wMelPop de *Drosophila melanogaster* (MCMENIMAN *et al.* 2009) et l'autre infectée par la souche wAlbB d'*Ae. albopictus* (XI *et al.* 2005). La présence de ces souches bactériennes a eu pour effet, d'une part la diminution de la durée de vie d'*Ae. aegypti* à l'état adulte de 61 à 27 jours (à 25°C) (MCMENIMAN *et al.* 2009) ainsi que l'inhibition du développement, la réplication et la dissémination des arbovirus CHIKV et DENV, ou encore des parasites tels que *Plasmodium gallinaceum* ingérés par les moustiques lors d'infections expérimentales (MOREIRA *et al.* 2009).

Comme exposé précédemment, la compétence vectorielle dépend également des facteurs extrinsèques tels que la température. La température peut notamment agir sur les facteurs intrinsèques en affectant la physiologie du vecteur, et par voie de conséquence, la transmission de l'agent pathogène. En effet, plusieurs études ont démontré qu'une température élevée conduit à une augmentation du taux d'infection et à une diminution de la période d'incubation extrinsèque

(PIE). Cela a été mis en évidence pour le DENV (WATTS *et al.* 1987), le RVFV (BRUBAKER & TURELL 1998), le WNV (DOHM & TURELL 2001) et le CHIKV (MOURYA *et al.* 2004). Plus récemment, il a été démontré que certaines populations d'*Ae. albopictus* transmettent mieux certaines souches de CHIKV à 20°C qu'à 28°C, alors que ce n'est pas le cas pour d'autres populations d'*Ae. albopictus* infectées avec les mêmes souches virales (Figure 4). Ceci souligne que la compétence vectorielle et notamment la capacité de transmission des agents pathogènes, dépend de l'interaction tripartite entre le génotype moustique, celui du virus et la température. Cette interaction est aussi connue comme interaction G x G x E (génotype x génotype x environnement) (ZOUACHE *et al.* 2014).

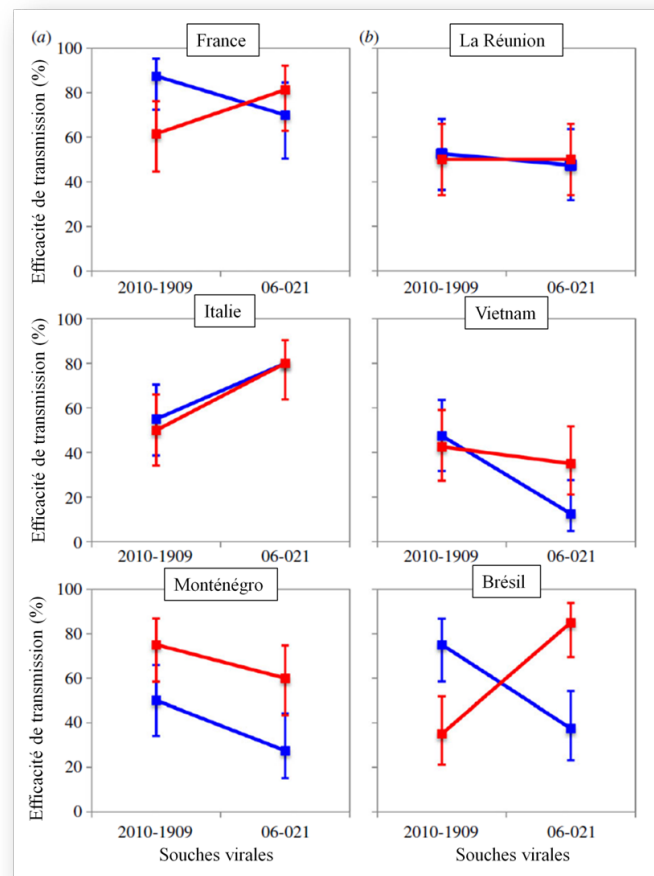


FIGURE 4 – Effet de la population de moustiques, la souche virale et de la température sur l'efficacité de transmission (TE). TE correspond à la proportion de femelles présentant la salive infectée au 6ème jour après exposition à un repas de sang contenant du CHIKV. Les panneaux représentent chaque population d'*Ae. albopictus* analysée : (a) des régions tempérées ; (b) des régions tropicales. Dans chaque panneau, la TE moyenne est déterminé pour deux souches virales (indiqué sur l'axe des abscisses) et deux régimes de température (ligne bleue : 20°C ; ligne rouge : 28°C). Les barres verticales représentent les intervalles de confiance 95%. Adapté de ZOUACHE *et al.* (2014).

1.2.2 Transmission des arbovirus par les moustiques

La transmission d'un arbovirus par le moustique vecteur se déroule en plusieurs étapes (HARDY *et al.* 1983; MELLOR 2000) (Figure 5). Tout d'abord, le moustique s'infecte en récupérant le virus par succion au cours d'un repas sanguin sur un hôte vertébré virémique. Le virus présent dans le bol alimentaire se retrouve alors dans l'intestin moyen du vecteur. À ce stade, le virus doit pénétrer dans les cellules épithéliales de l'intestin avant qu'il ne soit altéré par les enzymes digestives ou que la membrane péritrophique, une structure à base de chitine dont la synthèse est déclenchée par la prise du repas de sang, ne devienne imperméable et ne sépare le bol alimentaire de l'épithélium digestif. Grâce à une reconnaissance spécifique par interaction d'une protéine virale avec un récepteur présent à la surface de l'épithélium digestif, le virus pénètre dans la cellule épithéliale par endocytose et s'y réplique. À ce jour, plusieurs protéines pouvant jouer le rôle de récepteurs ont été identifiées pour le DENV, Sindbis (SINV) et le virus de l'encéphalite équine de Venezuela (VEEV). Néanmoins, la nature des récepteurs d'une grande partie des arbovirus d'intérêt médical dont le CHIKV reste inconnue (SOLIGNAT *et al.* 2009). Après réplication, les virions néoformés doivent franchir la lame basale qui soutient l'épithélium digestif pour être ensuite libérés dans la cavité générale de l'insecte ou hémocèle où circule l'hémolymphe (liquide circulatoire des arthropodes).

Dans l'hémocèle, le virus est immergé dans un milieu riche en nutriments qui contient 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 les corps gras. Les hémocytes interviennent dans la phagocytose et l'encapsulation des parasites et bactéries; les granulocytes dans la phagocytose, les oenocytoides dans l'encapsulation (HILLYER 2010). Néanmoins, aucune réponse antivirale exercée par les hémocytes n'a été démontrée à ce jour. Parmi les principaux mécanismes de défense du moustique face à une infection virale, les voies de signalisation Toll, JAK/STAT, Imd, ainsi que la réponse par ARN interférence sont suggérées (Figure 6A). Les trois premières voies sont activées par la reconnaissance des agents pathogènes au niveau des 'Pattern Recognition Receptors' et activent une cascade de kinases et/ou protéases, dont Toll, JAK et Imd (HILLYER 2010; SANDERS *et al.* 2005; XI *et al.* 2008). Ces derniers induisent la translocation de facteurs de transcription dans le noyau (respectivement Rel 1, STAT et Rel 2) et l'expression d'ef-

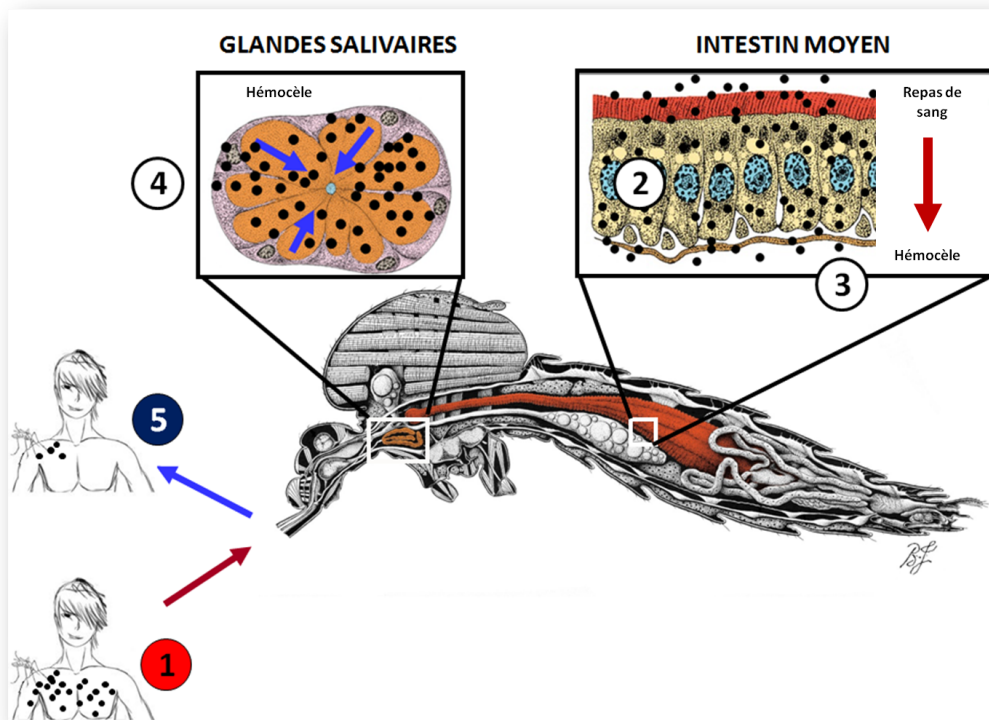


FIGURE 5 – Les différentes étapes du développement du virus dans le moustique vecteur. (1) Ingestion d'un repas sanguin infectieux; (2) Le virus infecte et se réplique dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen; (3) Les virions bourgeonnent et sont libérés dans l'hémocèle; (4) Le virus infecte d'autres organes dont les glandes salivaires; (5) Le virus est sécrété *via* la salive et un nouvel hôte vertébré peut ainsi être infecté.

fecteurs antimicrobiens. La voie Toll semble préférentiellement activée lors d'infections à flavivirus alors que la voie Imd semble plus spécifique des alphavirus.

La voie interférence par ARN (ARNi), est quant à elle activée par la présence dans le cytoplasme de la cellule hôte d'ARN simple ou double brins de tailles variables, qui seront clivés en petites molécules d'ARN de 13 à 30 nucléotides. Il faut noter que le cycle de répllication des arbovirus possédant un génome à ARN fait intervenir des intermédiaires de répllication double-brins (ARNdb). Ainsi, l'ARN matriciel reconnu peut être d'origine endogène ou exogène. Chaque classe de « small RNA » (smRNA) sera prise en charge par des complexes ribonucléoprotéiques particuliers (RNP), qui réguleront de façon transcriptionnelle ou post-transcriptionnelle l'expression d'un transcrit de séquence complémentaire au smRNA. Jusqu'à présent, trois voies de l'interférence par l'ARN ont été identifiées : la voie des siRNA (small interfering RNA), la voie des miRNA (micro RNA) et la voie des piRNA (PIWI-interacting RNA) (Figure 6B). Au cours de la voie siRNA exogène, les ARNdb issus de la répllication virale sont clivés par Dicer-2

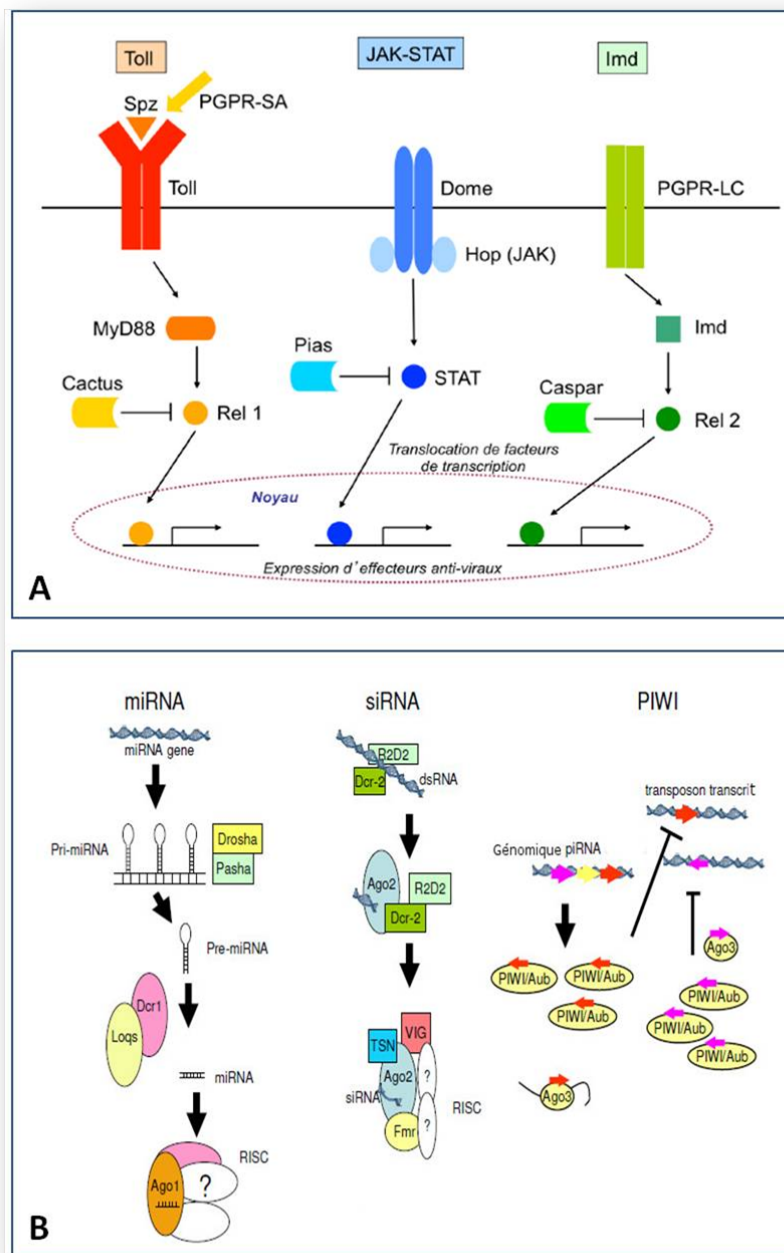


FIGURE 6 – Principales voies de signalisation (A) et d'interférence par ARN (B) à l'origine de la défense antivirale chez le moustique. Adapté de CAMPBELL *et al.* (2008).

(Dcr-2) en v-siRNA (virus derived siRNA) de 21 nucléotides. Des hétérodimères Dcr-2/R2D2 se forment et prennent en charge un seul brin des siRNA dans le complexe multi-protéique RISC (RNA-Induced Silencing Complex). L'activation de ce complexe entraîne la dégradation des cibles spécifiques des séquences d'ARN grâce à la protéine Argonaute-2 (Ago-2). Ainsi, la voie des siRNA est déterminante pour contrôler la réplique des arbovirus. La voie des miRNA nécessite l'intervention de la protéine Dcr1 qui va produire des ARN d'une taille va-

riant entre 22 et 23 nucléotides. Les miRNA dérivent de la partie non-codante du génome de la cellule, et sont pris en charge par Dcr1 et les protéines Loqs (Loquacious) ou par R3D1 associées à un complexe RNP. La protéine Ago1 va permettre le passage des miRNA sous la forme simple brin intégré dans le complexe miRNP, qui assure la fixation du miRNA sur le transcrit cible afin d'inhiber sa traduction. La troisième voie, faisant appel aux piRNA, est indépendante des protéines Dicer et reconnaît des ARN simple brin qui sont clivés en piRNA de 24 à 30 nucléotides par des protéines de la famille Piwi. Cette voie des piRNA est impliquée dans le contrôle de la réplication des alphavirus (MORAZZANI *et al.* 2012 ; VODOVAR *et al.* 2012) et des flavivirus (HESS *et al.* 2011) chez les moustiques. Au bilan, l'interférence ARN joue un rôle prépondérant chez le moustique dans la lutte contre l'infection virale même si son efficacité est limitée. Cette réponse antivirale n'élimine pas complètement le virus qui continue à se disséminer dans l'insecte.

En effet, une fois que le virus a atteint le système circulatoire, il peut se disséminer dans différents tissus et organes comme le tissu musculaire, le tissu nerveux, le corps gras, les organes reproducteurs et les glandes salivaires, le tropisme cellulaire du virus étant dépendant du couple arbovirus/ moustique vecteur. Par exemple, le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV), le WNV et le SINV ont un tropisme marqué vers les tissus musculaires viscéraux du moustique (BOWERS *et al.* 1995 ; GIRARD *et al.* 2004 ; ROMOSER *et al.* 1992), alors qu'il est rare d'y trouver le DENV (SALAZAR *et al.* 2007). Quant au CHIKV, sa dissémination dans les différents tissus peut être rapide et homogène (VAZEILLE *et al.* 2007). La présence du virus dans les ovaires et les œufs peut favoriser sa transmission verticale (des femelles infectées aux œufs). Ce phénomène plutôt rare permet à certains arbovirus (*e.g.* *Phlebovirus*, *Flavivirus*) de persister en absence d'hôtes réceptifs et pendant les périodes sèches ou froides, où l'absence ou la faible densité de moustiques défavorise la transmission horizontale (LEQUIME & LAMBRECHTS 2014 ; WATTS & ELDRIDGE 1975). Le virus présent dans les glandes salivaires assure la transmission horizontale à un nouvel hôte vertébré par la salive émise lors de la piqûre de la femelle (HARDY *et al.* 1983 ; WEAVER & BARRETT 2004). Ainsi, le tube digestif du moustique et les glandes salivaires constituent les deux principales barrières physiques à la transmission du virus par un moustique (BEERNTSEN *et al.* 2000). La première pouvant bloquer l'arrivée du virus dans l'hémocèle et sa dissémination, la deuxième pouvant empêcher la libération du virus avec la salive et par conséquent, sa transmission à un nouvel hôte vertébré.

L'infection virale est en général persistante chez la femelle capable d'infecter un hôte vertébré après chaque piquêre. Ainsi, une fois infecté, le moustique pourra transmettre le virus pendant toute sa vie. De plus, certains moustiques comme les *Aedes aegypti* effectuent des repas sanguins multiples au cours du même cycle gonotrophique (temps s'écoulant entre le repas de sang et la ponte), augmentant ainsi la probabilité et fréquence de la transmission horizontale des virus (HARRINGTON *et al.* 2014; SCOTT & MORRISON 2014). Le temps qui s'écoule entre l'ingestion du repas infectieux et le moment où le moustique devient apte à transmettre le virus présent dans la salive, correspond à la période d'incubation extrinsèque (PIE). La PIE varie en fonction de la dose du virus ingérée par le moustique, du génotype viral et du vecteur, et enfin des facteurs externes tels que la nutrition des larves et la température (HARDY *et al.* 1983; XIAO *et al.* 2014). Par exemple, il a été expérimentalement démontré que la PIE du CHIKV est généralement de 2-3 jours chez les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (DUBRULLE *et al.* 2009; VEGA-RUA *et al.* 2013), tandis que celle du DENV est généralement de 4-7 jours chez les mêmes vecteurs (SALAZAR *et al.* 2007). Pour une transmission effective d'un agent pathogène, la PIE doit être plus courte que la durée de vie du vecteur. Ainsi, la PIE est un paramètre clé de la transmission vectorielle.

1.2.3 Évaluation de la compétence vectorielle

Comme précédemment exposé, la détermination de la compétence vectorielle est indispensable pour évaluer finement le potentiel de transmission des arbovirus par les vecteurs. Étant donné que la compétence vectorielle est « unique » et caractéristique à chaque combinaison moustique/virus (LAMBRECHTS 2011; LAMBRECHTS *et al.* 2005), définir les couples moustique/virus les plus performants est essentiel pour l'analyse du risque épidémiologique. En effet, l'évaluation de la compétence vectorielle permet de prédire les risques épidémiologiques que représente l'introduction d'un arbovirus dans un environnement où les populations de moustiques locaux peuvent présenter une bonne réceptivité à l'infection virale. Ceci contribue à identifier les localités ayant besoin d'un renforcement de la surveillance épidémiologique (*i.e.* control et isolement des cas importés). En même temps, l'évaluation de la compétence vectorielle permet de connaître la PIE d'un arbovirus donné chez le vecteur d'intérêt, ce qui apporte des éléments indispensables pour la mise en place d'une lutte antivectorielle adaptée et le conditionnement de la stratégie de surveillance épidémiologique.

L'évaluation de la compétence vectorielle est effectuée en laboratoire en utilisant des infections expérimentales. L'infection est réalisée suivant une adaptation du protocole décrit par VAZEILLE *et al.* (2007). Tout d'abord, des milliers de moustiques de l'espèce et de la population d'intérêt sont élevés sous des conditions contrôlées de nutriments, température, humidité et photopériode, ce qui permet d'avoir une homogénéité dans la taille et un bon état des individus. Pour chaque population de moustiques, des lots de 60 femelles âgées de 7 jours sont isolés dans des boîtes à fond amovible. Les femelles sont mises à jeun 24h avant l'infection pour optimiser le taux de gorgement lors du repas artificiel qui a lieu dans un laboratoire de sécurité de niveau 3 (L3). Le jour de l'infection expérimentale, un mélange infectieux contenant du sang de lapin et une suspension virale de titre connu est proposé aux femelles à l'aide de gorgeurs chauffants qui maintiennent la température à 37°C, et des capsules recouvertes d'une peau de poulet dégraissée ou d'intestin du porc (système Hemotek®). Au terme du repas, les femelles sont anesthésiées sur glace, et celles qui sont pleinement gorgées sont conservées et transférées dans des boîtes en carton (Figure 7). Un coton imbibé d'une solution d'eau sucrée à 10% est fourni pour l'alimentation des femelles pendant la durée de l'incubation post-infection (pi).

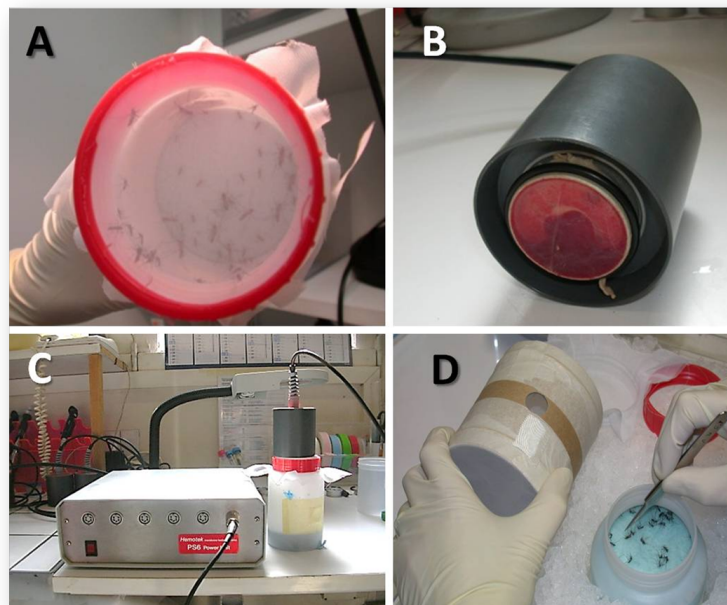


FIGURE 7 – Protocole d'infection expérimentale de moustiques en laboratoire du niveau de sécurité 3. (A) Boîte à fond amovible contenant les femelles de moustique. (B et C) Dispositif Hemotek® de gorgement artificiel. (C) Transfert des femelles gorgées dans des boîtes en carton.

Les différentes étapes du développement de l'arbovirus dans le vecteur sont prises en compte

pour l'évaluation de la compétence vectorielle. Dans nos expériences, nous évaluons principalement les paramètres suivants :

- **Taux d'infection** : correspondant à la proportion de femelles présentant le tube digestif infecté parmi les femelles analysées ayant survécu.
- **Taux d'infection disséminée** : correspondant à la proportion des femelles avec ailes/pattes ou tête infectées parmi les femelles ayant le tube digestif infecté. Ceci permet d'évaluer la capacité du virus à franchir la barrière du tube digestif du moustique et de disséminer dans l'hémocèle.
- **Efficacité de dissémination** : correspondant à la proportion des femelles avec ailes/pattes ou tête infectées parmi les femelles analysées ayant survécu.
- **Taux de transmission** : correspondant à la proportion des femelles présentant la salive infectée parmi les femelles ayant assuré la dissémination virale (femelles avec la tête, les pattes ou les ailes infectées).
- **Efficacité de transmission** : correspondant à la proportion de femelles présentant la salive infectée parmi les femelles analysées ayant survécu.

Ainsi, le taux d'infection disséminée et l'efficacité de dissémination permettent d'évaluer la capacité du virus à franchir la barrière du tube digestif du moustique et de disséminer au-delà, tandis que le taux et l'efficacité de transmission indiquent que le virus a franchi l'ultime barrière des glandes salivaires pour être libéré dans la salive du moustique. Par conséquent, le taux et l'efficacité de transmission sont les principaux paramètres qui permettent l'évaluation du risque épidémique associé à la transmission d'un virus donné par des moustiques locaux (transmission autochtone).

Pour estimer le taux et l'efficacité de transmission, la salive des moustiques doit être récupérée. La technique de collecte de salive pour déterminer la présence du virus est décrite depuis 1966 (HURLBUT 1966). Plusieurs méthodes ont été par la suite développées, notamment l'utilisation de tubes capillaires remplis de sang défibriné (AITKEN 1977), d'huile d'immersion (COLTON *et al.* 2005), d'huile minérale ou de sérum de veau fœtal (SMITH *et al.* 2005). Dans notre laboratoire, la collecte de salive est réalisée suivant une adaptation du protocole décrit par DUBRULLE *et al.* (2009). Il s'agit d'une technique de salivation forcée : après avoir ôté les ailes et les pâtes des femelles, le proboscis de chaque femelle est introduit dans un cône de 20 μ L contenant du sérum de veau fœtal (SVF) (Figure 8). Après 30-45 min, le contenu du cône

est transféré dans un tube Eppendorf contenant du milieu L-15 (Leibovitz). Lorsque tous les échantillons ont été générés, leur statut infectieux ainsi que le nombre des particules virales infectieuses est déterminé par titrage viral sur des cellules d'insectes (*i.e.* C6/36) ou de mammifère (*i.e.* Vero).



FIGURE 8 – Technique de salivation forcée de moustiques. Les cônes de pipette contiennent 5 μ L de sérum de veau.

1.3 Les arbovirus en Amérique

Des nombreux arbovirus transmis par les moustiques circulent sur l'ensemble du continent Américain (Figure 9). Dans ce chapitre, nous nous intéresserons notamment au virus de la fièvre jaune, au virus West-Nile, à d'autres arbovirus causant des encéphalites et enfin, au virus de la dengue.

Les premiers signalement d'arbovirus dans les Amériques datent du XVI^{ème} siècle (BRYANT *et al.* 2007). Le virus de la fièvre jaune (YFV), arbovirus probablement introduit dans le Nouveau Monde lors du commerce triangulaire, décimait chaque année des milliers des personnes en Amérique du Nord, en Amérique du Sud et dans la Caraïbe (GUBLER 2002). La première épidémie confirmée de fièvre jaune a eu lieu au Yucatan en 1648 (cité dans POWELL & TABACHNICK (2013)). Dès le XVII^{ème} siècle, on recensa de nombreuses épidémies à New York (1668), à Philadelphie, Charleston (1690) ou encore à la Nouvelle Orléans où la fièvre jaune fut à l'origine de 11000 décès dans cette ville peuplée de 44000 habitants à l'époque

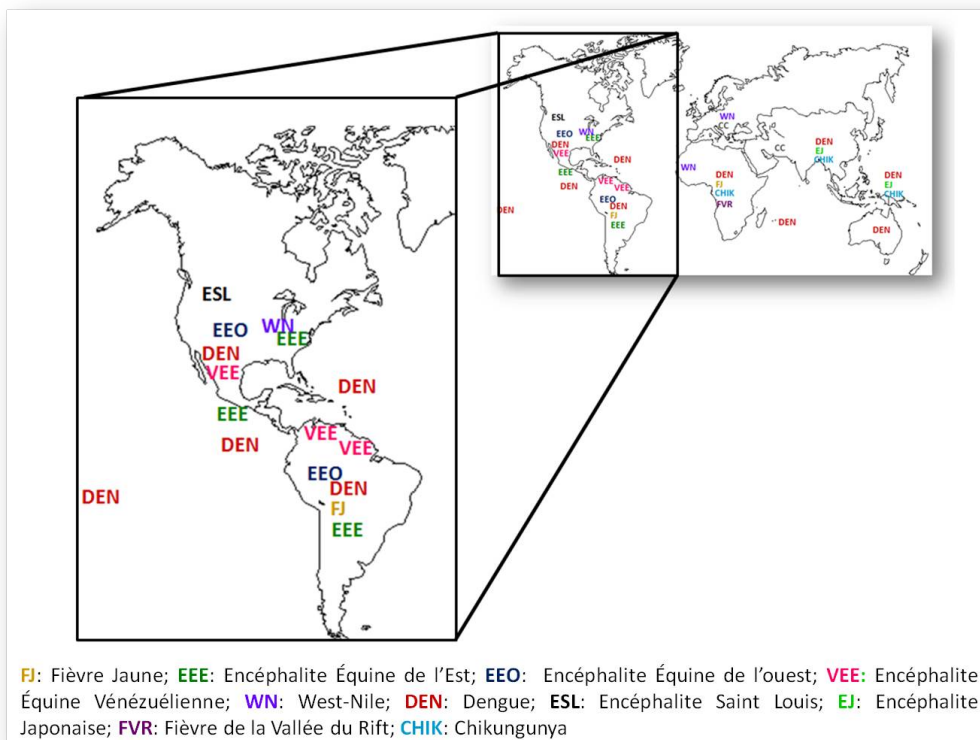


FIGURE 9 – Carte non exhaustive des arbovirus présents en Amérique et dans le monde. Adapté de GUBLER (2002).

(1793). Avec l'urbanisation et le développement des grandes villes, ces épidémies s'amplifièrent, et déjà vers la fin du XIX^{ème} siècle la fièvre jaune était considérée comme le fléau du continent américain ou la peste du Nouveau Monde (SALUZZO 2009). La campagne d'éradication du moustique vecteur *Ae. aegypti* menée dans les années 50, ainsi que le développement d'un vaccin, ont contribué à éliminer les épidémies urbaines majeures provoquées par ce virus. Cependant, le virus circule toujours en Amérique dans des cycles enzootiques impliquant des moustiques selvatiques tel que *Hemagogus janthinomys* et des primates non-humains. Le réservoir sauvage est donc omniprésent et fait craindre le risque d'une urbanisation de la fièvre jaune comme en témoigne l'épidémie urbaine de fièvre jaune qui a eu lieu au Paraguay en 2008 (WEAVER & REISEN 2010).

En Amérique, trois virus principaux sont à l'origine des encéphalites : le virus de l'encéphalite équine de l'est (EEEV) découvert en 1831, le virus de l'encéphalite équine de l'ouest (EEOV) découvert en 1964 et enfin, le virus de l'encéphalite équine du Venezuela (VEEV) découvert en 1935. Les encéphalites sont des arboviroses graves qui atteignent le système nerveux central. Par conséquent, elles sont responsables des taux de mortalité les plus élevés pouvant aller

jusqu'à 50-75% pour l'EEEV (WEAVER & REISEN 2010). Actuellement les encéphalites sont largement répandues dans les Amériques : le EEEV est retrouvé en Amérique du Nord, en Amérique Centrale, en Amérique du Sud, dans la Caraïbe et dans la région côtière de l'Est du Canada ; le EEOV est répandu en Amérique du Nord et en Amérique du Sud, mais il est absent en Amérique Centrale. Enfin, le VEEV est présent du Nord de l'Argentine à la Floride avec une très forte prévalence dans le Nord de l'Amérique du Sud. Les hôtes amplificateurs de ces virus sont généralement les équidés (VEEV) et les oiseaux (EEEV, EEOV), et plusieurs genres de moustiques (*i.e.* *Aedes*, *Culex*, *Psorophora*, *Ochlerotatus*) peuvent agir comme vecteurs (WEAVER & REISEN 2010).

Un autre arbovirus menaçant les Amériques est le virus de la fièvre du Nil Occidental ou West Nile (WNV). Ce virus a été introduit à New York (États-Unis) en 1999 probablement à partir d'Israël, comme en témoigne la similarité de séquences observée entre le génome du virus introduit aux États-Unis et celui qui a sévit en Israël en 1998. Quant à la souche israélienne, elle semble y avoir été introduite par l'intermédiaire des oiseaux migrateurs venant d'Afrique. Après son introduction aux États-Unis, le WNV a élargi son aire de distribution en atteignant l'ensemble des États-Unis ainsi qu'une grande partie du continent américain, du Canada jusqu'en Argentine. Une des hypothèses expliquant cette expansion rapide du virus repose sur un remplacement de la souche d'origine par une autre souche (WN02) possédant une mutation dans une protéine de l'enveloppe virale. Des études ultérieures ont démontré que cette mutation réduit la durée de la période d'incubation extrinsèque chez les moustiques vecteurs du genre *Culex*, cet effet étant plus important à hautes températures. Dans la Caraïbe, la circulation du WNV a été mise en évidence dans plusieurs territoires (*i.e.* Cuba, Porto Rico, la Guadeloupe) par des sérologies effectuées chez des équidés et des oiseaux (CIOTA & KRAMER 2013).

La dengue est une arbovirose ancienne qui a été introduite dans les Amériques *via* la navigation et l'augmentation des échanges commerciaux entre les XVIII^{ème} et XIX^{ème} siècles (GUBLER 1998). Les premières épidémies de syndromes cliniques apparentés à la dengue ont été signalées en 1635 en Martinique et Guadeloupe, et en 1699 au Panama (BRATHWAITE DICK *et al.* 2012). Vers le XX^{ème} siècle, les épidémies causées par le virus de la dengue (DENV) étaient de grande ampleur et avaient lieu périodiquement (GUBLER 2002). Le développement du transport aérien a conduit à la ré-colonisation et réintroduction du moustique *Ae. aegypti* dans de nombreux territoires des Amériques suite à l'éradication des années 50, entraînant ainsi l'émergence de nou-

velles épidémies de DENV au Brésil (SCHATZMAYR 2000), en Bolivie, au Paraguay, au Chili, en Argentine (VEZZANI & CARBAJO 2008), à Cuba, Porto Rico, Guyane Française, et d'autres localités (URDANETA-MARQUEZ & FAILLOUX 2011). Lors de ces épidémies, les quatre sérotypes décrits pour le DENV (DENV-1 à DENV-4) ont envahi les Amériques entraînant une recrudescence des épidémies et une aggravation des symptômes cliniques des patients atteints. Par exemple, le DENV-3 a provoqué une épidémie majeure au Nicaragua et s'est établi au Mexique et en Amérique Centrale en 1994. En 1977, le DENV-1 a été réintroduit en Jamaïque, Cuba, Porto Rico, le Venezuela et s'est rapidement répandu dans la Caraïbe, le Mexique, l'Amérique Centrale, l'Amérique du Nord, le Brésil et dans presque tous les pays de l'Amérique du Sud. En 1981, une nouvelle souche de DENV-2 introduite à Cuba probablement à partir de l'Asie, a été responsable de la première épidémie sévère de dengue hémorragique (DHF) et de syndrome de choc de dengue (DSS) dans les Amériques, avec 158 décès. Cette même souche, toujours associée à une augmentation de sévérité des cas cliniques, a atteint d'autres pays comme le Brésil. Enfin, en 1981, le DENV-4 a été détecté dans la Caraïbe et a également atteint de nombreux autres pays (GUBLER 1998).

Aujourd'hui, la dengue est l'arbovirose la plus répandue au monde avec 50 à 100 millions des personnes infectées chaque année et environ 1,4% de décès (GUZMAN *et al.* 2010). Les cas de dengue rapportés entre 2000 et 2006 aux Amériques constituent 68% des cas recensés dans le

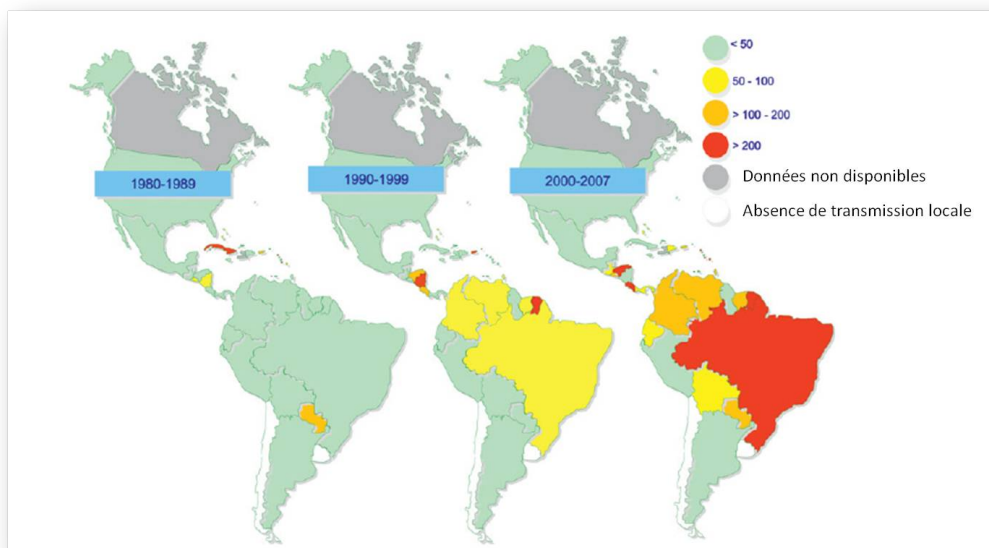


FIGURE 10 – Incidence moyenne de la dengue pour 100000 habitants par pays. Région des Amériques, 1980-2007. Adapté de SAN MARTÍN *et al.* (2010).

monde par l'Organisation Mondiale de la Santé et en seulement 30 ans, ce nombre a augmenté de 4,6 fois (de ~ 1 million de cas dans les années 80 à $\sim 4,7$ millions de 2000-2007) (Figure 10) (SAN MARTÍN *et al.* 2010). En Amérique du Sud, le taux d'incidence a été de 650 cas par 100 000 habitants. Ceci démontre la faiblesse des activités de lutte antivectorielle dans la région, ainsi que la grande réceptivité des moustiques vecteurs locaux vis-à-vis de cet arbovirus. Le CHIKV partage les mêmes vecteurs que le DENV (les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*). Néanmoins, jusqu'en octobre 2013 et sur les 3 décennies précédentes, aucune transmission autochtone du CHIKV n'avait été répertoriée sur le continent Américain (HALSTEAD 2015).



Chapitre 2

CONTENU DU CHAPITRE

Le virus du chikungunya

Ce chapitre débute par une brève présentation du genre *Alphavirus*. Par la suite sont abordées des généralités concernant le virus de chikungunya, incluant :

- le cycle de réplication et l'organisation du génome
- la phylogénie, les émergences et la distribution mondiale
- la pathogenèse et le tropisme cellulaire chez l'homme
- les cycles de transmission

Chapitre 2

Le virus du chikungunya

2.1 Les alphavirus

Les alphavirus (genre *Alphavirus*, famille *Togaviridae*) constituent un groupe de 30 espèces de virus enveloppés possédant une molécule d'ARN simple brin de polarité positive (KING *et al.* 2012). Un grand nombre de ces virus se caractérisent par leur capacité à provoquer des épidémies explosives dans la population humaine, qui contribuent à la propagation du virus vers de nouvelles régions non endémiques, devenant ainsi un problème majeur de santé publique (WEAVER & REISEN 2010). Bien que la majorité des espèces d'alphavirus ait été isolée à partir de vertébrés et d'arthropodes terrestres, au moins deux alphavirus qui infectent des hôtes vertébrés et des arthropodes vecteurs aquatiques (*i.e.* pou de l'éléphant de mer du sud) ont été découverts (LA LINN *et al.* 2001). Chez l'homme, l'infection par des alphavirus peut entraîner soit des encéphalites sévères potentiellement mortelles ou des arthralgies intenses, débilitantes et souvent chroniques. Les premières études ont soutenu avec un certain succès que les alphavirus du Nouveau Monde tels que le virus de l'encéphalite équine de l'ouest (EEOV), le virus de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV), et le virus de l'encéphalite équine du Venezuela (VEEV) provoquent généralement une maladie encéphalitique, tandis que les alphavirus de l'Ancien Monde, comme le CHIKV, le virus Ross River (RRV), le SINV et le virus ONNV sont plutôt associés à des maladies arthritogéniques (SUHRBIER *et al.* 2012). Néanmoins, quelques exceptions existent, comme par exemple le virus Mayaro (MAYV) qui est trouvé uniquement dans les Amériques et provoque une maladie typiquement arthritogénique (TESH *et al.* 1999). Les alphavirus responsables de la plupart des arthralgies humaines sont : le virus Barmah Forest (BFV), RRV, SINV, ONNV, MAYV et le CHIKV.

2.2 Le virus du chikungunya

2.2.1 Cycle de réplication et organisation du génome

Le virus du chikungunya (CHIKV) est l'agent étiologique de la maladie qui porte son nom. Le nom « chikungunya » dérive de la langue Makondé et signifie 'qui se recourbe', faisant référence aux arthralgies parfois incapacitantes des patients infectés. Le CHIKV a été isolé pour la première fois en Tanzanie en 1952 à partir du sérum d'un patient fébrile (ROBINSON 1955). Au début, l'épidémie a été imputée au virus de la dengue (DENV), mais les analyses sérologiques et antigéniques démontrèrent qu'il s'agissait d'un alphavirus étroitement lié aux virus Mayaro et Semliki Forest (SPENCE & THOMAS 1959). La découverte du CHIKV a permis de suggérer que certaines épidémies survenues dès la fin du XVIII^{ème} siècle étaient dues à ce virus et non pas à celui de la dengue (POWERS & LOGUE 2007).

Le CHIKV appartient au genre *Alphavirus*, famille des *Togaviridae*. C'est un virus enveloppé de 60 à 70 nm de diamètre dont la capsid de symétrie icosaédrique contient un ARN monocaténaire positif linéaire de taille d'environ 11,8 kb. Le génome du CHIKV ressemble à un ARNm eucaryote puisqu'il porte une coiffe en 5' et une queue polyadénylée en 3' (POWERS & LOGUE 2007). Chacune des deux extrémités présente des régions non traduites (NTR) de 76 nt (nucléotides) (SOLIGNAT *et al.* 2009). À l'extrémité 3', se trouvent des éléments de séquences répétées conservées (RSE) qui régulent la synthèse de l'ARN (PFEFFER *et al.* 1998). Plus précisément, l'organisation génomique générale des alphavirus est la suivante (Figure 11) : (i) une coiffe en 5' NTR ; (ii) un premier cadre de lecture (ORF) codant les protéines non structurales nsP1 à nsP4 ; (iii) la région « jonction » (J) entre les deux régions codantes du génome qui est constituée du domaine carboxy-terminal de la séquence codant les nsP et du promoteur localisé en 5' de la séquence codant les protéines structurales ; (iv) la région subgénomique 26S codant les glycoprotéines d'enveloppe (E1, E2, E3 et 6K) et la protéine de capsid (C) ; et enfin (v) la queue polyA en 3'NTR (SOLIGNAT *et al.* 2009).

Chez le CHIKV, l'enveloppe virale est composée de 80 trimères formés à partir de l'assemblage d'hétérodimères des protéines E1/E2. La glycoprotéine E1 intervient dans la fusion membranaire permettant l'entrée dans la cellule hôte grâce à son peptide de fusion, alors que la gly-

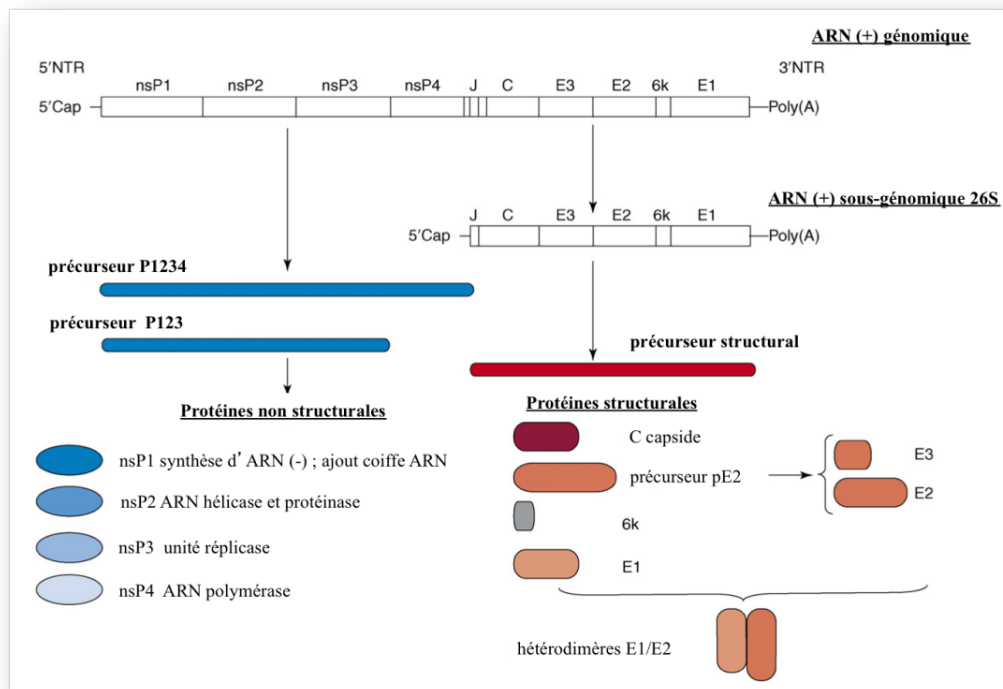


FIGURE 11 – Organisation du génome du virus du chikungunya. D'après CHEVILLON *et al.* (2008).

coprotéine E2 est impliquée dans la liaison aux récepteurs des cellules cibles et porte les sites antigéniques principaux de la neutralisation virale. Le CHIKV se fixe à la cellule hôte grâce à la glycoprotéine d'enveloppe E2 au niveau de récepteurs encore non identifiés. Les laminines, les glycosaminoglycanes, et les prohibitines ont été proposées comme récepteurs potentiels des alphavirus chez l'hôte vertébré (KLIMSTRA *et al.* 2003 ; WANG *et al.* 1992). Ensuite, le virus pénètre dans la cellule cible par endocytose grâce à des vésicules constituées de clathrine (DETULLEO & KIRCHHAUSEN 1998). Le pH acide au sein de l'endosome induit des changements de conformation au niveau des hétérodimères E1/E2 qui forment l'enveloppe virale. Cela entraîne l'exposition du peptide de fusion de la glycoprotéine E1 qui forme un pore dans la membrane de l'endosome, libérant ainsi la nucléocapside dans le cytoplasme (GLOMB-REINMUND & KIELIAN 1998 ; HAMMAR *et al.* 2003). Pendant la réplication virale qui a lieu dans le cytoplasme de la cellule, les protéines non structurales sont exprimées sous forme de deux polyprotéines ou précurseurs traduits à partir de l'ARN (+) génomique : le P1234 et le P123. Le clivage de ces précurseurs donne lieu aux protéines nsP1, nsP2, nsP3 et nsP4 qui forment le complexe de réplication. nsP1 est impliquée dans la synthèse d'un intermédiaire ARN(-) et possède des propriétés guanyl-transférase et guanine-7-transférase. nsP2 permet le clivage de

P1234 grâce à ses activités protéinase, hélicase et triphosphatase. nsP3 fait partie d'une unité répliquase et nsP4 correspond à l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) (SOLIGNAT *et al.* 2009). L'intermédiaire ARN de polarité négative synthétisé par la protéine nsp1 du complexe de répliquase sert de matrice à la synthèse de l'ARN (+) génomique et à la transcription de l'ARN (+) sous-génomique 26S à partir d'un promoteur interne. Cette molécule d'ARN sous-génomique est traduite dans un précurseur structural C/pE2/6k/E1 dont le clivage donne lieu à la protéine de la capsid C et aux glycoprotéines E1 et E2. La protéine de capsid C possède trois domaines : (i) une région N-terminale qui jouerait un rôle dans l'assemblage des nucléocapsides, (ii) une région intermédiaire qui permet la liaison spécifique et l'encapsulation de l'ARN génomique, et (iii) une région C-terminale avec une activité sérine protéase capable de cliver le polypeptide. Cette activité auto-protéolytique libère d'abord la capsid C qui s'associe à l'ARN viral pour former les nucléocapsides. Ensuite, le peptide pE2/6k/E1 migre dans le réticulum endoplasmique où il subit des modifications post-traductionnelles. Au cours du transport vers la membrane plasmique, pE2 est clivé en E2 et E3 par une furine et l'hétérodimère E1/E2 est formé. Les peptides E3 et 6k sont responsables du repliement correct des protéines pE2 et E1 respectivement, lors de la formation des hétérodimères E1/E2 (STRAUSS & STRAUSS 1994). La fin du cycle correspond à l'assemblage des virions et au bourgeonnement à travers la membrane plasmique qui devient alors l'enveloppe virale (CHEVILLON *et al.* 2008) (Figure 12).

2.2.2 Phylogénie, émergence et distribution mondiale

Le CHIKV serait apparu en Afrique il y a environ 500 ans et aurait été introduit en Asie il y a 70 à 90 ans depuis l'Afrique de l'Est (VOLK *et al.* 2010). Les analyses des séquences partielles du gène E1, codant la glycoprotéine E1 (POWERS & LOGUE 2007; SCHUFFENECKER *et al.* 2006), ainsi que le séquençage de 80 souches de CHIKV (VOLK *et al.* 2010) ont permis de différencier trois groupes génétiques ou phylogroupes : (i) le groupe Est/Centre/Sud Afrique (ECSA); (ii) le groupe Ouest africain; et (iii) le groupe asiatique (Figure 13). Malgré leur proximité géographique, les deux génotypes africains restent indépendants d'un point de vue génétique (VOLK *et al.* 2010).

Depuis sa découverte en 1952 et jusqu'en 2012, le CHIKV a été isolé à de nombreuses

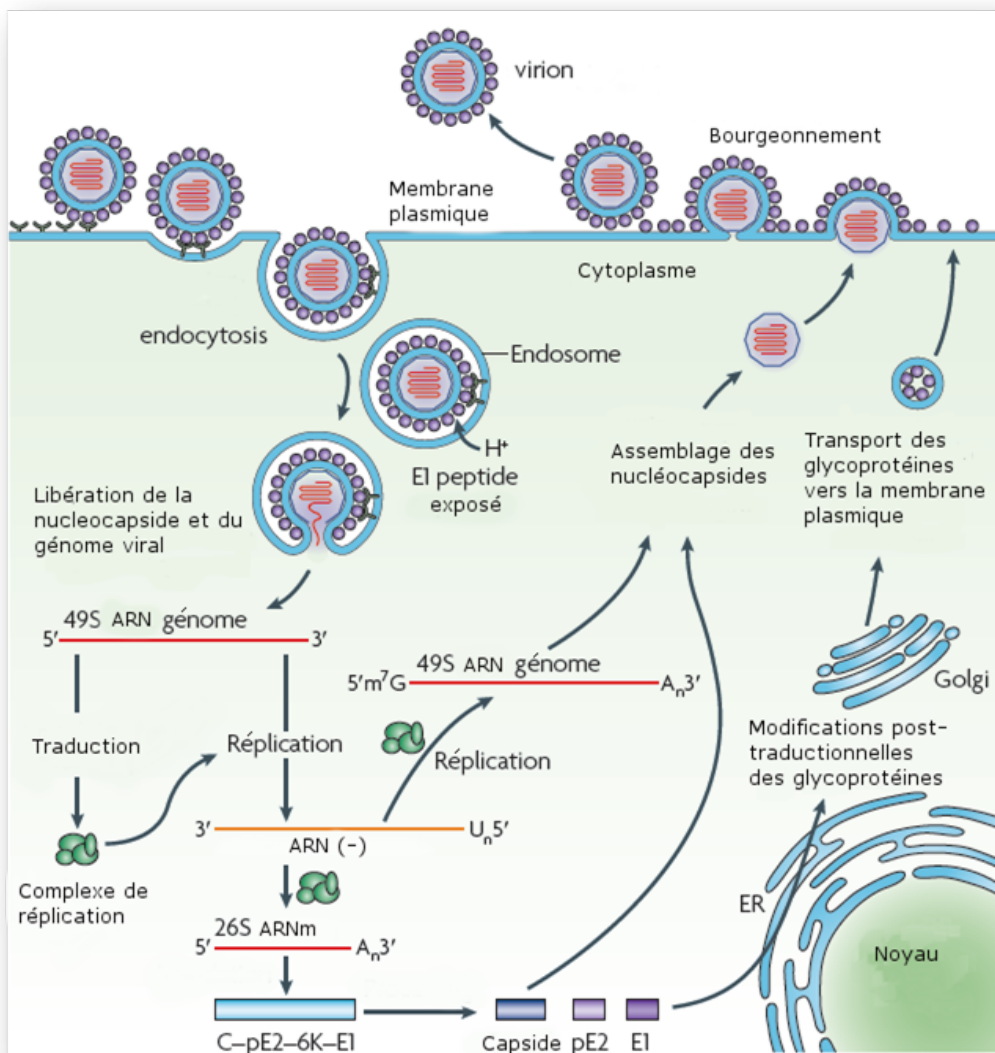


FIGURE 12 – Cycle de répliation du chikungunya virus. Adapté de SCHWARTZ & ALBERT (2010).

occasions, notamment en Afrique subsaharienne et en Asie du Sud et du Sud-Est (Table 1). En effet, entre 1960 et le début des années 2000, le virus a émergé ou ré-émergé dans différents pays d'Afrique tropicale : Afrique de l'Est (Tanzanie, Kenya, Ouganda, Burundi et Soudan), Afrique Australe (Zimbabwe, Afrique du Sud et Malawi), Afrique de l'Ouest (Sénégal, Guinée, Côte d'Ivoire, Bénin, Nigéria) et en Afrique Centrale (République Centrafricaine, Gabon et République Démocratique du Congo) (DIALLO *et al.* 1999 ; LEROY *et al.* 2009 ; MCCRAE *et al.* 1971 ; MOORE *et al.* 1975 ; PASTORINO *et al.* 2004 ; revues dans POWERS & LOGUE 2007). En Asie, le virus a été isolé pour la première fois en Thaïlande en 1958 et a sévi par la suite en Asie du Sud-Est (Vietnam, Cambodge, Laos, Thaïlande, Birmanie, Malaisie, Indonésie et Philippines), ainsi que dans le sous-continent Indien (Inde, Bangladesh et Pakistan) (CAREY *et*

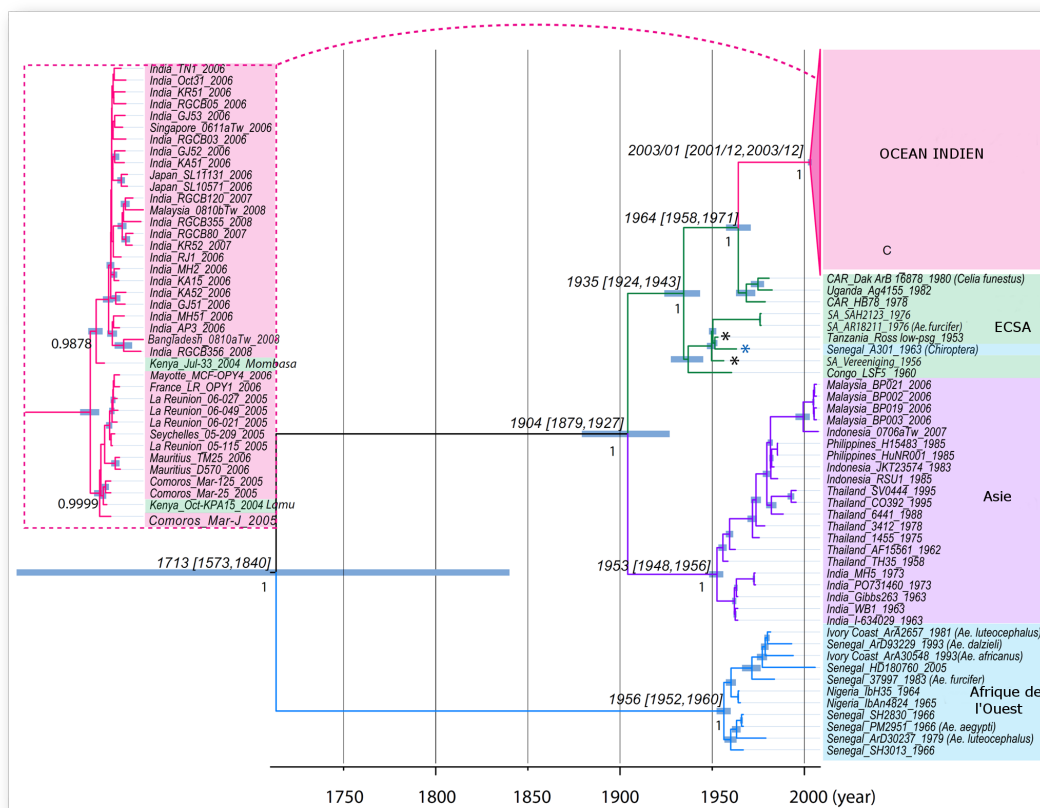


FIGURE 13 – Relations phylogénétiques entre 80 souches de CHIKV isolées lors des épidémies (1955-2007). Adapté de VOLK *et al.* (2010).

al. 1969; POWERS & LOGUE 2007; SARKAR *et al.* 1965; THAUNG *et al.* 1975).

Les épidémies les plus récentes de chikungunya datent de 2005. Suite à la réémergence du CHIKV en Afrique de l’Est en 2004 au Kenya (SERGON *et al.* 2008), une épidémie sans précédent a touché les îles de l’Océan Indien entre 2005 et 2006, incluant les Comores, l’Île Maurice, Mayotte, Madagascar, les Seychelles et La Réunion (RATSITORAHINA *et al.* 2008; SCHUFFENECKER *et al.* 2006; SISSOKO *et al.* 2008). A la Réunion, plusieurs milliers de cas ont été recensés avec un total de 266 000 personnes et 203 à 256 décès (RENAULT *et al.* 2007). Par ailleurs, des formes graves et mortelles de la maladie non décrites auparavant, ont pu être observées au cours de ces émergences (RENAULT *et al.* 2008; SCHUFFENECKER *et al.* 2006). Les souches isolées lors des épidémies de CHIKV dans les îles de l’Océan Indien forment un groupe monophylétique au sein du génotype ECSA (Figure 13). Il est important de noter qu’au cours de ces épidémies, une microévolution du virus s’est opérée. En effet, les souches détectées chez les patients en début d’épidémie à la Réunion possédaient une alanine en position 226 de la protéine d’enveloppe E1 (E1-226A), alors que vers la fin de l’épidémie,

un nouveau variant viral présentant une alanine à cette même position (E1-226V) est devenu majoritaire (SCHUFFENECKER *et al.* 2006).

TABLE 1 – Principales épidémies de CHIKV (1952-2012). Modifié de WEAVER (2014).

Date d'émergence	Pays	Génotype	Vecteur impliqué
1952-1953	Tanzanie	ECSA	<i>Ae. aegypti</i>
1961-1963	Cambodge	ND	ND
1956, 1975-1977	Afrique du Sud	ECSA	Pas d' <i>Ae. aegypti</i> impliqué
1957, 1961-1962, 1971	Zimbabwe	ECSA	Pas d' <i>Ae. aegypti</i> impliqué
1958, début 60	Thaïlande	Asiatique	<i>Ae. aegypti</i> suspecté
1962-1965	Inde (Calcutta, Madras)	Asiatique	<i>Ae. aegypti</i> suspecté
1962-1964	Bangkok, Thaïlande	Asiatique	<i>Ae. aegypti</i>
1966	Viet Nam	ND	ND
1969	Nigeria	ND	ND
1998	Selangor, Malaisie	ND	ND
1999-2000	République Démocratique du Congo	ECSA	ND
2004-2005	Côtes du Kenya, île Lamu	IOL	<i>Ae. aegypti</i> dans l'île Lamu
2005-2011	Comores, Île Maurice, La Réunion	IOL	<i>Ae. albopictus</i>
2005-2008	Inde, Sri Lanka	IOL	<i>Ae. aegypti</i> et <i>Ae. albopictus</i>
2006	Malaisie (Bagan Panchor)	Asiatique	ND
2006	Douala and Yaoundé, Cameroun	ECSA	<i>Ae. africanus</i>
2006-2007	Libreville, Gabon	ECSA	<i>Ae. albopictus</i>
2007	Italie (Emilie Romagne)	ECSA	<i>Ae. albopictus</i>
2007-2008	Tanzanie (Moshi)	ND	ND
2008	Thaïlande	IOL	<i>Ae. albopictus</i>
2008	Rural Malaysia	IOL	<i>Ae. albopictus</i>
2008	Singapore	IOL	<i>Ae. aegypti</i>
2010	France (Fréjus)	IOL	<i>Ae. albopictus</i>
2010	Gabon (Ndangui)	ND	<i>Ae. albopictus</i>
2010	Chine (Guangdong)	IOL	<i>Ae. albopictus</i>
2011	Cambodge	IOL	ND
2012	Bhutan	IOL	ND

Dès 2006, le génotype ECSA a été introduit au Pakistan, au Sri Lanka, aux Maldives et en Inde, où plus d'un million de personnes ont été atteintes (SAXENA *et al.* 2006). Un fort taux de mortalité a été observé en Inde, bien qu'aucun décès n'ait été directement attribué au virus (RENAULT *et al.* 2008). Le continent africain n'a pas été épargné puisqu'une épidémie a sévi au Cameroun (PEYREFITTE *et al.* 2007), plus de 10 000 cas suspects ont été répertoriés au Gabon

(LEROY *et al.* 2009) et les premiers cas de CHIKV ont été détectés au Congo (KELVIN 2011). La détection des souches ECSA de CHIKV ayant la mutation E1-A226V lors de ces épidémies suggèrent un phénomène de convergence évolutive (KUMAR *et al.* 2008 ; SANTHOSH *et al.* 2009). Par ailleurs, il semblerait que les souches du génotype ECSA portant la substitution E1-A226V seraient en train de déplacer le génotype asiatique dans le sous-continent Indien et l'Asie du Sud-Est (TSETSARKIN *et al.* 2011). En effet, depuis 2008, des souches de génotype ECSA ont circulé en Asie du Sud-Est : en Malaisie, à Singapour, en Thaïlande, en Indonésie, en Birmanie et au Cambodge. Quant au génotype asiatique, la circulation récente des souches est plutôt sporadique, étant responsable des épidémies notamment en Malaisie en 2006 (ABUBAKAR *et al.* 2007), en Nouvelle Calédonie en 2011 (ALIBERT *et al.* 2011) et en Philippines en 2012, 2013 (KAWASHIMA *et al.* 2014).

Ces épidémies récentes de chikungunya ont conduit à l'importation de souches ECSA de CHIKV en Europe notamment en Belgique (BOTTIEAU *et al.* 2009), en Italie (FUSCO *et al.* 2006) et en France (RECEVEUR *et al.* 2010). En 2007, un voyageur infecté provenant du Kerala (Inde) a été à l'origine de la première épidémie de chikungunya en Europe (217 cas confirmés) qui a touché la province de Ravenne, dans la région d'Emilie Romagne en Italie (REZZA *et al.* 2007). En septembre 2010, l'importation du CHIKV par un voyageur infecté revenant du Rajhastan (Inde) a été à l'origine des cas autochtones répertoriés dans le sud de la France (département du Var) (GRANDADAM *et al.* 2011). Le vecteur *Ae. albopictus*, présent en Europe, fut identifié comme vecteur responsable de l'épidémie en Italie (BONILAURI *et al.* 2008), ainsi que des cas autochtones du sud de la France (GRANDADAM *et al.* 2011). De plus, il a été démontré que la compétence vectorielle des *Ae. albopictus* européens est très importante vis-à-vis des souches ECSA de CHIKV (MOUTAILLER *et al.* 2009 ; ZOUACHE *et al.* 2014) (VEGARUA *et al.* 2013, Annexe 1), indiquant ainsi que l'Europe n'est pas à l'abri d'épidémies liées à des arbovirus jusqu'alors essentiellement « exotiques ». De nombreux cas de chikungunya ont été également importés sur le continent américain et la Caraïbe : au Brésil (DO SOCORRO SOUZA *et al.* 2012), aux Etats-Unis (GIBNEY *et al.* 2011), en Martinique, en Guadeloupe et en Guyane (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO) 2013), soulignant ainsi le risque potentiel d'émergence de CHIKV sur le continent. Cependant, jusqu'en octobre 2013, aucune transmission de CHIKV n'avait été décrite sur le continent américain (Figure 14) (TSETSARKIN *et al.* 2011).

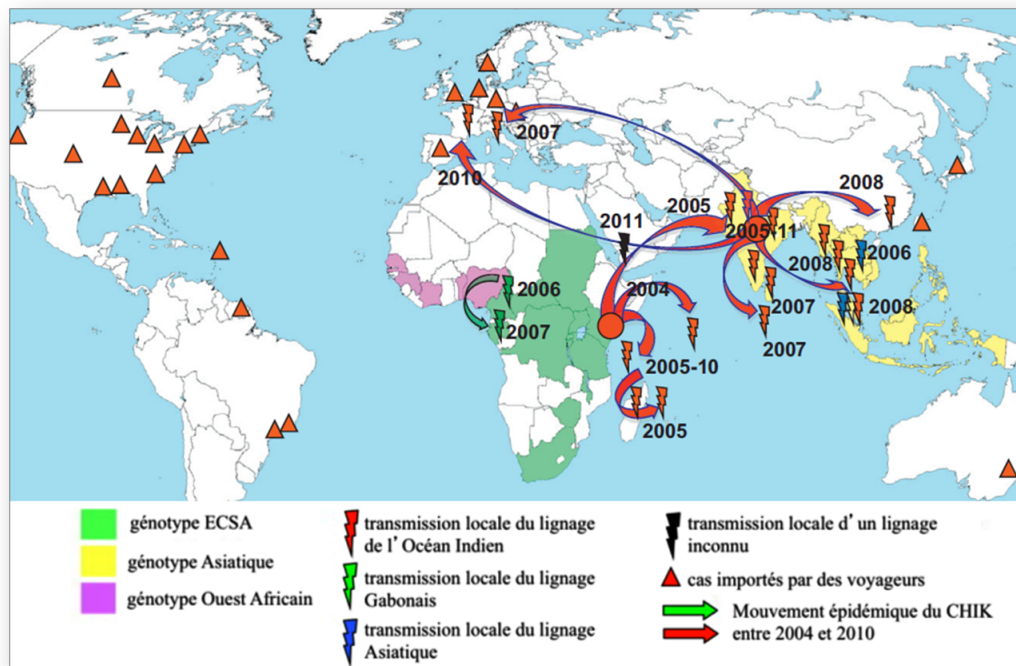


FIGURE 14 – Distribution géographique du CHIKV et émergences récentes (2004-2011). D'après TSET-SARKIN *et al.* (2011).

2.2.3 Pathogenèse et tropisme cellulaire chez l'homme

Après l'inoculation du virus par un moustique infecté, la durée d'incubation du CHIKV chez l'homme est de 2 à 4 jours (Figure 15). Les principaux symptômes de la maladie sont : fièvre, arthralgies et éruptions cutanées. D'autres symptômes tels que troubles digestifs, céphalées, douleurs rétro-orbitales, photophobie, myalgies, nausées et asthénie peuvent également être associés à l'infection. Durant la phase aiguë de la maladie, qui peut durer jusqu'à 10 jours, la quantité de virus dans le sang peut atteindre 10^8 particules virales/mL (SCHWARTZ & ALBERT 2010). Les formes graves de la maladie, touchant surtout des sujets immunodéprimés, ont été décrites en détail lors de l'épidémie de la Réunion (SCHUFFENECKER *et al.* 2006). Ces formes sévères correspondent à des arthralgies invalidantes, pouvant durer des mois voire des années chez 30 à 40% des patients, des méningo-encéphalites (notamment chez le nouveau-né), et plus rares, des hépatites, des insuffisances respiratoires et des hémorragies (ERNOULD *et al.* 2008). La transmission verticale de la mère au nouveau-né est rare (0,25% des cas). Cependant, un taux d'infection de 50% des nouveau-nés a été observé lorsque l'accouchement a lieu lors du pic virémique chez la mère. De plus, une encéphalopathie sévère a été observée dans 50% des

nouveau-nés infectés (GÉRARDIN *et al.* 2008). Concernant la mortalité liée au CHIKV à la Réunion, sur 300 000 infections, 237 décès ont été déclarés (RENAULT *et al.* 2007, 2008). Le taux de patients asymptomatiques de CHIKV, estimé à 15% lors de l'épidémie de La Réunion (LEMANT *et al.* 2008), est plus faible par rapport à celui répertorié chez d'autres arbovirus comme le DENV ($\sim 75\%$) (BHATT *et al.* 2013), ou encore le RVFV où la plupart des cas humains sont asymptomatiques (POURRUT *et al.* 2010).

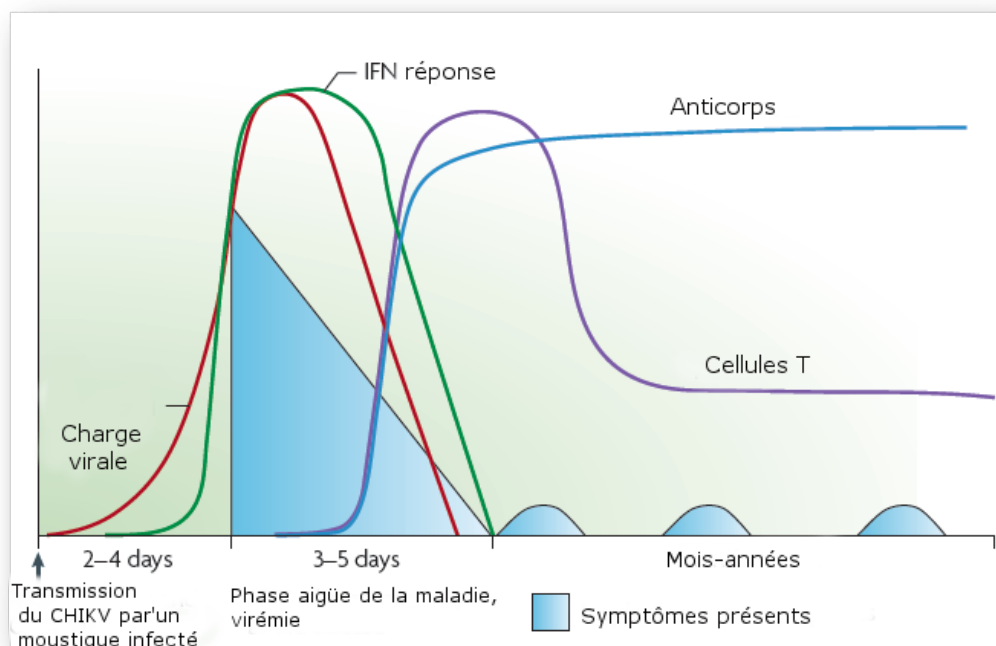


FIGURE 15 – Cinétique et pathogénèse du CHIKV chez l'homme. Adapté de SCHWARTZ & ALBERT (2010).

Des primates non-humains tel que *Macaca fascicularis* ont été utilisés comme modèle pour étudier la pathogénèse liée au CHIKV ainsi que son tropisme cellulaire. Les manifestations cliniques observées chez les macaques étaient semblables à celles qui caractérisent l'infection chez l'homme, à savoir l'apparition de fièvre et d'éruptions cutanées. Lors de la phase aiguë de l'infection, le virus cible particulièrement les tissus lymphoïdes, le foie, le système nerveux central, les articulations et le muscle. Par ailleurs, ce sont surtout les macrophages, les cellules dendritiques et les cellules épithéliales qui sont infectées. Les macrophages sont identifiés comme le principal réservoir du virus lors des infections persistantes, ce qui expliquerait les rhumatismes chroniques observés chez l'homme (LABADIE *et al.* 2010).

Actuellement, il n'existe aucun médicament antiviral vraiment efficace contre le CHIKV.

De nombreuses substances antivirales sont capables d'affecter voire d'inhiber la réplication du CHIKV *in vitro*, mais leur effet *in vivo* est soit moins efficace, soit n'a pas été encore étudié (BETTADAPURA *et al.* 2013). Ainsi, le traitement contre la maladie reste à ce jour symptomatique avec une utilisation privilégiée des analgésiques et anti-inflammatoires non stéroïdiens (POWERS & LOGUE 2007). En raison de la morbidité élevée et des arthralgies invalidantes provoquées par l'infection, des recherches pour développer un vaccin ont été menées en utilisant différentes approches (BETTADAPURA *et al.* 2013) : (i) vaccin à partir des souches de CHIKV atténuées (LEVITT *et al.* 1986), (ii) des vaccins chimériques contenant les protéines structurales du CHIKV couplées à la structure globale d'un autre alphavirus (*i.e.* VEEV, EEEV, SINV) (WANG *et al.* 2008 ; WEAVER *et al.* 2012), (iii) des vaccins à ADN basés sur des séquences consensus des gènes E1, E2 et C du CHIKV (MUTHUMANI *et al.* 2008), et (iv) des virus-like-particles (*i.e.* des particules virales sans génome) capables d'induire la production d'anticorps neutralisants chez les macaques (AKAHATA *et al.* 2010).

2.2.4 Cycle de transmission

Le CHIKV est essentiellement transmis par les moustiques du genre *Aedes* (Figure 16). En Afrique, le virus se maintient au sein d'un cycle forestier où il est transmis aux primates non-humains (*i.e.* *Cercopithecus aethiops*, *Erythrocebus patas*, *Galago senegalensis*, *Papio papio*), écureuils (*Xerus erythropus*) et chauves-souris (*Scotophilus* sp.) par des moustiques zooanthrophiles comme *Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. dalzieli*, *Ae. vittatus* et *Ae. africanus* (DIALLO *et al.* 1999 ; JUPP & MCINTOSH 1990 ; MCCRAE *et al.* 1971). Épisodiquement, le CHIKV est à l'origine des épidémies dans des zones rurales ou urbaines. Au cours des épidémies urbaines où l'homme est le principal hôte amplificateur, le virus est surtout transmis par les moustiques anthropophiles, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*. En Asie, le virus circule dans un cycle urbain impliquant les moustiques *Ae. aegypti* comme vecteur principal, et *Ae. albopictus* comme vecteur secondaire. Néanmoins, depuis l'émergence du chikungunya dans les îles de l'Océan Indien en 2004, le moustique *Ae. albopictus* a été identifié comme un vecteur majeur du CHIKV de génotype ECSA dans la quasi-totalité des pays où le virus a émergé ou ré-émergé. La compétence vectorielle accrue d'*Ae. albopictus* vis-à-vis des souches ECSA du CHIKV ayant la mutation E1-A226V étant la cause principale de ce changement de statut du vecteur (SCHUFFENECKER *et al.* 2006 ; TSETSARKIN *et al.* 2007 ; VA-

ZEILLE *et al.* 2007).

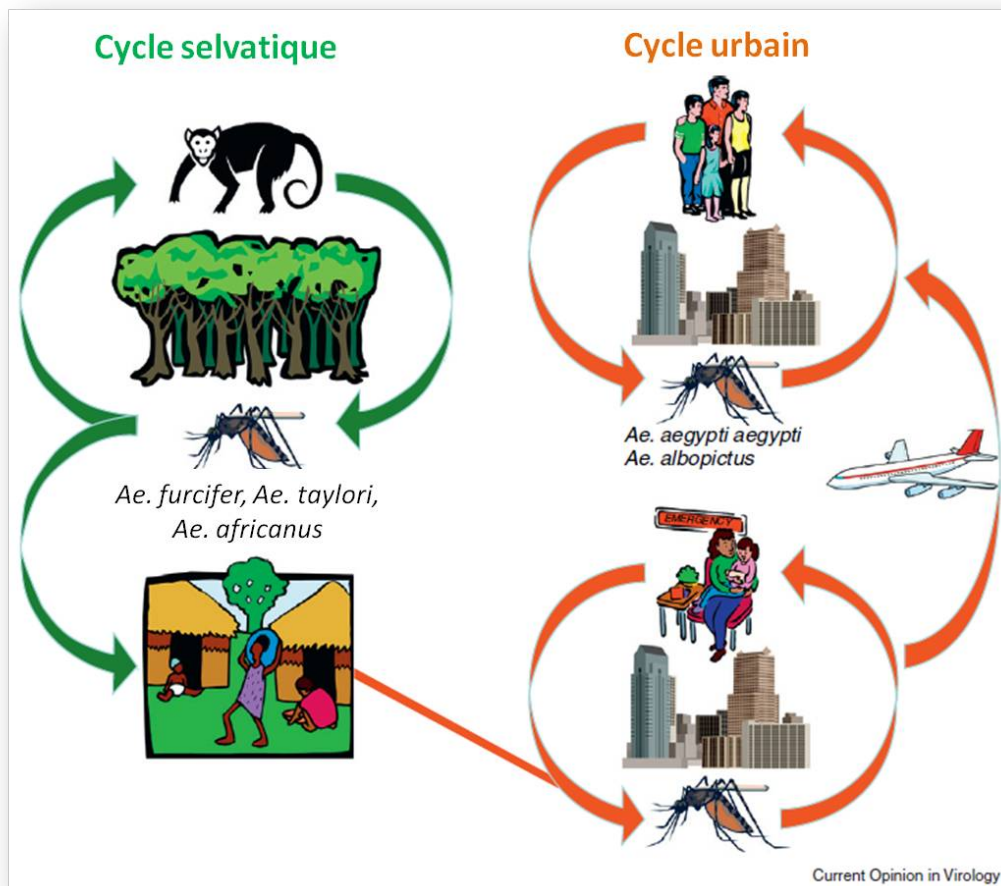
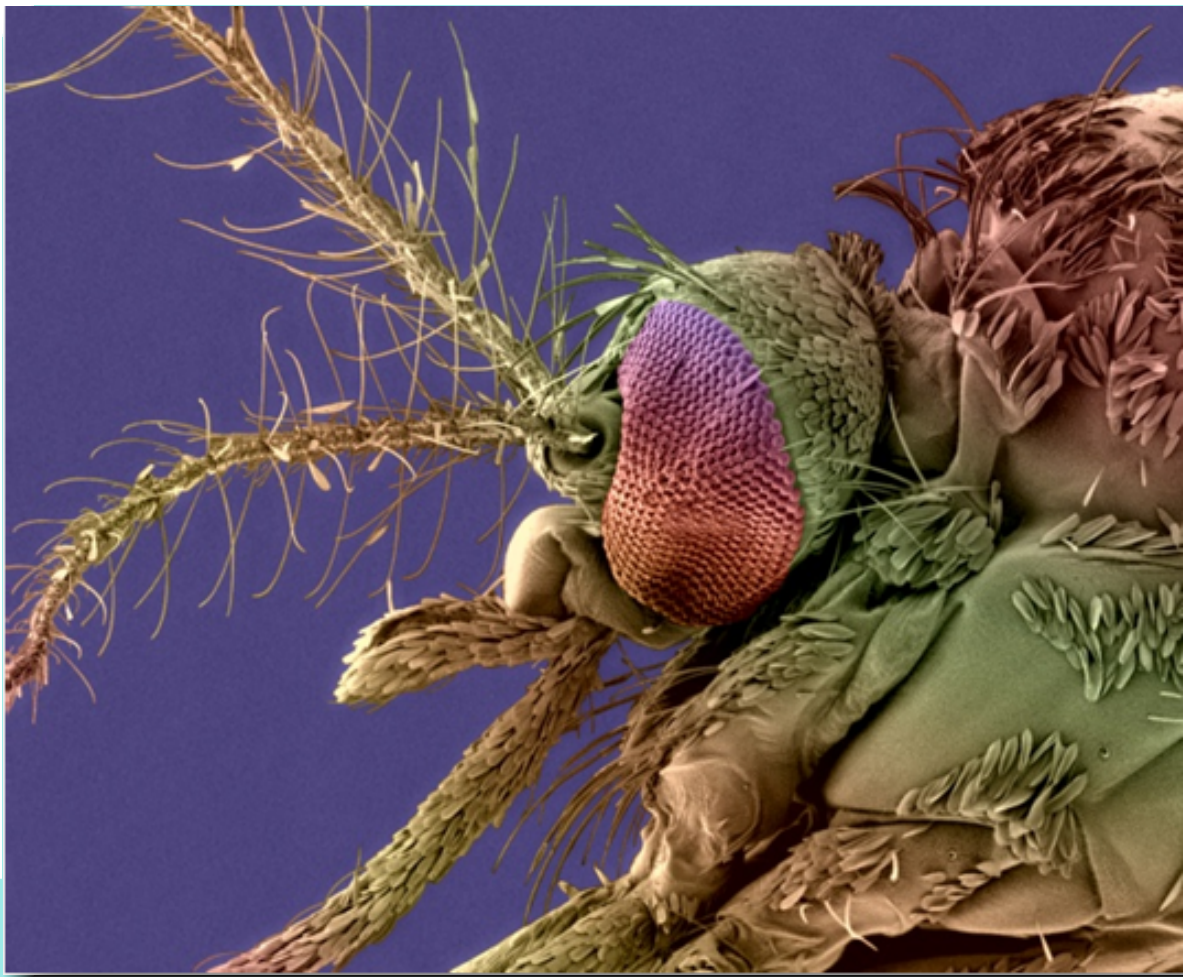


FIGURE 16 – Cycles de transmission du CHIKV. Adapté de TSETSARKIN *et al.* (2011).

Photo : Christine Schmitt



Chapitre 3

CONTENU DU CHAPITRE

Les moustiques vecteurs,
Aedes aegypti et *Aedes albopictus*

- Ce chapitre présente d'abord des généralités notamment sur le cycle de développement, la distribution, la bio-écologie et l'importance médicale des moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Ensuite, des notions basiques de la génétique des populations sont exposées. Pour finir, l'état de l'art des connaissances sur la variabilité génétique de ces moustiques vecteurs sur le continent est rappelé.

Chapitre 3

Les moustiques vecteurs, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*

3.1 Classification taxonomique et biologie

Les moustiques sont des arthropodes appartenant à la classe des insectes, à l'ordre des diptères et à la famille des *Culicidae* (Figure 17A). Cette famille regroupe des insectes possédant des pièces buccales en forme de trompe rigide de type piqueur-suceur. Elle inclut, entre autres, le genre *Anopheles*, vecteur des *Plasmodium* responsables du paludisme, le genre *Culex*, vecteur d'arbovirus comme le virus West Nile et de parasites comme la filaire responsable de la filariose de Bancroft, et le genre *Aedes*. Dans le genre *Aedes*, environ 800 espèces sont actuellement répertoriées, avec plus de 750 espèces et sous-espèces réparties en 43 sous-genres (Mosquitoes classification 2010, www.mosquitocatalog.org). Les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (sous-genre *Stegomyia*) figurent parmi les espèces les plus anthropophiles du genre *Aedes* et sont vecteurs naturels de nombreux arbovirus (*i.e.* DENV, YFV, CHIKV) (Annexe 2) (GRATZ 2004; PAUPY *et al.* 2009; SCOTT *et al.* 1993). Par conséquent, l'intérêt en santé publique d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* est majeur. Ces deux espèces se distinguent notamment au stade adulte par le dessin fait d'écailles blanches au niveau du scutum : chez *Ae. aegypti*, ce dessin est en forme de lyre alors que chez *Ae. albopictus*, une bande longitudinale d'écailles claires est présente au milieu du scutum (Figure 17B).

Le cycle de développement du moustique présente une phase aquatique avec des stades pré-imaginaux (larves et nymphes), et une phase aérienne avec des stades imaginaux (moustique adulte) (Figure 18). Les femelles du genre *Aedes* spp. pondent des œufs d'environ 0,5 mm (100-400 en conditions naturelles) sur des supports solides à proximité immédiate de la surface de l'eau. Ces œufs sont bruns, de forme ovale, sans flotteur et sont dits « quiescents » car ils peuvent rester viables pendant plusieurs mois voire un an grâce à un chorion imperméable à

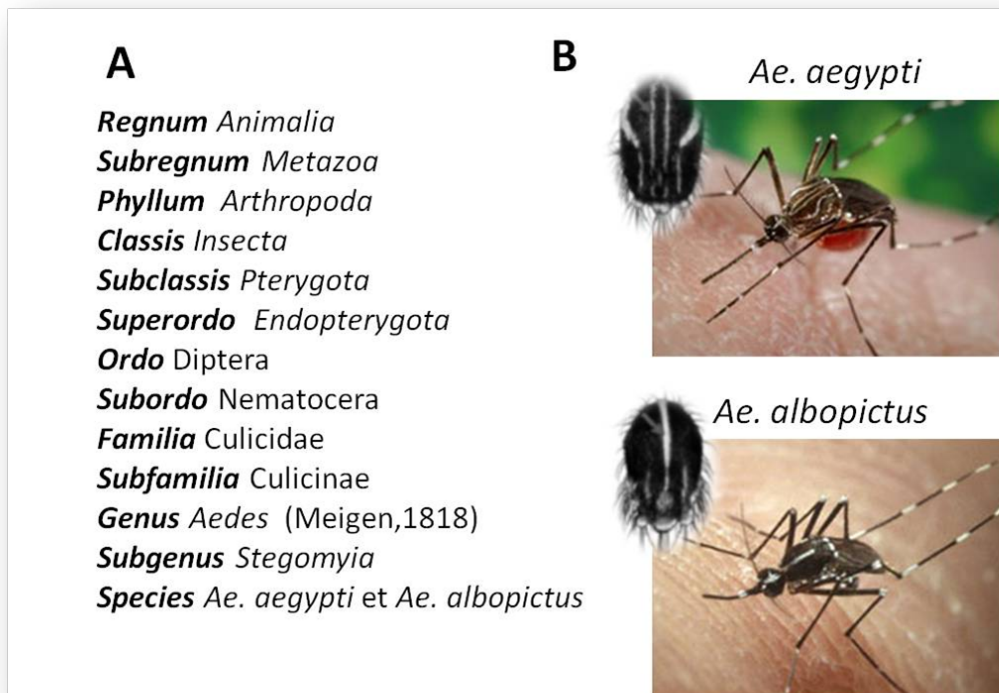


FIGURE 17 – A. Classification taxonomique d'*Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*. B. Femelles adultes et scutum d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*.

base de chitine qui protège l'embryon de la dessiccation (DEGALLIER *et al.* 1988 ; HAWLEY *et al.* 1987 ; RUSSELL *et al.* 2001). Un ou deux jours après leur mise en eau, les œufs éclosent donnant des larves aquatiques. Le développement larvaire dure entre 7 et 12 jours et se divise en quatre étapes successives (L1, L2, L3 et L4) séparées par des mues permettant l'augmentation de taille, de 1 mm au 1er stade à 1 cm pour le 4ème stade. La durée des stades larvaires est modulée par des conditions environnementales telles que la température, la disponibilité des nutriments, la compétition inter- et intra-spécifique ou encore la prédation (BRAKS *et al.* 2004 ; KAMIMURA *et al.* 2002). Les stades larvaires ont une morphologie semblable avec des pièces buccales de type broyeur et un siphon respiratoire situé à l'extrémité de l'abdomen (Figure 18B). La mue du stade L4 donne lieu au stade nymphal qui dure entre 1 et 5 jours. La nymphe a une forme en virgule, avec un céphalothorax globuleux et un abdomen recourbé ; elle ne se nourrit pas et respire grâce à deux trompettes respiratoires prothoraciques (Figure 18C) (RODHAIN & PEREZ 1985). Pendant ce stade, une véritable métamorphose (appelée aussi nymphose) permet au moustique de passer d'un mode de vie aquatique à un mode de vie aérien. L'émergence de l'imago dure en moyenne 15 minutes. En général, les mâles émergent en premier.

Ils se nourrissent exclusivement du nectar des fleurs, et ont une durée de vie plus courte, leur but essentiel étant l'accouplement avec les femelles qui a lieu quelques jours après l'émergence (DEGALLIER *et al.* 1988). Dans la plupart des cas, les femelles ne s'accouplent qu'une seule fois et stockent les spermatozoïdes dans leur spermathèque. Les femelles se nourrissent aussi du nectar des fleurs, mais à chaque cycle gonotrophique qui dure de 2 à 4 jours, la femelle prend au moins un repas sanguin sur un hôte vertébré (SCOTT *et al.* 1993). Au moment de la piqûre, la femelle injecte à l'hôte vertébré des molécules antihémostatiques qui préviennent l'agrégation plaquettaire, la vasoconstriction et la coagulation (JAMES 1994). Ce repas de sang assure un apport en protéines pour la maturation des œufs après leur fécondation. La longévité des femelles peut aller d'une semaine à plusieurs mois (RODHAIN & PEREZ 1985).

L'adulte peut mesurer entre 5 et 20 mm et comme pour le reste des insectes, son corps est constitué d'une tête, un thorax et un abdomen (Figure 19A). Au niveau de la tête, on trouve les pièces buccales de type piqueur-suceur et les organes sensoriels tels que les yeux composés et les antennes. Chez le mâle, les antennes sont longues et « plumeuses » alors que chez les femelles elles sont plutôt courtes et « glabres ». Le thorax est divisé en trois parties : pro, méso et métathorax, chacune portant une paire de pattes. Le méso et le métathorax portent respectivement une paire d'ailes membraneuses et une paire d'haltères (ailes atrophiées) qui confèrent de la stabilité pendant le vol. L'abdomen est composé de dix segments dont les derniers correspondent aux appendices génitaux. L'anatomie interne est caractérisée par un appareil digestif qui occupe la plupart de la cavité générale du moustique, où le repas sanguin est digéré chez les femelles (Figure 19B). Dans le thorax, se trouvent les deux glandes salivaires trilobées qui secrètent la salive délivrée lors de la piqûre. 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. Le système nerveux, segmenté, est constitué d'un système nerveux central, de ganglions nerveux et d'un cordon nerveux ventral. L'appareil génital comporte chez la femelle deux ovaires et une spermathèque, et chez le mâle, deux testicules et une vésicule séminale (RODHAIN & PEREZ 1985).

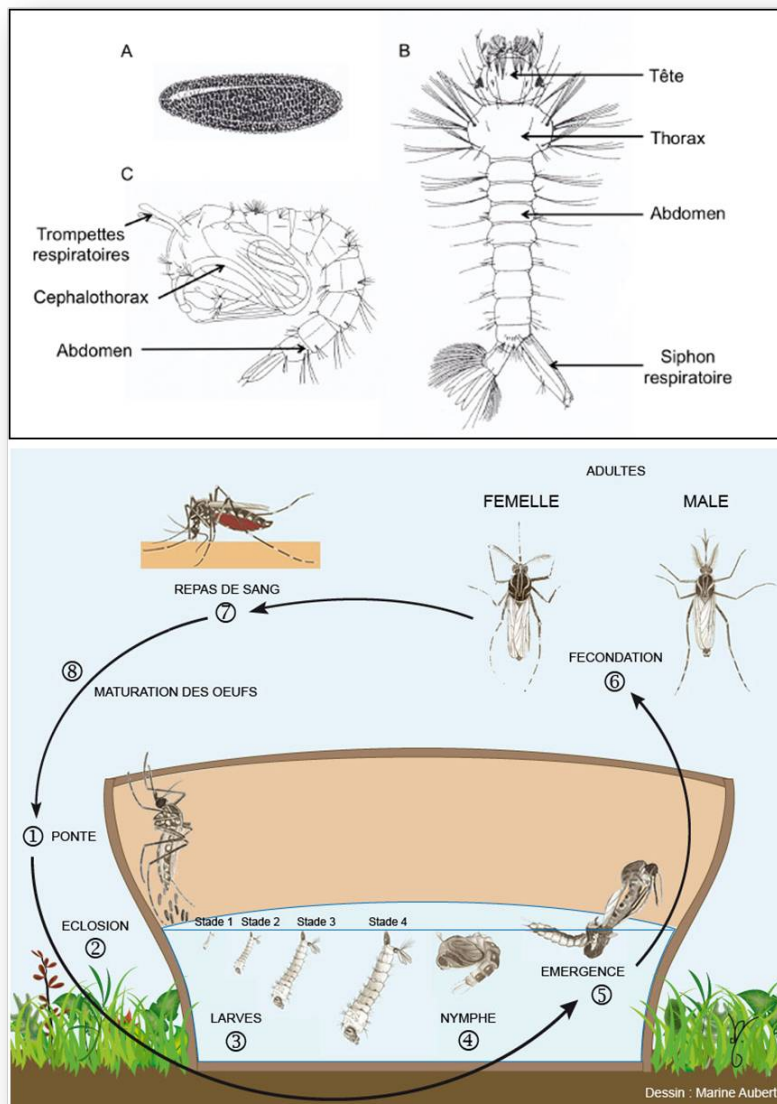


FIGURE 18 – En haut : Morphologie schématique des stades pré-imaginaux du genre *Aedes* : Œuf (A) ; Larve (B) ; Nymphé (C). En bas : Cycle de développement du moustique.

3.2 Distribution, bio-écologie et importance médicale

3.2.1 *Ae. aegypti*

Aedes aegypti (Linné, 1762), vecteur principal de la fièvre jaune, du DENV, du CHIKV et de nombreux autres arbovirus (Annexe 2), est un moustique d'origine africaine (CHRISTOPHERS 1960 ; FAILLOUX *et al.* 2002 ; GUBLER 1998 ; POWERS & LOGUE 2007). En Afrique, deux formes différenciées par des critères morphologiques et éco-éthologiques y sont présentes : (i) *Ae. aegypti*

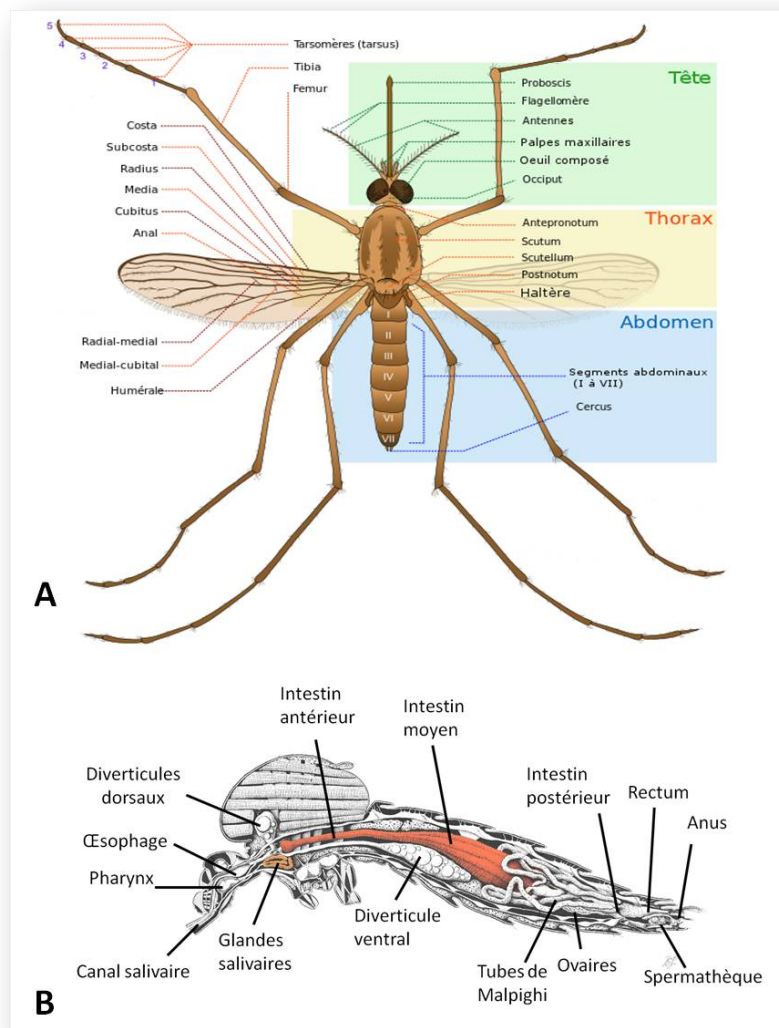


FIGURE 19 – Morphologie (A) et anatomie interne (B) d'une femelle de moustique.

formosus, forme ancestrale sombre de préférences trophiques diverses (homme et animaux), vit aussi bien en milieu forestier qu'urbain, les larves se développant dans des gîtes naturels (creux de rochers, trous d'arbres, aisselles des feuilles) et artificiels (récipients de stockage d'eau); (ii) *Ae. aegypti aegypti*, forme plus claire dite domestique et strictement anthropophile, vit en milieu urbain, les larves se développant dans des gîtes artificiels tels que les pneus usagés, les pots de fleurs, ou les récipients utilisés par l'homme pour stocker l'eau (PAUPY *et al.* 2010).

Ae. aegypti pique de préférence tôt le matin et au crépuscule, pouvant se nourrir sur plusieurs hôtes au cours du même cycle gonotrophique. Quant aux formes pré-imaginales, *Ae. aegypti* s'adapte aussi à des conditions climatiques extrêmes. En effet, il a été montré que des larves pouvaient rester viables après congélation (BLISS & MAY GILL 1933), et que cer-

taines populations se maintiennent dans des régions désertiques où la température peut atteindre 40°C (TYAGI & HIRIYAN 2004). En général, l'abondance d'*Ae. aegypti* est liée à des facteurs abiotiques (*i.e.* température, humidité, photopériode, pluviométrie) et humains. En effet, des facteurs humains comme l'urbanisation incontrôlée, les problèmes socioéconomiques et la carence d'infrastructures de santé publique, peuvent être à l'origine du maintien de ce moustique avec des taux d'infestation élevés dans le milieu urbain des pays émergents et en voie de développement.

Le début de migration de cette espèce n'est pas connu. Il a été suggéré qu'en migrant du centre vers les régions du Nord de l'Afrique, la forme *Ae. aegypti formosus* aurait évolué puis se serait « différenciée » en *Ae. aegypti aegypti* au contact de l'homme (FAILLOUX *et al.* 2002). Du 15^{ème} au 19^{ème} siècle, la traite des esclaves et les échanges maritimes auraient permis à *Ae. aegypti aegypti* d'envahir les Amériques, l'ensemble du bassin Méditerranéen, l'Est et l'Ouest de l'Afrique (LOUNIBOS 2002; SMITH 1956; TABACHNICK 1991). Cependant, il aurait disparu du bassin méditerranéen à cause de l'épandage de DDT (dichloro-diphényl-trichloro-éthane) lors de la lutte contre le paludisme pendant les années 1950-1960 (GUBLER 1998). Au cours du XX^{ème} siècle, *Ae. aegypti* a été introduit en Asie depuis les Amériques (BROWN *et al.* 2013; TABACHNICK 1991). Le transport humain et de matériel pendant la deuxième guerre mondiale a également contribué à l'expansion d'*Ae. aegypti*, notamment dans les îles de l'Océan Pacifique (GUBLER 1998). Aujourd'hui, *Ae. aegypti* est présent essentiellement dans les régions tropicales et subtropicales (45 N- 35 S) africaines, américaines, asiatiques et en Océanie (BRACCO *et al.* 2007; SLOSEK 1986) (Figure 20). En Europe, *Ae. aegypti* est présent sur l'île de Madère (Portugal) et dans le Sud-Est de la Russie et de la Georgie (MEDLOCK *et al.* 2015).

3.2.2 *Ae. albopictus*

L'espèce *Ae. albopictus* (Skuse, 1894) ou « moustique tigre » d'origine asiatique (Smith 1956) a été décrite pour la première fois à Calcutta en Inde. Ce moustique a été longtemps négligé en tant que vecteur d'arboviroses humaines. Cependant, son importance médicale est majeure puisqu'il est capable de transmettre 26 arbovirus de familles différentes (Annexe 2) (PAUPY *et al.* 2009). De plus, *Ae. albopictus* a été impliqué comme vecteur dans plusieurs

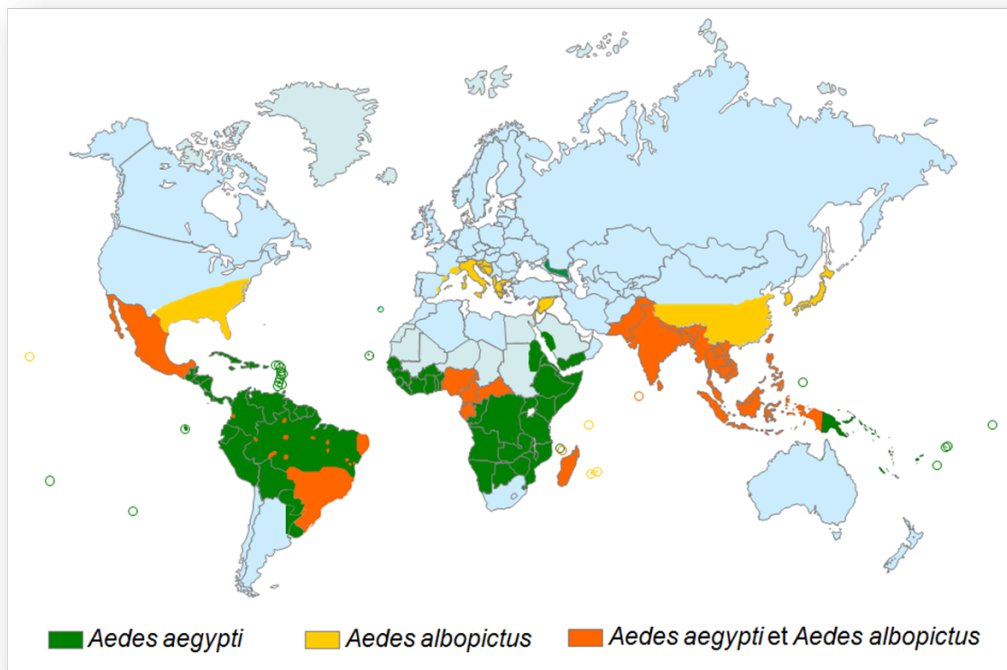


FIGURE 20 – Distribution géographique mondiale d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*.

épidémies de DENV dans des pays où *Ae. aegypti* est absent (GJENERO-MARGAN *et al.* 2011), et il est suspecté de maintenir la circulation du DENV dans certaines zones rurales (*i.e.* Bangkok) (GRATZ 2004). Concernant le CHIKV, il a été impliqué en tant que vecteur principal dans la plupart des épidémies depuis l'épisode de La Réunion (GRANDADAM *et al.* 2011 ; GRATZ 2004 ; REZZA *et al.* 2007 ; SCHUFFENECKER *et al.* 2006).

La répartition de cette espèce se limitait encore au début du XX^{ème} siècle au sous-continent indien, à l'Asie et aux îles de l'Océan Indien (Madagascar, île de La Réunion) (GRATZ 2004). C'est notamment par l'intermédiaire du commerce international qu'au cours des trois dernières décennies, cette espèce s'est répandue sur les cinq continents aussi bien dans des zones tempérées que tropicales (Figure 20) (LOUNIBOS 2002). *Aedes albopictus* peut coloniser aussi bien des gîtes naturels que des gîtes artificiels (PAUPY *et al.* 2009). La diversité de ces habitats larvaires permet d'expliquer l'abondance de cette espèce aussi bien dans les zones rurales que péri-urbaines. Ce moustique présente également des préférences trophiques diverses, piquant indifféremment l'homme et les animaux (*i.e.* amphibiens, reptiles, oiseaux, mammifères) avec deux pics d'agressivité, le matin à l'aube et le soir au crépuscule. Une étude récente a montré que lorsqu'il a le choix, *Ae. albopictus* préfère l'homme à l'animal (DELATTE *et al.* 2010). Des études sur la biolo-

gie d'*Ae. albopictus* ont mis en lumière l'existence d'une forme tropicale et une forme tempérée (HAWLEY *et al.* 1987). En effet, à la différence d'*Ae. aegypti*, certaines populations d'*Ae. albopictus* des régions tempérées sont capables de s'adapter aux températures froides et leurs œufs demeurent viables à des températures basses, avoisinant 5°C (HAWLEY *et al.* 1987). Les œufs peuvent également rentrer en diapause facultative et ainsi passer la saison hivernale dans cet état pour ensuite éclore aux premières pluies du printemps (HANSON & CRAIG 1994 ; MORI & ODA 1981).

La grande plasticité écologique de cette espèce lui confère son caractère invasif aussi bien en régions tropicales qu'en régions tempérées. *Ae. albopictus* a été détecté pour la première fois en Afrique (Nigeria) en 1991 (SAVAGE *et al.* 1992), en Amérique en 1983 (REITER & DARSIE 1984), en Océanie en 1990 (KAY *et al.* 1990) et en Europe (Albanie) en 1979 (ADHAMI & REITER 1998). Pour ce qui est de l'Europe, sa présence a été signalée de façon progressive : en Italie en 1991 (DALLA POZZA & MAJORI 1992), en Belgique en 2000 (SCHAFFNER *et al.* 2004), en Suisse en 2003 (WYMANN *et al.* 2008), en Croatie en 2004 (KLOBUCAR *et al.* 2006), en Espagne en 2004 (ARANDA *et al.* 2006), aux Pays-Bas en 2005 (SCHOLTE *et al.* 2008) et en France en 1999 (SCHAFFNER & KARCH 2000). Bien que l'espèce ait été identifiée pour la première fois en France en Normandie en 1999 (SCHAFFNER & KARCH 2000), ce n'est que depuis 2004 (DELAUNAY *et al.* 2009) que l'espèce s'est implanté durablement dans le sud-est de la France et a commencé une colonisation progressive du pays jusqu'à atteindre 20 départements actuellement (PATY *et al.* 2014). Désormais *Ae. albopictus* est présent dans plus de 20 pays Européens (MEDLOCK *et al.* 2015).

3.3 Principes de génétique des populations et mesures de la variabilité génétique

La génétique des populations repose largement sur la construction de modèles mathématiques. Les modèles de la génétique des populations visent à décrire la manière dont les fréquences des gènes évoluent. Les pressions évolutives responsables de la modification de la structure génétique des populations sont l'objet de la modélisation. La mutation qui représente toute variation héréditaire de l'information génétique a un effet négligeable comparé à celui des

autres pressions évolutives. En effet, le taux de mutation spontanée est très faible : de l'ordre de 10^{-6} mutation par gène et par génération. La mutation représente la seule source de nouveauté génétique et une fois que l'allèle est apparu, sa fréquence dépendra des autres pressions sélectives. La sélection s'exerce sur le phénotype dont l'expression est modulée par des facteurs environnementaux. La migration quant à elle, représente tous les mouvements d'individus entre des populations d'une même espèce. Ces mouvements tendent à homogénéiser les fréquences alléliques. Au total, une population représente un groupe qui minimise le taux de migration tout en gardant une certaine homogénéité. En l'absence d'autres formes de pression évolutive, les fréquences alléliques fluctuent au hasard : c'est la dérive génétique.

La génétique des populations a de nombreuses applications en entomologie médicale qui demeurent essentielles pour la compréhension du rôle joué par les arthropodes vecteurs dans l'épidémiologie des maladies, ainsi que pour l'élaboration des stratégies de contrôle. En effet, elle permet (i) l'évaluation de la variabilité génétique des espèces vectrices et l'estimation de leur capacité d'adaptation aux différentes pressions de sélection, (ii) la reconstruction d'une histoire de colonisation via la détermination des relations phylogénétiques entre les populations ou encore (iii) la détermination du degré d'isolement génétique des populations et la circulation de gènes d'intérêt (*i.e.* gènes de résistance aux insecticides, gènes contrôlant la compétence vectorielle, etc).

Ces multiples applications sont possibles grâce à l'étude de la distribution, de la fréquence, et de l'évolution des gènes et de leurs allèles au sein des populations qui constituent les unités principales à l'échelle desquelles interviennent les processus évolutifs (WALLACE 1968). En effet, les individus d'une espèce ne se répartissent pas au hasard au sein de leur aire de distribution mais selon une structure spatiale liée, entre autres, à l'hétérogénéité du milieu. Les discontinuités spatiales et temporelles des habitats dans lesquels évoluent les individus donnent lieu à la structuration géographique des populations. Deux composantes interviennent dans la structure géographique (RODERICK 1996) : la structure démographique et la structure génétique. La structure démographique tient compte des processus qui influent sur le nombre et la répartition des phénotypes (*i.e.* longévité, naissance, l'immigration, l'émigration), alors que la structure génétique décrit la répartition de la variabilité génétique résultant des pressions évolutives à savoir la migration, la sélection, les mutations, et/ou la dérive génétique. L'analyse de la structure génétique d'une population peut également mettre en lumière les processus démographiques

auxquels elle est soumise. Deux paramètres sont nécessaires pour décrire la constitution ou structure génétique des organismes diploïdes dans les populations (HENRY & GOUYON 1998) : les **fréquences génotypiques** et les **fréquences alléliques**. Les fréquences génotypiques sont les fréquences des différents génotypes au locus considéré. L'ensemble de ces fréquences donne la structure génotypique de la population pour ce locus. Les fréquences alléliques (dites aussi fréquences géniques) correspondent aux fréquences dans la population de différents allèles au locus considéré. Leur connaissance donne la structure allélique (ou génique) de la population.

Les fréquences des génotypes et des allèles sont liées par des relations formalisées par le modèle de Hardy-Weinberg qui est la base de la génétique des populations. Ce modèle propose que les gamètes s'associent au hasard (panmixie) dans des populations de taille infinie. Au sein des populations dites en équilibre de Hardy-Weinberg, les fréquences des gènes ne sont modifiées par aucune force ou pression évolutive (*i.e.* mutation, sélection, migration). Tout écart par rapport à cet équilibre peut alors être analysé en fonction des modèles théoriques élaborés et des facteurs influençant l'évolution de la population analysée. Parmi les facteurs susceptibles de modifier la constitution génétique des populations, on peut citer : le mode de reproduction, la migration, la dérive génétique, la mutation, la sélection ou encore l'effet Wahlund¹

Les différentes populations d'une même espèce peuvent différer d'un point à l'autre de son aire de répartition. Cette variation géographique peut porter sur des caractères morphologiques, physiologiques, écologiques, chromosomiques ou encore sur les fréquences enzymatiques. La variation peut être le fait d'une adaptabilité au milieu, ou encore résulter du simple fait du hasard. La sélection naturelle et la dérive génétique favorisent la différenciation génétique : la première étant dépendante du milieu alors que la seconde en est indépendante. Le flux génétique est un facteur d'homogénéisation qui s'oppose aux effets de la sélection et de la dérive. Divers mécanismes ont été proposés pour expliquer la structuration de l'espèce. Un des modèles a trait à l'isolement géographique c'est-à-dire que la séparation de l'aire géographique d'une espèce en deux zones par une barrière extrinsèque entraîne la divergence génétique des deux populations ainsi séparées. Les deux populations (appelées isolats) explorent des environnements différents, d'où une action différente de la sélection. Les individus des deux popula-

1. Il a lieu lorsque deux ou plus sous-populations panmictiques avec des fréquences alléliques différentes se mélangent. Cela entraîne un écart à l'équilibre de Hardy Weinberg avec un déficit en hétérozygotes par rapport aux fréquences attendues.

tions acquièrent des différences génétiques qui sont par la suite transmises aux générations futures. Les isolats présentent donc une certaine différenciation génétique qui doit intervenir dans les phénomènes de spéciation. Tout cela contribue à la structuration des populations en trois niveaux hiérarchiques : celui de l'individu (I), celui de la sous-population à laquelle il appartient (S) et enfin, celui de la population considérée dans son ensemble (T). L'hétérozygotie génétique (proportion moyenne des individus hétérozygotes à un locus donné parmi les individus de la population) peut être caractérisée à ces différents niveaux par les paramètres suivants :

- H_I : hétérozygotie observée d'un individu dans sa sous-population.
- H_S : hétérozygotie attendue d'un individu dans une sous-population en la supposant en équilibre de Hardy-Weinberg.
- H_T : hétérozygotie attendue d'un individu dans la population globale en la supposant en équilibre de Hardy-Weinberg (si toutes les sous-populations étaient regroupées en une seule unité panmictique).

Ces valeurs d'hétérozygotie permettent le calcul des « statistiques F » qui décrivent la répartition de la variabilité génétique au sein et entre les populations (WRIGHT 1965). À chacun de ces niveaux correspond un coefficient :

- L'indice F_{IS} mesure la réduction éventuelle d'hétérozygotie des individus à l'intérieur de leur sous-population par rapport à l'hétérozygotie attendue à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Si les sous-populations sont à l'équilibre de Hardy-Weinberg, F_{IS} sera nul.

$$F_{IS} = \frac{\overline{H}_S - \overline{H}_I}{\overline{H}_S} \quad (3.1)$$

\overline{H}_S : Moyenne des H_s pour k sous-populations

Si $F_{IS} > 0$ (déficit d'hétérozygotes : consanguinité, homogamie, sélection)

Si $F_{IS} < 0$ (excès d'hétérozygotes : hétérogamie)

- L'indice F_{ST} mesure la réduction d'hétérozygotie dans une sous-population. F_{ST} sera nul (absence de différenciation) si toutes les sous-populations ont la même constitution

allélique. F_{ST} reflète l'action conjuguée de la dérive génétique qui diversifie les populations et de la migration qui tend à les homogénéiser.

$$F_{ST} = \frac{H_T - \bar{H}_S}{H_T} \quad (3.2)$$

Si $F_{ST} > 0$ (sous-populations avec fréquences alléliques différentes)

Enfin, la réduction d'hétérozygotie globale entre l'individu et la population globale théorique est donnée par l'indice :

$$F_{IT} = \frac{H_T - H_I}{H_T} \quad (3.3)$$

Les trois indices sont reliés entre eux par la relation :

$$(1 - F_{IT}) = (1 - F_{IS}(1 - F_{ST})) \quad (3.4)$$

L'étude de la structure génétique des populations et des flux géniques nécessite d'utiliser des marqueurs neutres, soumis à une sélection suffisamment faible pour être négligée. La plus grande difficulté en génétique des populations consiste à trouver des gènes marqueurs dont on puisse évaluer la fréquence avec une résolution adaptée à l'échelle de l'étude (AVISE 2004 ; MAS-COMA & BARGUES 2009). La première technique utilisée depuis 1960 consistait à l'étude du polymorphisme protéique (isoenzymes) par électrophorèse. Grâce au développement des techniques de biologie moléculaire, l'accès à l'information au niveau de l'ADN a permis d'exploiter des portions non codantes du génome. Ainsi, plusieurs techniques telles que les RAPD (*Randomly Amplified Polymorphic DNA*), RFLP (*Restriction Fragments Length Polymorphism*), AFLP (*Amplified Fragments Length Polymorphism*), les marqueurs mitochondriaux et microsatellites ont été développés.

3.3.1 Les Marqueurs Microsatellites

Les microsatellites appelés également SSR (*Simple Sequence Repeat*), STR (*Simple Tandem Repeat*), SSLP (*Simple Sequence Length Polymorphism*) ou Short VNTR (*Short Variable Number of Tandem Repeat*) sont des répétitions en tandem de motifs mono-, di-, tri-, et tétranucléotidique trouvées à différents locus des régions généralement non codantes (HANCOCK 1995). Ils sont très nombreux chez les eucaryotes (on y trouve tous les 10kb) et semblent être distribués de manière aléatoire sur le génome (TAUTZ & RENZ 1984). Les microsatellites sont codominants, non épistatiques, multialléliques et évoluent de manière neutre vis-à-vis de la sélection sans effet sur le phénotype de l'organisme. Le taux de mutation élevé des séquences microsatellites est à l'origine de la variation du nombre de répétitions du motif de base. Deux types de mécanismes moléculaires pourraient être à l'origine du polymorphisme et de variation de taille du motif microsatellite : le glissement des brins lors des processus de réplication (LEVINSON & GUTMAN 1987) et la recombinaison par crossing-over inégaux ou conversion génique (SMITH 1976).

Étant donné que l'ajout ou la délétion de répétitions au sein du microsatellite est un phénomène fréquent, sa taille peut alors évoluer très rapidement. Les microsatellites sont qualifiés comme des marqueurs à évolution très rapide. Ainsi, ils permettent la détection d'une importante variabilité génétique là où d'autres méthodes se sont montrées peu performantes. Ceci constitue un avantage essentiel pour l'étude des populations récemment diversifiées. Bien que possédant les caractéristiques requises pour une utilisation en génétique des populations, les microsatellites comme tout marqueur, présentent quelques inconvénients. Celui qui est le plus souvent décrié est l'existence d'allèles nuls qui peut, dans certains cas, induire des erreurs d'estimation des paramètres décrivant la structure des populations.

Les allèles nuls sont des allèles non amplifiés, et donc non détectables, en raison de mutations au niveau du site d'appariement d'une ou des deux amorces qui diminuent ou empêchent complètement la liaison de l'amorce lors de la PCR (LEHMANN *et al.* 1996). En présence des allèles nuls, les individus hétérozygotes apparaissent comme homozygotes. Il en résulte un excès apparent d'homozygotes pour ce locus. La mise en évidence d'allèles nuls de manière simple se fait en testant le déficit d'hétérozygotes sur plusieurs populations chacune *a priori* panmictique. Le déficit systématique d'hétérozygotes, ainsi que la présence d'individus pour les-

quels aucune amplification n'a lieu (homozygote pour l'allèle nul) informe de la probable existence d'allèles nuls pour ce locus. Plusieurs moyens permettent de s'affranchir de la présence d'un allèle nul tels que le séquençage des régions flanquantes du motif microsatellite (CALLEN *et al.* 1993) ou le choix de nouvelles amorces PCR (LEHMANN *et al.* 1996).

3.4 Colonisation et variabilité génétique d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* en Amérique

3.4.1 *Ae. aegypti*

Comme précédemment exposé, c'est par l'intermédiaire des échanges commerciaux et la traite des esclaves que la forme anthropophile *Ae. aegypti aegypti* a probablement été introduite dans le Nouveau Monde vers le XVI^{ème} siècle. Entre les siècles XVI et XVIII, l'espèce s'est répandue tout au long du continent et déjà vers 1950, tous les pays des Amériques sauf le Canada avaient rapporté la présence d'*Ae. aegypti* (BRACCO *et al.* 2007 ; TABACHNICK 1991). Cette infestation généralisée du continent par *Ae. aegypti* a résulté en une augmentation dramatique du nombre de cas de fièvre jaune, maladie qui frappait le continent depuis le XVII^{ème} siècle (SALUZZO 2009). Face à cette situation, la PAHO (Pan American Health Organization) a entrepris d'éradiquer la fièvre jaune en Amérique dans les années 50. Cela a conduit au déclin des populations d'*Ae. aegypti* dans presque tout le continent dans les années 60, sauf au Suriname, Guyane, Venezuela, Caraïbes et les États-Unis, où l'éradication n'a pas été atteinte notamment à cause des moustiques résistants à l'insecticide DDT (Figure 21) (SCHATZMAYR 2000 ; SOPER 1963). Malheureusement, en raison du manque de fonds et la découverte d'un moyen prophylactique de lutte contre la fièvre jaune, la campagne d'éradication a été arrêtée depuis 1970. L'explosion des transports maritimes et aériens intercontinentaux ont conduit à une ré-infestation des zones colonisées auparavant et à des nouvelles réintroductions de l'espèce (BRACCO *et al.* 2007 ; GUBLER 1998). Depuis la ré-introduction d'*Ae. aegypti* au Brésil en 1975 (SCHATZMAYR 2000), tous les pays d'Amérique du Sud ont été ré-infestés : Bolivie en 1980 (PAUPY *et al.* 2012), Pérou en 1984 (URDANETA-MARQUEZ & FAILLOUX 2011), le nord-est d'Argentine en 1986 (VEZZANI & CARBAJO 2008), Uruguay en 1997 (SALVATELLA AGRELLO 1997) et

le Chili dans les années 2000 (BRACCO *et al.* 2007). En 1995, la répartition d'*Ae. aegypti* a atteint le même niveau qu'avant la campagne d'éradication (GUBLER 1998).

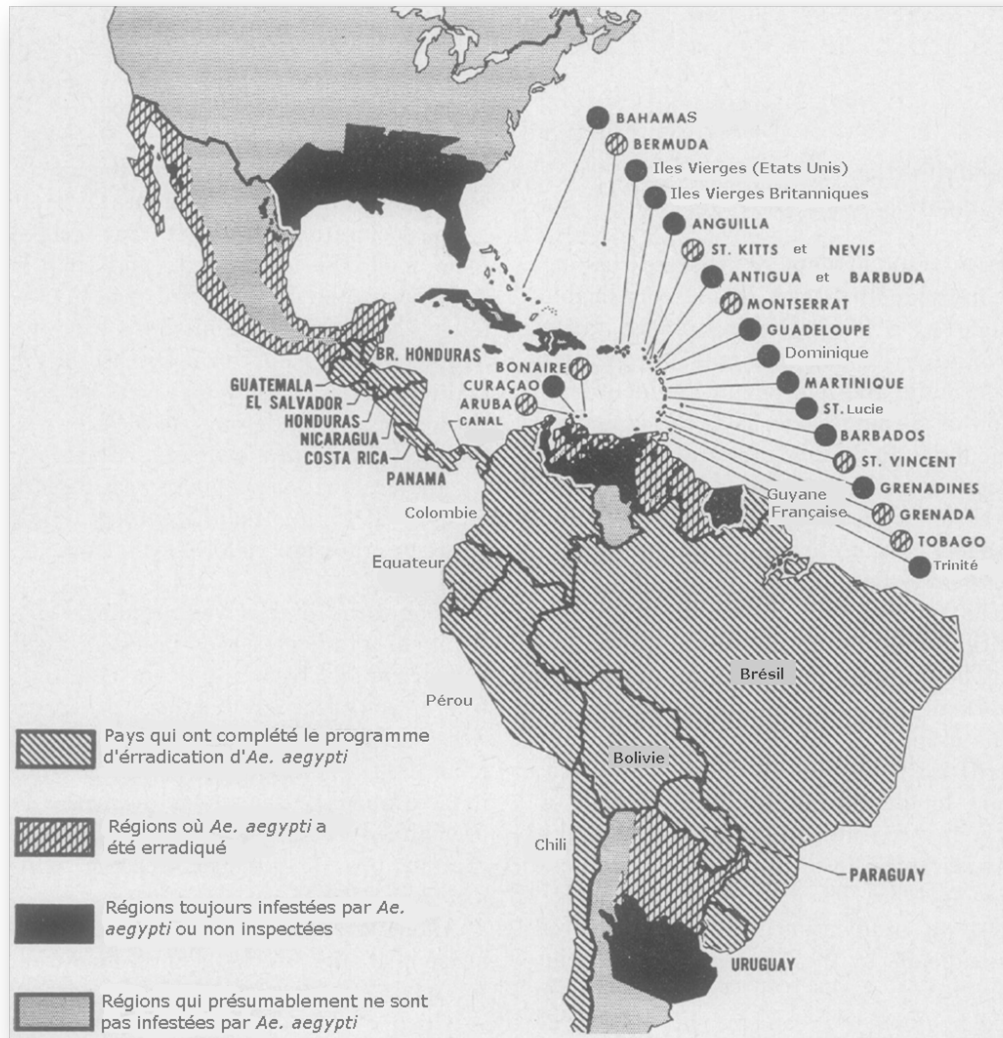


FIGURE 21 – Statut de la campagne d'éradication d'*Ae. aegypti* vers 1961. Adapté de SOPER (1963).

Au cours des 30 dernières années, la structure génétique des *Ae. aegypti* d'Amérique a été étudiée en utilisant un large éventail de marqueurs génétiques allant des isoenzymes à des marqueurs d'ADN (SNPs, microsatellites, nucléaires et ADNmt) (URDANETA-MARQUEZ & FAILLOUX 2011). Ainsi, l'origine africaine des populations d'*Ae. aegypti* en Amérique a été confortée en utilisant des gènes codant des allozymes (TABACHNICK & POWELL 1979), le gène codant la sous-unité 4 de la NADH déshydrogénase mitochondrial (ND4) (BRACCO *et al.* 2007), des gènes nucléaires ou encore des SNP (BROWN *et al.* 2013). Ces études ont également mis en lumière la réduction considérable de la variabilité génétique des *Ae. aegypti*

lors de la campagne d'éradication, en raison du goulot d'étranglement initial, suivi par la forte pression de sélection exercée par l'utilisation du DDT (BRACCO *et al.* 2007; BROWN *et al.* 2013). En utilisant des isoenzymes, des différences génétiques importantes ont été observées entre les populations d'*Ae. aegypti* du Sud-est et Sud-Ouest des États Unis (TABACHNICK & POWELL 1979), ainsi qu'entre les différentes îles des Caraïbes (WALLIS *et al.* 1984). De plus, certaines études basées sur des marqueurs mitochondriaux (ND4, ND5, CO1) et microsatellites ont mis en évidence l'existence des multiples haplotypes et deux lignées génétiques principales d'*Ae. aegypti* en Argentine (DUEÑAS *et al.* 2009), au Brésil (BRACCO *et al.* 2007), au Pérou (DA COSTA-DA-SILVA *et al.* 2005), au Venezuela (HERRERA *et al.* 2006), en Bolivie (PAUPY *et al.* 2012) au Mexique et en Amérique Centrale (GORROCHOTEGUI-ESCALANTE *et al.* 2002). En effet, les populations d'*Ae. aegypti* d'Amérique du Sud, des Caraïbes, du Nord-Est du Mexique et du Texas se regroupent dans un premier clade proche des *Ae. aegypti* d'Afrique de l'Est tandis que les moustiques provenant du Sud-Est des États Unis, du Brésil, du Venezuela et d'autres localités des Amériques semblent plus liés aux moustiques d'Asie et d'Afrique de l'Ouest (Figure 22) (BRACCO *et al.* 2007; URDANETA-MARQUEZ & FAILLOUX 2011). Ces résultats suggèrent la survenue de multiples réintroductions d'*Ae. aegypti* en Amérique à partir de sources diverses avant et après l'arrêt de l'éradication. Deux scénarios possibles de recolonisation des Amériques à partir de 1970 sont généralement proposés : le premier suggère la dispersion des moustiques à partir des pays où l'éradication n'a jamais été atteinte (*i.e.* Venezuela, Suriname, Caraïbes, États Unis), et le deuxième suggère la dispersion des *Ae. aegypti* qui ont survécu au programme intensif de lutte antivectorielle dans des pays où on croyait le vecteur « éradiqué » (BRACCO *et al.* 2007).

3.4.2 *Ae. albopictus*

L'intensification des échanges commerciaux et notamment, le transport de pneus usagés, aurait contribué à l'arrivée d'*Ae. albopictus* en Amérique (REITER 1998). Le premier report d'*Ae. albopictus* sur le continent date de 1983, où une femelle adulte aurait été identifiée au Tennessee, États-Unis (REITER & DARSIE 1984). Puis, en 1985, le premier gîte larvaire d'*Ae. albopictus* est découvert à Houston (Texas, États Unis) (SPRENGER & WUITHIRANYAGOOOL 1986). Les caractéristiques de cette forme tempérée d'*Ae. albopictus* trouvée aux États Unis (*i.e.* sensibilité à la photopériode, résistance au froid), et l'importance des échanges commerciaux de

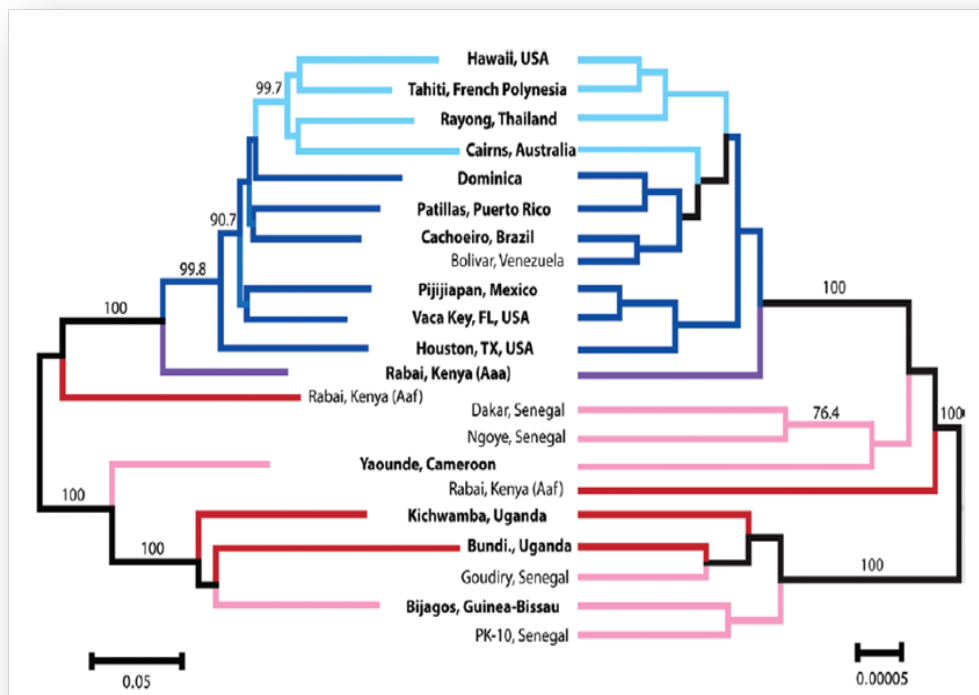


FIGURE 22 – Phylogénie des *Ae. aegypti* basée sur des SNPs (arbre à gauche) et le séquençage des gènes nucléaires (arbre à droite). Les populations d’Afrique de l’Est sont représentées en rouge, les populations de d’Afrique de l’Ouest et Centrale en rose, les populations du Nouveau Monde en bleu foncé et les populations d’Asie-Pacifique en bleu clair. Méthode : Neighbor joining avec bootstrap. Tiré de BROWN *et al.* (2013).

pneus avec le Japon font de ce pays la source probable d’introduction de l’espèce (HAWLEY *et al.* 1987). *Ae. albopictus* s’est rapidement propagé du nord de l’Illinois jusqu’à Jacksonville (Floride) grâce notamment aux échanges commerciaux et le transport routier. En deux ans, il avait déjà colonisé environ 113 comtés à travers les États-Unis (URBANSKI *et al.* 2010). *Ae. albopictus* a alors atteint le Mexique (Matamoros), où les premiers moustiques ont été trouvés en 1988 dans des pneus usagés (CDC 1989). En Amérique du Sud, la présence d’*Ae. albopictus* a été répertoriée pour la première fois au Brésil en 1986 (FORATTINI 1986). Depuis, ce moustique s’est répandu à travers le Brésil et d’autres pays d’Amérique du Sud tels que l’Argentine (1998), la Colombie (1998), le Paraguay (1999), l’Uruguay (2003) et en Venezuela (2009) (CUÉLLAR-JIMÉNEZ *et al.* 2007; NAVARRO *et al.* 2013; SCHWEIGMANN *et al.* 2004). Dans la Caraïbe, la présence d’*Ae. albopictus* a été répertoriée en République Dominicaine en 1993 (PENA *et al.* 2003), à Cuba en 1995 (BROCHE & BORJA 1999), aux Iles Caïman en 1997 (REITER 1998) et à Haïti en 2010 (MARQUETTI FERNÁNDEZ *et al.* 2012). En Amérique Centrale continentale, le

moustique a été reporté au Honduras (WOODALL J. 1995) et au Guatemala (OGATA & LOPEZ SAMAYOA 1996) en 1995, au Salvador en 1996, au Panamá en 2002 (CUÉLLAR-JIMÉNEZ *et al.* 2007) et au Nicaragua en 2003 (LUGO *et al.* 2005).

In fine, *Ae. albopictus* est aujourd'hui présent dans au moins 19 pays d'Amérique (Figure 23). En Amérique du Sud, il est présent au Brésil, Paraguay, Colombie, Venezuela, Trinidad et le nord-est d'Argentine. En Uruguay, quelques *Ae. albopictus* ont été détectés près de la frontière brésilienne, mais la colonisation du pays par cette espèce n'est pas encore confirmée (OLIVEIRA *et al.* 2013). De même, la présence d'*Ae. albopictus* en Bolivie a été signalée par Benedict et collaborateurs en 2007 (BENEDICT *et al.* 2007), mais cela n'a pas été ultérieurement confirmé (CARVALHO *et al.* 2014). *Ae. albopictus* est présent dans tous les pays d'Amérique Centrale continentale (*i.e.* Panama, Costa Rica, Honduras, Nicaragua, Guatemala, El Salvador, Belize), ainsi qu'en République Dominicaine, Cuba, Haïti, Barbados et les Iles Caïman dans la Caraïbe. Sa présence à Puerto Rico est également suspectée (COOK *et al.* 2006). En Amérique du Nord, *Ae. albopictus* est présent au Mexique et aux États Unis (CARVALHO *et al.* 2014).

Plusieurs marqueurs moléculaires ont été employés pour étudier la variabilité génétique d'*Ae. albopictus* en Amérique et surtout pour essayer de retracer l'histoire de la colonisation du continent américain par cette espèce. D'abord, une étude basée sur l'analyse des isoenzymes a suggéré que les populations d'Amérique du Nord (Etats-Unis) et du Sud (Brésil) étaient étroitement liées à des populations japonaises d'*Ae. albopictus*, suggérant ainsi une origine commune de ces populations à partir du Japon (KAMBHAMPATI *et al.* 1991). Ceci a été confirmé par la suite dans une autre étude (URBANELLI *et al.* 2000), qui a suggéré que les « populations tempérées » des États-Unis, le Japon et l'Italie forment un groupe génétique qui est distinct des populations tropicales asiatiques. Plus récemment, l'origine commune des populations d'Amérique du Nord et du Sud a été remise en question en utilisant des marqueurs mitochondriaux (BIRUNGI & MUNSTERMANN 2002). En effet, les populations brésiliennes se sont révélées plus proches génétiquement des populations tropicales d'Asie du Sud-Est que des populations asiatiques tempérées (MOUSSON *et al.* 2005). Des traits biologiques comme la diapause hivernale présentée par les populations d'Amérique du Nord ne sont pas retrouvés dans la majorité des populations brésiliennes (HAWLEY 1988 ; LOUNIBOS *et al.* 2003), ce qui renforce plutôt l'hypothèse des origines différentes pour ces populations d'*Ae. albopictus* (PAUPY *et al.* 2009). Une grande partie des études génétiques révèlent le Brésil comme une grande



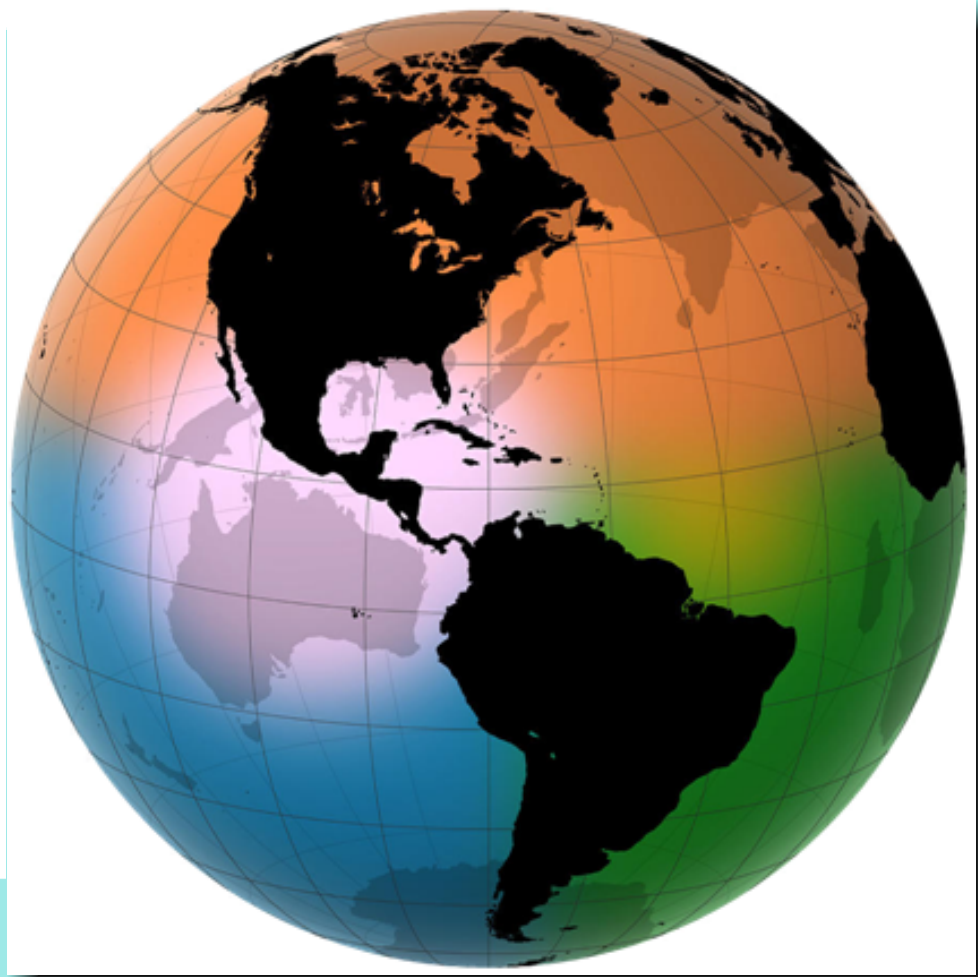
FIGURE 23 – Histoire de la colonisation des Amériques par *Ae. albopictus*. Les chiffres entre parenthèses indiquent la date d'introduction ou du premier report du moustique dans le pays. Adapté de CUÉLLAR-JIMÉNEZ *et al.* (2007) et CARVALHO *et al.* (2014).

source d'importation d'*Ae. albopictus* vers les autres pays d'Amérique du Sud. Par exemple, il a été démontré en utilisant le marqueur mitochondrial ND5 (sous-unité 5 de la NADH déshydrogénase) que les *Ae. albopictus* présents en Colombie ont été probablement introduits lors de deux occasions indépendantes à partir du Brésil, alors que l'introduction au Venezuela a été faite indépendamment à partir du Brésil, des États-Unis ou de l'Asie du Sud-Est (NAVARRO *et al.* 2013). Néanmoins, de manière générale des niveaux faibles de variabilité génétique sont trouvés entre les populations d'*Ae. albopictus* des Amériques avec l'utilisation des mar-

queurs mitochondriaux (*i.e.* ND5, CO1) et d'ADN ribosomal (*i.e.* 5.8S, 18S, 28S) (MAIA *et al.* 2009; MOUSSON *et al.* 2005; RAI 1991). Ceci est probablement du (i) au caractère récent de l'introduction de l'espèce sur le continent américain et de son ultérieure invasion d'un point de vue évolutif et (ii) au flux des gènes à grande échelle tout au long du continent *via* le commerce international, maritime et aérien (MOUSSON *et al.* 2005; NAVARRO *et al.* 2013; RAI 1991). Ainsi, malgré les multiples efforts menés pour étudier la variabilité génétique d'*Ae. albopictus* dans les Amériques, l'histoire de la colonisation exacte du continent par le moustique tigre reste encore à débattre.

Partie 2 : Mémoire Expérimental

Photo : fineartamerica.com



Chapitre 4

CONTENU DU CHAPITRE

Risque potentiel
d'émergence du virus
chikungunya en Amérique

- Ce chapitre présente l'article « 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 », publié dans le « Journal of Virology » en 2014.

Chapitre 4

Risque potentiel d'émergence du virus chikungunya en Amérique

4.1 Contexte

L'intensification des transports transcontinentaux de voyageurs a contribué en partie à étendre la distribution géographique des moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* et par voie de conséquence, des agents pathogènes dont ils sont vecteurs comme le virus chikungunya (CHIKV). Depuis 2004, des épidémies de chikungunya (CHIK) ont été rapportées en Afrique, en Asie, dans les îles de l'Océan Indien, et de façon plus inattendue, en Europe (STAPLES *et al.* 2009). Seule l'Amérique semblait épargnée par ce virus, malgré la présence de fortes densités de moustiques vecteurs et les multiples importations du virus dans le continent par l'intermédiaire de voyageurs infectés de retour des pays où le virus circulait. En effet, entre 1995 et 2009, 109 cas importés de CHIK ont été identifiés aux Etats-Unis dont 13 (12%) ont développé une virémie suffisamment importante pour infecter les moustiques (GIBNEY *et al.* 2011). De plus, suite à l'épidémie de La Réunion, 9 cas importés de CHIK ont été rapportés en 2006 dans les Antilles Françaises (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO) 2007).

Plusieurs éléments indiquent que l'Amérique est une région propice à l'établissement du CHIKV : (i) la population est immunologiquement naïve pour ce virus, (ii) les deux espèces vectrices du CHIKV, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* sont présentes à de fortes densités, coexistant également dans de nombreux territoires, (iii) les cas importés sont rapportés durant les périodes où l'activité des moustiques est à leur maximum, et (iv) les conditions environnementales, notamment la température dans ces régions tropicales et subtropicales, sont favorables au développement des moustiques et à la réplication virale dans le vecteur (BHATT *et al.* 2013; GIBNEY *et al.* 2011). Ainsi, la première partie de ma thèse vise à **évaluer le risque d'émergence du chikungunya sur le continent américain.**

Pour répondre à cette question, une étape essentielle consiste à déterminer l'efficacité de transmission du virus par les moustiques locaux en évaluant leur compétence vectorielle. Comme il a été expliqué dans l'introduction, la compétence vectorielle est un paramètre complexe qui diffère pour chaque couple moustique – agent pathogène. Par conséquent, des populations de moustiques appartenant à la même espèce peuvent avoir des compétences vectorielles différentes vis-à-vis d'un agent pathogène donné. Avant cette étude, la compétence vectorielle des populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* des Amériques vis-à-vis du CHIKV n'est connue que de façon parcellaire. En effet, les études réalisées ont été limitées aux moustiques des Etats-Unis d'Amérique ou des Antilles Françaises ; leur compétence vectorielle a été généralement évaluée en utilisant un seul isolat de CHIKV (GIROD *et al.* 2011 ; REISKIND *et al.* 2008 ; RICHARDS *et al.* 2010).

4.2 Démarche Expérimentale

Afin d'évaluer d'une façon fine et exhaustive le risque d'émergence du CHIKV en Amérique, nous avons effectué une évaluation de la compétence vectorielle des populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* issues de 10 pays d'Amérique continentale vis-à-vis de trois souches de CHIKV appartenant à différents génotypes. Pour cela, 35 populations de moustiques, soit 22 d'*Ae. aegypti* et 13 d'*Ae. albopictus* ont été récoltées en 2012 à l'aide des pondoirs pièges dans des localités s'étendant des Etats-Unis à l'Argentine. Les moustiques ont été ultérieurement élevés dans nos insectariums sous conditions contrôlées : température constante de 28°C, 80% d'humidité relative et une photopériode de 14h :10h. Les femelles âgées de 7 jours ont reçu par la suite un repas artificiel en laboratoire L3. La veille de l'infection expérimentale, du sang de lapin est prélevé, centrifugé et lavé avec du tampon phosphate salin (PBS), afin d'éliminer la fraction sérique du sang et garder uniquement les érythrocytes. Le jour de l'infection expérimentale, un mélange infectieux de titre $10^{7.5}$ PFU/mL est préparé avec 1,4 mL de sang de lapin préchauffé dans un bain-marie à 37°C, de l'ATP à 5 mM (Sigma-Aldrich) et 0,7 mL de suspension de CHIKV. Le mélange infectieux de 2,1 mL est déposé dans une capsule recouverte d'une peau du poulet dégraissée ou d'intestin du porc. Les capsules sont placées pendant 20 min sur les boîtes contenant les femelles qui ingèrent le sang infectieux en piquant au travers de la peau qui recouvre la base de chaque capsule. Au terme du repas infectieux, les femelles pleine-

ment gorgées ont été maintenues jusqu'au 10^{ème} jour post-infection (pi) avec 80% d'humidité et une température de 28°C. Aux jours 7 and 10 pi, 30 femelles sont examinées par condition : (i) la tête de chaque femelle est analysée pour déterminer l'efficacité de dissémination correspondant à la proportion de femelles avec têtes infectées parmi les femelles analysées et (ii) la salive de chaque femelle est analysée pour définir l'efficacité de transmission qui correspond à la proportion de femelles avec la salive infectée parmi les femelles analysées. Les têtes et les salives sont titrées sur cellules C6/36 (VEGA-RUA *et al.* 2013, Annexe 1)

A priori, n'importe quel génotype du CHIKV peut être introduit en Amérique par des voyageurs revenant de pays infectés. Il est donc indispensable de caractériser la capacité des moustiques d'Amérique à transmettre différents génotypes de CHIKV en utilisant différentes souches de ce virus, ce qui permet également d'identifier des réceptivités particulières vis-à-vis d'un génotype déterminé. Ainsi, nous avons utilisé trois souches de CHIKV pour l'infection des moustiques : deux appartenant au génotype Est-Centre-Sud-Africain (ECSA) isolées à La Réunion en 2005 (SCHUFFENECKER *et al.* 2006) et une souche du génotype asiatique isolée en 2011 en Nouvelle Calédonie (DUPONT-ROUZEYROL *et al.* 2012). Les souches appartenant au génotype ECSA diffèrent seulement par une substitution à la position E1-226 : la souche CHIKV_0621 présente une valine (E1-226V) alors que la souche CHIKV_115 présente une alanine dans la même position (E1-226A). La souche CHIKV_NC isolée en nouvelle Calédonie est phylogénétiquement plus distante des deux premières souches, et présente une alanine en position 226 (E1-226A) et une thréonine en position 98 (E1-98T) (DUPONT-ROUZEYROL *et al.* 2012). Les 35 populations de moustiques ont été infectées expérimentalement avec la souche CHIKV_0621, 22 populations (9 *Ae. albopictus* et 13 *Ae. aegypti*) ont été infectées avec la souche CHIKV_115 et 6 populations (3 *Ae. albopictus* et 3 *Ae. aegypti*) ont été infectées avec la souche CHIKV_NC. Les infections expérimentales avec l'isolat CHIKV_0621 ont été faites en priorité en raison du risque élevé que cette souche représentait pour les Amériques au moment où les expériences ont été réalisées (2012-2013). En effet, la majorité des épidémies des 5 dernières années jusqu'à 2012-2013 étaient principalement liées aux souches de CHIKV ayant la substitution E1-A226V (COFFEY *et al.* 2013 ; GRANDADAM *et al.* 2011 ; REZZA *et al.* 2007). Cette circulation importante du virus augmente les risques d'importation des souches virales ayant la substitution E1-226V en Amérique, comme en témoignent les nombreux cas d'importation de CHIKV recensés sur ce continent (GIBNEY *et al.* 2011).

4.3 Résultats

Les résultats obtenus ont fait l'objet d'une publication parue dans la revue « *Journal of Virology* » : **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.** DOI : 10.1128/JVI.00370-14.

4.4 Conclusions

Les populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* d'Amérique continentale ont montré une efficacité de dissémination importante ($\sim 100\%$) des trois isolats de CHIKV, quelle que soit l'origine géographique de la population. Le virus arrive donc à franchir la barrière intestinale de la quasi-totalité des moustiques examinés. Par contre, nous avons observé des différences d'efficacité de transmission entre les populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* d'Amérique, ce qui souligne le rôle clé des glandes salivaires pour moduler la transmission du CHIKV. Comme il a été signalé dans l'introduction, la compétence vectorielle dépend fortement des interactions G x G (génotype du moustique x génotype du virus) et des facteurs environnementaux tels que la température, l'humidité ou encore la photopériode. Dans notre étude, nous avons soumis des moustiques issus des différentes localités à un environnement contrôlé privilégiant l'évaluation des interactions G x G indépendamment des conditions environnementales.

Ce travail montre pour la première fois que la majorité des populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* d'Amérique continentale est capable de transmettre les trois isolats de CHIKV avec des efficacités de transmission modérées ($30\% \geq TE > 70\%$) à hautes ($\geq 70\%$) au jour 7 pi, soulignant ainsi le risque élevé d'établissement et de propagation du CHIKV en Amérique. En effet, une fois le virus importé, il pourra être efficacement transmis par des moustiques locaux quel que soit le génotype viral. Par ailleurs, la transmission virale pourrait avoir lieu assez rapidement puisque des particules de CHIKV ont été retrouvées dans la salive des moustiques à partir du 3ème jour pi. Ces résultats ont été malheureusement confortés avec la détection des premiers cas de CHIK en octobre 2013 sur l'île de Saint-Martin (CASSADOU *et al.* 2014).

Article 1

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

Vega-Rúa, A.

Institut Pasteur/Arboviruses and
Insect Vectors/Université Pierre et
Marie Curie

Zouache, K.

Institut Pasteur/Arboviruses and
Insect Vectors

Girod, R.

Institut Pasteur de la
Guyane/Unité d'Entomologie
Médicale

Failloux, A-B.

Institut Pasteur/Arboviruses and
Insect Vectors

Lourenço-de-Oliveira

Instituto Oswaldo

Cruz/Laboratório de
Transmissores de Hematozoários

Chikungunya virus (CHIKV) causes a major public health problem. In 2004, CHIKV began an unprecedented global expansion and has been responsible for epidemics in Africa, Asia, islands in the Indian Ocean region, and surprisingly, in temperate regions, such as Europe. Intriguingly, no local transmission of chikungunya virus (CHIKV) had been reported in the Americas until recently, despite the presence of vectors and annually reported imported cases. Here, we assessed the vector competence of 35 American *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquito populations for three CHIKV genotypes. We also compared the number of viral particles of different CHIKV strains in mosquito saliva at two different times postinfection. Primarily, viral dissemination rates were high for all mosquito populations irrespective of the tested CHIKV isolate. In contrast, differences in transmission efficiency (TE) were underlined in populations of both species through the Americas, suggesting the role of salivary glands in selecting CHIKV for highly efficient transmission. Nonetheless, both mosquito species were capable of transmitting all three CHIKV genotypes, and TE reached alarming rates as high as 83.3% and 96.7% in *A. aegypti* and *A. albopictus* populations, respectively. *A. albopictus* better transmitted the epidemic mutant strain CHIKV_0621 of the East-Central-South African (ECSA) genotype than did *A. aegypti*, whereas the latter species was more capable of transmitting the original ECSA CHIKV_115 strain and also the Asian genotype CHIKV_NC. Therefore, a high risk of establishment and spread of CHIKV throughout the tropical, subtropical, and even temperate regions of the Americas is more real.

4.5 Article 1

Importance

Until recently, the Americas had never reported chikungunya (CHIK) autochthonous transmission despite its global expansion beginning in 2004. Large regions of the continent are highly infested with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* mosquitoes, and millions of dengue (DEN) cases are annually recorded. Indeed, DEN virus and CHIK virus (CHIKV) share the same vectors. Due to a recent CHIK outbreak affecting Caribbean islands, the need for a Pan-American evaluation of vector competence was compelling as a key parameter in assessing the epidemic risk. We demonstrated for the first time that *A. aegypti* and *A. albopictus* populations throughout the continent are highly competent to transmit CHIK irrespective of the viral genotypes tested. The risk of CHIK spreading throughout the tropical, subtropical, and even temperate regions of the Americas is more than ever a reality. In light of our results, local authorities should immediately pursue and reinforce epidemiological and entomological surveillance to avoid a severe epidemic.

Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is an alphavirus in the family *Togaviridae* that is transmitted by mosquitoes, mainly *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* within an urban

cycle. Since 2004, CHIKV has reemerged in Indian Ocean islands and has caused severe epidemics in several countries in tropical and subtropical regions in Africa and Asia, as well as in temperate Mediterranean areas in Europe (1).

Aedes aegypti is widespread in the Americas, where it is the only confirmed natural dengue virus (DENV) vector (2). Although its geographical distribution is more limited, *A. albopictus* is considered a potential vector in the Americas due to the high level of vector competence of local populations for DENV (3, 4). More than 2 million dengue (DEN) cases are annually reported in the American continent each year (5). The most critical epidemiological situation is that described for South America, which reported more than 1.5 million dengue cases in 2013, with an incidence rate of more than 650 cases/100,000 inhabitants in the South Cone alone (6). Such an epidemiological scenario points to the weakness of mosquito control activities and the high receptivity to introduction and spread of other arboviruses transmitted by both mosquito species like CHIKV in other parts of the continent (1, 7, 8). In fact, as CHIKV and DENV share the same mosquito vector species, epidemic waves caused by both viruses affect the same regions, and human coinfections may occur (9, 10). Moreover, the intensification of intercontinental travel with recurrent returns of dozens of viremic CHIKV cases from af-

fected areas—which may bypass the surveillance systems due to the clinical similarities to other viruses circulating in the Americas—exemplifies the vulnerability of this continent to CHIKV epidemics (11, 12). Indeed, Brazil, Canada, the United States, French Guiana, and the French West Indies (Guadeloupe and Martinique) have reported several imported cases of CHIKV since its reemergence in 2004 (6, 13).

Intriguingly, until December 2013, autochthonous CHIKV transmission had never been reported in the Americas, a continents in which all of the conditions are apparently suitable for its establishment: (i) the Americas are a virgin continent for CHIKV, (ii) the main mosquito vectors of CHIKV, *A. aegypti* and *A. albopictus*, are present at high densities in most areas, (iii) imported cases are annually reported in periods of high mosquito density and activity, and (iv) temperature and environmental conditions of large tropical and subtropical zones are favorable to mosquito development and activity as well as to viral replication in the vector (11, 14). In early December 2013, two laboratory-confirmed autochthonous CHIKV cases were reported in the French territory of Saint-Martin Island in the Caribbean (6). Very rapidly, an epidemic was established on the island, with almost 2,030 clinical cases and more than 765 confirmed cases, and subsequently, some CHIKV cases were de-

tected in Martinique, Guadeloupe, Saint-Barthelemy, and also French Guiana (15). Therefore, CHIKV is progressively spreading, putting at high epidemic risk the vast areas of the Americas infested with *A. aegypti* and *A. albopictus*.

To achieve efficient transmission, numerous factors regarding the invertebrate and the vertebrate hosts, the virus, and the environmental conditions must ideally converge (16). Concerning the mosquito host, vector competence is considered to be unique and characteristic for each virus-vector pair. Indeed differences of vector competence can be found between different populations belonging to a single insect vector species (17). Vector competence is a quantitative phenotypic parameter controlled by genetic characteristics of both vector and virus, which in turn is influenced by environmental conditions (18–20). Mosquito vector competence to CHIKV and DENV seems to be determined by genotype-by-genotype interactions, in which successful transmission depends on some specific combination of mosquito and viral genetic characteristics (21–26). CHIKV has four major lineages: East-Central-South Africa (ECSA), West Africa, Asian, and the Indian Ocean, a monophyletic lineage descendant from the ECSA group (27). The CHIKV lineages have displayed distinct transmission efficiencies in mosquito vector species and populations (25, 28, 29). Throughout the 2005-2006 CHIKV epidemic in the Indian Ocean region,

a CHIKV lineage strain harboring a substitution of an alanine to valine at position 226 of the E1 envelope glycoprotein (E1-A226V) was better transmitted by *A. albopictus* (22, 24). It was later shown that other positions in the E2 glycoprotein exert epistatic effects on the position E1-226V (23), and some substitutions can block the adaptation of E1-226V to *A. albopictus*. These epistatic interactions are lineage specific.

Determination of vector competence of mosquito populations is a key parameter in evaluating the risk of CHIKV transmission and spread. Given the alarming epidemiological situation due to the very recent chikungunya outbreak affecting the Caribbean islands, the need for evaluation of the vector competence of American mosquito populations is compelling. Until now, studies were only limited to mosquitoes from the United States and the French Caribbean (30–33). With the aim of understanding the factors that may influence CHIKV emergence in the Americas and the risk of a CHIKV epidemic spreading throughout the continent, we carried out a comprehensive Pan-American evaluation of vector competence of 35 *A. aegypti* and *A. albopictus* populations from 10 countries toward three CHIKV isolates belonging to two distinct lineages.

Materials and Methods

Ethics statement. The Institut Pasteur animal facility has received accreditation

from the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live animals in compliance of the French and European regulations on care and protection of laboratory animals. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the Institut Pasteur. No specific permits were required for the described field studies in locations that are not protected in any way and did not involve endangered or protected species.

Mosquitoes. Thirty-five mosquito populations collected in 10 countries from North, Central, and South America were used: 22 populations of *A. aegypti* and 13 of *A. albopictus* (Fig. 24; Table 2). The mosquitoes were field collected in 2012 with ovitraps (10 to 58 per collection site). The mosquito collection sites were strategically chosen in order to essentially represent the diverse climates, environments, ecotopes, and dengue epidemiological history across the American continent. The field-collected eggs were immersed in water for hatching; larvae were split by 100 to 150 individuals per pan and fed with yeast tablets. Emerging adults were maintained in cages at $28 \pm 1^\circ\text{C}$ with a 14-h-light/10-h-dark cycle, 80% relative humidity, and supplied with a 10% sucrose solution. The F1 generation was used for all infection assays.

Viral strains. Three CHIKV isolates belonging to two distinct lineages were used: two CHIKV isolates from La Réunion and one from New Caledonia. The isolates from

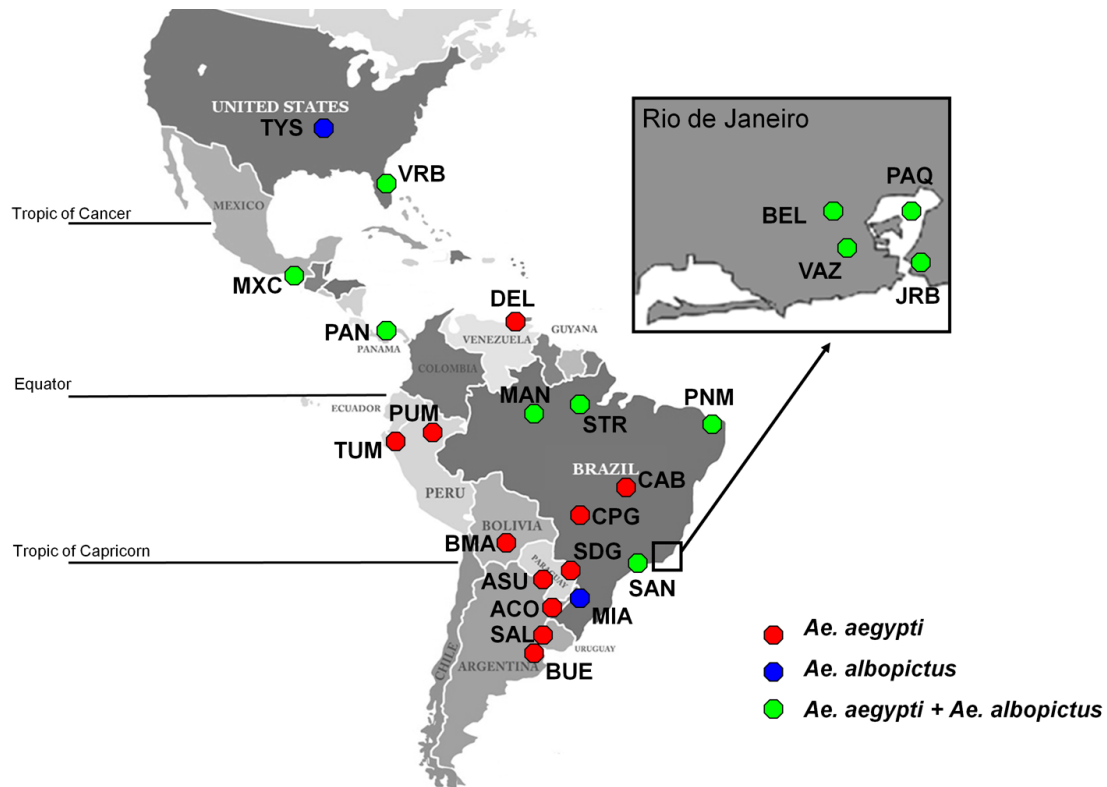


Figure 24: Mosquito populations tested. The color code indicates localities where only *A. aegypti* (red), only *A. albopictus* (blue), and both *A. aegypti* and *A. albopictus* (green) mosquitoes were collected. TYS, Tyson, MO; VRB, Vero Beach, FL; MXC, Chiapas, Mexico; PAN, Panamá, Panama; DEL, Delta Amacuro, Venezuela; TUM, Tumbes, Peru; PUM, Punchana, Peru; MAN, Manaus, Brazil; STR, Santarém, Brazil; PNM, Parnamirim, Brazil; CAB, Campos Belos, Brazil; CPG, Campo Grande, Brazil; JRB, Jurujuba, Brazil; PAQ, Paquetá, Brazil; VAZ, Vaz Lobo, Brazil; BEL, Belford Roxo, Brazil; SAN, Santos, Brazil; BMA, Monteagudo, Bolivia; SDG, Salto del Guairá, Paraguay; ASU, Asunción, Paraguay; SAL, Salto, Uruguay; MIA, Misiones, Argentina; ACO, Corrientes, Argentina; BUE, Buenos Aires, Argentina.

La Réunion were the strains (i) CHIKV 05.115 (CHIKV_115) and (ii) CHIKV 06.21 (CHIKV_0621), both isolated in 2005 (34) and provided by the French National Reference Center for Arboviruses at the Institut Pasteur in Paris. The amino acid consensus sequences of these strains differed by only a single substitution: CHIKV_115 has an alanine at position 226 of the E1 envelope glycoprotein (E1-226A), whereas CHIKV_0621 harbors a valine at the same position (E1-226V). It has been shown the E1-A226V sub-

stitution is located in a region known to be involved in viral entry via fusion with endosomal membranes (35). Both strains have an alanine at position 98 of the E1 glycoprotein (E1-98A) that has been shown to exert no negative epistatic effects on position E1-226; the position E1-98 is located at the base of the fusion loop and presumably modulates the kinetics of the pH-dependent conformational changes and fusion reaction in the endosomal compartment (36). The viral titer estimated by serial 10-fold dilutions on Vero

cells was 10^9 PFU/ml for both CHIKV_115 and CHIKV_0621. Both strains were isolated on *A. albopictus* C6/36 cells from human serum or viral stocks and were produced following three passages on *A. albopictus* C6/36 cells and then harvested and stored at -80°C until used for the mosquito experimental infection assays. The New Caledonia CHIKV strain referenced as NC/2011-568 (CHIKV_NC), was isolated in 2011 (27, 37) and provided by the Institut Pasteur of New Caledonia. Phylogenetic analysis using the complete CHIKV_NC genome nucleotide sequence demonstrated that CHIKV_NC belongs to the Asian lineage, displaying 98.1% nucleotide identity to other isolates of the Asian cluster of CHIKV phylogeny. The CHIKV_NC strain has an alanine at position E1-226 (E1-226A) and a threonine at position E1-98 (E1-98T). It has been shown that in contrast with the ECSA genotype, the substitution E1-98T exerts a negative epistatic interaction leading to blocking the ability of Asian CHIKV strains to adapt to *A. albopictus* via the E1-A226V substitution (24). The whole genome sequence of CHIKV_NC is available in GenBank under accession no. HE806461.

CHIKV_NC 2nd passage was used for the experimental infections of mosquitoes. The titer of CHIKV_NC stocks was $10^{8.1}$ PFU/ml.

Mosquito oral infections. Five-to 7-day-old females were fed on an infectious blood meal containing 2 ml of washed rab-

bit erythrocytes and 1 ml of viral suspension supplemented with a phagostimulant (ATP) at a final concentration of 5 mM. The titer of all performed infectious bloodmeals was $10^{7.5}$ PFU/ml. Mosquito feeding was limited to 50 min. After the infectious blood meal, nonengorged females were discarded. Fully engorged females were transferred in cardboard containers and maintained with 10% sucrose at $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. All 35 mosquito populations were challenged with the CHIKV_0621 strain (13 *A. albopictus* and 22 *A. aegypti* populations), whereas 22 populations (9 *A. albopictus* and 13 *A. aegypti*) were challenged with the CHIKV_115 strain and 6 populations (3 *A. albopictus* and 3 *A. aegypti*) with CHIKV_NC. Mosquito populations from the same location were simultaneously tested with the CHIKV_0621 and CHIKV_115 strains.

Table 2: Mosquito populations used. Populations are listed according to their country of collection, from North to South.

Mosquito population	Collection site	Country	Coordinates	Mosquito species used	Climate	Dominant vegetation	Environment	History of Dengue incidence
TY'S	Tyson	United States	38°31'N 90°33'W	AL	Temperate	Temperate grassland	Suburban	F
VRB	Vero Beach, Florida	United States	27°35'N 80°22'W	AE/AL	Humid subtropical	Subtropical evergreen forest	Urban	F
MXC	Tapachula	Mexico	14°53'N 92°15'W	AE/AL	Tropical wet and dry	Tropical deciduous forest	Suburban	M
PAN	Panamá/Colon	Panama	09°21'N 79°53'W	AE/AL	Tropical wet and dry	Savanna	Urban/Suburban	L
DEL	Delta Amacuro	Venezuela	09°03'N 62°02'W	AE	Tropical wet and dry	Savanna	Suburban	L
PUM	Punchana	Peru	03°43'S 73°15'W	AE	Tropical wet and dry	Amazon forest	Urban	H
TUM	Tumbes	Peru	03°29'S 80°15'W	AE	Arid	Desert	Suburban	L
MAN	Manaus	Brazil	03°06'S 60°03'W	AE/AL	Tropical wet	Amazon forest	Suburban	H
STR	Santarém	Brazil	02°25'S 54°42'W	AE/AL	Tropical wet	Amazon forest	Suburban	M
PNM	Parnamirim	Brazil	05°54'S 35°16'W	AE/AL	Semi-arid	Transitional	Suburban	H
CAB	Campos Belos	Brazil	13°02'S 46°46'W	AE	Tropical wet and dry	Savanna	Urban	L
BEL	Belford Roxo	Brazil	22°45'S 43°24'W	AE/AL	Tropical wet and dry	Atlantic rain forest	Suburban	H
VAZ	VAZ Lobo	Brazil	22°51'S 43°19'W	AE/AL	Tropical wet and dry	Atlantic rain forest	Urban	H
JRB	Jurujuba	Brazil	22°55'S 43°07'W	AE/AL	Tropical wet and dry	Atlantic rain forest	Suburban	L
PAQ	Paquetá	Brazil	22°45'S 43°06'W	AE/AL	Tropical wet and dry	Atlantic rain forest	Suburban island	M
SAN	Santos	Brazil	23°57'S 46°20'W	AE/AL	Tropical wet and dry	Atlantic rain forest	Suburban	M
CPG	Campo Grande	Brazil	20°27'S 54°37'W	AE	Tropical wet and dry	Savanna	Urban	H
BMA	Monteagudo	Bolivia	19°48'S 63°57'W	AE	Tropical wet and dry	Mountain Forest	Urban	L
ASU	Asunción	Paraguay	25°18'S 57°37'W	AE	Tropical wet and dry	Chaco	Urban	M
SDG	Salto del Guairá	Paraguay	24°03'S 54°18'W	AE	Humid subtropical	Savanna	Suburban	L
MIA	Misiones	Argentina	25°36'S 54°34'W	AL	Humid subtropical	Paranaense forest	Rural	L
ACO	Corrientes	Argentina	27°28'S 58°50'W	AE	Humid subtropical	Humid Chaco	Urban	M
BUE	Buenos Aires	Argentina	34°35'S 58°22'W	AE	Temperate	Pampas	Urban	L
SAL	Salto	Uruguay	31°23'S 57°58'W	AE	Temperate	Pampa	Urban	F

AE: *A. aegypti*; AL: *A. albopictus*; F: Free; L: Low; M: Medium; H: High.

Dissemination and transmission analysis. Batches of 30 mosquitoes of each combination of mosquito population and virus strain were analyzed at days 7 and 10 postinfection (p.i.) for all CHIKV strains tested. Days p.i. were defined according to the kinetics of CHIKV dissemination and transmission efficiencies (DE and TE, respectively) in *A. albopictus* mosquitoes from Paquetá, Rio de Janeiro, Brazil (maximum at day 7 p.i. and slight decrease by day 10) (Fig. 25). To estimate viral dissemination, heads were removed from mosquitoes and ground in 250 μ l of Leibovitz L15 medium (Invitrogen) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) for further inoculation onto *A. albopictus* C6/36 cell culture in 96-well plates. After incubation at 28°C for 3 days, plates were stained using hyperimmune ascetic fluid specific to CHIKV as the primary antibody. Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG was used as the second antibody (Life Technologies).

To estimate viral transmission, saliva was collected from individual mosquitoes as described in reference 38. For collection, the wings and legs were removed from each mosquito and the proboscis was inserted into a 20- μ l tip containing 5 μ l of FBS. After 45 min of salivation, FBS containing saliva was expelled into 45 μ l of Leibovitz L15 medium for titration. One limitation of this technique is that the volume of saliva delivered by fe-

males could not be estimated.

Dissemination efficiency (DE) corresponds to the proportion of mosquitoes with virus detected in heads among tested ones (*i.e.*, engorged mosquitoes which have survived until the day of examination). Transmission efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with virus in the saliva among tested ones (*i.e.*, surviving females, including females unable to disseminate the virus and those able to disseminate). The number of infectious particles per saliva sample was estimated by titration using a focus fluorescent assay on *A. albopictus* C6/36 cells. Samples were serially diluted and inoculated onto C6/36 cells in 96-well plates, following incubation at 28°C for 3 days, and then the plates were stained as explained above.

Statistical analysis. Statistical analyses were performed with STATISTICA 8 software (StatSoft, Inc., Tulsa, OK). The numbers of infectious particles in saliva were compared using the Kruskal-Wallis test. Dissemination and transmission efficiencies were compared using the chi-square test. Kruskal-Wallis Z multiple-comparison test was used to compare more than 5 dissemination and transmission efficiency rates.

Results

DE. To measure the ability of American *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes to allow CHIKV to overcome the midgut barrier,

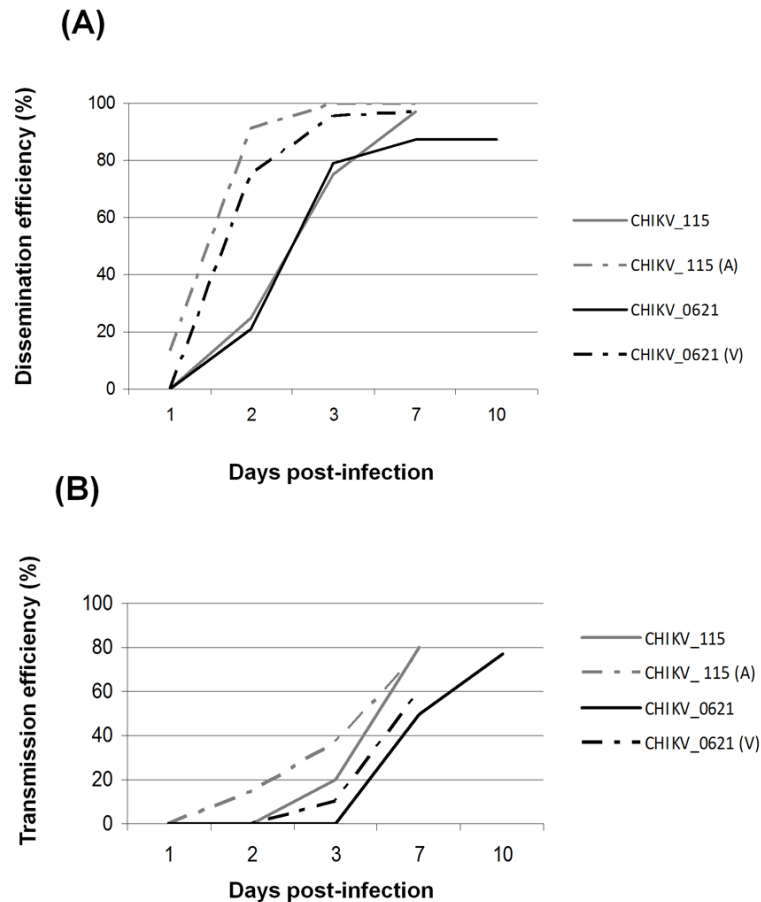


Figure 25: Dissemiation (A) and transmission (B) efficiencies of two CHIKV isolates and two clones of the respective viral isolates in *A. albopictus* mosquitoes from Paquetá, Rio de Janeiro, Brazil. At days 1, 2, 3, 7, and 10 after an infectious blood meal, mosquitoes were sacrificed, and heads and saliva were collected for determination of their infectious status. Mosquito heads were individually ground in 250 μ l Leibovitz L15 medium supplemented with 4% FBS, following inoculation onto an *A. albopictus* C6/36 cell monolayer in 96-well plates and incubation at 28°C for 3 days. Plates were fixed with 3.6% formaldehyde, washed three times with PBS, and analyzed by indirect immunofluorescence assay (IFA). For saliva collection, each mosquito had the wings and legs removed, and the proboscis was inserted into a 20- μ l tip containing 5 μ l of FBS. After 45 min of salivation, FBS containing saliva was expelled into 45 μ l of Leibovitz L15 medium and inoculated onto an *A. albopictus* C6/36 cell monolayer in 96-well plates. Plates were incubated and stained (IFA) as described in Materials and Methods. Dissemiation efficiency corresponds to the proportion of mosquito females with disseminated virus in the head among the tested mosquitoes. Transmission efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among the tested mosquitoes. CHIKV_0621 is a strain isolated from La Réunion (E1-226V substitution), CHIKV_115 is a strain isolated from La Réunion (E1-226A), CHIKV_0621 (V) is a clone corresponding to a single virus isolated from CHIKV_0621, and CHIKV_115 (A) is a clone corresponding to a single virus isolated from CHIKV_115. Clones were provided by C. Arias-Goeta, Institut Pasteur, Paris, France.

dissemination efficiency (DE) was assessed for each pairing of mosquito population and virus strain at days 7 and 10 p.i. (Tables 3 and 4).

All *A. aegypti* and *A. albopictus* popu-

lations showed similar DE values at days 7 and 10 p.i. for the three CHIKV isolates (chisquare test, $P > 0.05$). For CHIKV_0621, DE at day 7 p.i. ranged from 60% to 100%

for *A. albopictus* and from 93.3% to 100% for *A. aegypti*. For CHIKV_115, DE at day 7 varied from 66.7% to 96.9% for *A. albopictus* and from 96.6% to 100% for *A. aegypti*, while for CHIKV_NC, DE ranged from 90% to 96.7% for *A. albopictus* and from 96.9% to 100% for *A. aegypti*. The *A. aegypti* populations tested displayed similar DE values of around 100% for the three CHIKV isolates (chi-square test, $P > 0.05$). Likewise, DE values obtained for *A. albopictus* were extensively high, although rates were significantly heterogeneous for CHIKV_0621 (chi-square test, $P < 0.05$) and CHIKV_115 (chi-square test, $P < 0.05$). Thus, when comparing DE values for a given virus between the two mosquito species sampled in a same location, no significant difference was found, except for MXC in Mexico when infected with CHIKV_0621 (chi-square test, $P < 0.05$) and CHIKV_115 (chi-square test, $P < 0.05$) and for VRB in the United States when infected with CHIKV_115 (chi-square test, $P < 0.05$). In these last three cases, *A. aegypti* exhibited a higher DE than *A. albopictus* collected in the same site whatever the viral strain. In addition, no difference was observed in DE values between the three *A. aegypti* and *A. albopictus* populations challenged with the CHIKV_NC isolate (chi-square test, $P > 0.05$).

TE. In order to determine the ability of American *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes to sustain CHIKV transmission, we assessed transmission efficiency (TE) at

days 7 and 10 p.i. Only TE values at day 7 p.i are presented in Fig. 26 and 27. (For TE values at day 10 p.i., see supplemental material in Annex 3). The TE values obtained for *A. aegypti* and *A. albopictus* were highly heterogeneous and lower than the DE values.

When mosquitoes were exposed to CHIKV_0621, TE values ranged from 13.3% to 96.7% at day 7 p.i. and 6.7% to 85.2% at day 10 p.i. *A. albopictus* better transmitted CHIKV_0621 than *A. aegypti* at day 7 p.i. (mean \pm confidence interval [CI], 44.7% \pm 7.8% for *A. aegypti* and 55.8% \pm 12.3% for *A. albopictus*) and at day 10 p.i. (mean \pm CI, 33.1% \pm 6.2% for *A. aegypti* and 55.5% \pm 12.0% for *A. albopictus*). Within the same mosquito species, TE values were significantly different (chi-square test, $P < 0.05$) at days 7 and 10 p.i. When considering each of the 10 populations where the two species co-exist (VRB, MXC, PAN, MAN, PNM, JRB, PAQ, VAZ, BEL, and SAN), *A. albopictus* exhibited a higher TE than *A. aegypti* when infected with CHIKV_0621, except for the VRB population from Florida (Fig. 26 and 27; see Table A2 in the supplemental material; Annex 3).

When mosquitoes were infected with CHIKV_115, TE values comprised between 11.1% and 82.1% at day 7 p.i. and 10% and 76.7% at day 10 p.i. *A. aegypti* better transmitted CHIKV_115 than *A. albopictus* at day 7 p.i. (mean \pm CI, 49.5% \pm 10.3% for *A. aegypti* and 49.5% \pm 13.6% for *A. albopictus*).

Table 3: Dissemination efficiency of three CHIKV isolates in 22 *A. aegypti* and 13 *A. albopictus* populations from 10 American countries at day 7 post-infection.

Country	Mosquito population	CHIKV_0621		CHIKV_115		CHIKV_NC	
		AE	AL	AE	AL	AE	AL
United States	TYS	ND	96.7% (30)	ND	83.3%(30)	ND	ND
	VRB	100% (30)	93.3% (30)	100% (18)	73.3%* (30)	ND	ND
Mexico	MXC	96.7% (30)	73.3% (30)*	96.7% (30)	66.7% (30)*	ND	ND
Panama	PAN	96.7% (30)	96.7% (30)	96.7% (30)	93.3% (30)	100% (30)	96.7% (30)
Venezuela	DEL	100% (23)	ND	100% (28)	ND	ND	ND
Peru	TUM	100% (30)	ND	ND	ND	ND	ND
	PUM	100% (30)	ND	100% (29)	ND	ND	ND
Brazil	MAN	100% (30)	96.7% (30)	ND	90.3% (31)	100% (30)	90% (30)
	STR	100% (30)	100% (30)	ND	88.4% (26)	ND	ND
	PNM	100% (30)	93.3% (30)	ND	ND	ND	ND
	CAB	100% (30)	ND	ND	ND	ND	ND
	CPG	100% (30)	ND	100% (30)	ND	ND	ND
	JRB	100% (30)	100% (30)	100% (30)	ND	ND	ND
	PAQ	100% (30)	87.1% (31)	100% (30)	96.9% (29)	ND	ND
	VAZ	100% (30)	91.3% (23)	ND	ND	ND	ND
	BEL	100% (30)	90.9%(22)	ND	ND	ND	ND
	SAN	93.3% (30)	100% (30)	ND	87.5% (8)	ND	ND
Bolivia	BMA	100% (30)	ND	100% (30)	ND	ND	ND
Paraguay	SDG	100% (30)	ND	ND	ND	ND	ND
	ASU	100% (30)	ND	96.7% (30)	ND	ND	ND
Uruguay	SAL	100% (30)	ND	100% (30)	ND	ND	ND
Argentina	MIA	ND	60% (30)	ND	66.7% (26)	ND	93.3% (30)
	ACO	100% (30)	ND	100% (30)	ND	ND	ND
	BUE	100% (30)	ND	96.6% (29)	ND	96.9% (33)	ND

Dissemination efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with disseminated virus in heads among tested ones. Numbers of analyzed mosquitoes are shown in parenthesis. AE: *Aedes aegypti*; AL: *Aedes albopictus*; Viral strains: CHIKV_0621 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226V and E1-98A substitutions), CHIKV_115 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226A and E1-98A substitutions) and CHIKV_NC isolated from New Caledonia (Asian genotype, E1-226A and E1-98T substitutions). Mosquito populations (from North to South): **TYS** Tyson (United States), **VRB** Vero Beach (United States), **MXC** Chiapas (Mexico), **PAN** Panamá (Panama), **DEL** Delta Amacuro (Venezuela), **TUM** Tumbes (Peru), **PUM** Punchana (Peru), **MAN** Manaus (Brazil), **STR** Santarém (Brazil), **PNM** Parnamirim (Brazil), **CAB** Campos Belos (Brazil), **CPG** Campo Grande (Brazil), **JRB** Jurujuba (Brazil), **PAQ** Paquetá (Brazil), **VAZ** Vaz Lobo (Brazil), **BEL** Belford Roxo (Brazil), **SAN** Santos (Brazil), **BMA** Monteagudo (Bolivia), **SDG** Salto del Guairá (Paraguay), **ASU** Asuncion (Paraguay), **SAL** Salto (Uruguay), **MIA** Misiones (Argentina), **ACO** Corrientes (Argentina), **BUE** Buenos Aires (Argentina). ND: Not determined. * Statistical differences of DE between the two mosquito species for a given virus ($P < 0.05$)

Within the same mosquito species, TE values were significantly different (chisquare test, $P < 0.05$) at days 7 and 10 p.i. When considering each of the four populations where the two species coexist (VRB, MXC, PAN, and PAQ), one species did not present a clear-cut advantage over the other to transmit CHIKV_115 (Fig. 26 and 27; see see Table A2 in the supplemental material; Annex 3).

Interestingly, among the eight *A. al-*

bopictus populations simultaneously challenged with CHIKV_0621 and CHIKV_115, four showed unexpected higher TE for CHIKV_115 and one displayed equal rates (Fig. 26; see Table A2 in the supplemental material; Annex 3). Remarkably, TE rates were heterogeneous even between *A. albopictus* populations geographically close, *i.e.*, from Rio de Janeiro, Brazil (JRB, PAQ, BEL, and VAZ), when exposed to the same CHIKV_0621 isolate (Fig. 26 and 27).

Table 4: Dissemination efficiency of three CHIKV isolates in 22 *A. aegypti* and 13 *A. albopictus* populations from 10 American countries at day 10 post-infection.

Country	Mosquito population	CHIKV_0621		CHIKV_115		CHIKV_NC	
		AE	AL	AE	AL	AE	AL
United States	TYS	ND	93.3% (30)	ND	63.6%(11)	ND	ND
	VRB	100% (30)	85.7% (7)*	ND	96.7% (30)	ND	ND
Mexico	MXC	93.3% (30)	70.0% (30)*	100% (30)	53.3% (30)***	ND	ND
Panama	PAN	100% (30)	96.7% (30)	96.7% (30)	83.3% (30)	100% (30)	96.7% (30)
Venezuela	DEL	100% (10)	ND	100% (15)	ND	ND	ND
Peru	TUM	100% (30)	ND	ND	ND	ND	ND
	PUM	100% (29)	ND	100% (30)	ND	ND	ND
Brazil	MAN	100% (30)	100% (36)	ND	97.1% (34)	100% (30)	93.3% (30)
	STR	100% (30)	100% (20)	ND	ND	ND	ND
	PNM	100% (30)	90% (30)	ND	ND	ND	ND
	CAB	100% (30)	ND	ND	ND	ND	ND
	CPG	100% (30)	ND	100% (29)	ND	ND	ND
	JRB	100% (30)	100% (30)	100% (30)	ND	ND	ND
	PAQ	100% (30)	87.5% (32)*	100% (30)	ND	ND	ND
	VAZ	96.7% (30)	100% (32)	ND	ND	ND	ND
	BEL	100% (30)	88.9%(27)	ND	ND	ND	ND
	SAN	100% (29)	100% (30)	ND	ND	ND	ND
	Bolivia	BMA	100% (30)	ND	100% (30)	ND	ND
Paraguay	SDG	100% (30)	ND	ND	ND	ND	ND
	ASU	100% (30)	ND	93.3% (30)	ND	ND	ND
Uruguay	SAL	100% (30)	ND	100% (30)	ND	ND	ND
Argentina	MIA	ND	93.3% (30)	ND	80% (30)	ND	96.7% (30)
	ACO	100% (30)	ND	96.7% (30)	ND	ND	ND
	BUE	96.7% (30)	ND	100% (30)	ND	90% (30)	ND

Dissemination efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with disseminated virus in heads among tested ones. Numbers of analyzed mosquitoes are shown in parenthesis. AE: *Aedes aegypti*; AL: *Aedes albopictus*; Viral strains: CHIKV_0621 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226V and E1-98A substitutions), CHIKV_115 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226A and E1-98A substitutions) and CHIKV_NC isolated from New Caledonia (Asian genotype, E1-226A and E1-98T substitutions). Mosquito populations (from North to South): **TYS** Tyson (United States), **VRB** Vero Beach (United States), **MXC** Chiapas (Mexico), **PAN** Panamá (Panama), **DEL** Delta Amacuro (Venezuela), **TUM** Tumbes (Peru), **PUM** Punchana (Peru), **MAN** Manaus (Brazil), **STR** Santarém (Brazil), **PNM** Parnamirim (Brazil), **CAB** Campos Belos (Brazil), **CPG** Campo Grande (Brazil), **JRB** Jurujuba (Brazil), **PAQ** Paquetá (Brazil), **VAZ** Vaz Lobo (Brazil), **BEL** Belford Roxo (Brazil), **SAN** Santos (Brazil), **BMA** Monteagudo (Bolivia), **SDG** Salto del Guairá (Paraguay), **ASU** Asuncion (Paraguay), **SAL** Salto (Uruguay), **MIA** Misiones (Argentina), **ACO** Corrientes (Argentina), **BUE** Buenos Aires (Argentina). ND: Not determined. * Statistical differences of DE between the two mosquito species for a given virus: * (P<0.05); *** (P<0.001).

Finally, when mosquitoes were exposed to the CHIKV_NC strain, TE values varied from 30% to 83.3% at day 7 p.i. and from 26.7% to 53.3% at day 10 p.i. *A. aegypti* better transmitted CHIKV_NC than *A. albopictus* at day 7 p.i. (mean \pm CI, 64.5% \pm 20.7% for *A. aegypti* and 48.9% \pm 25.1% for *A. albopictus*). Within the same mosquito species, TE values were significantly different (chi-square test, $P < 0.05$) at day 7 and not at day 10 p.i. (chisquare test, $P > 0.05$) (see Table A2

in the supplemental material; Annex 3). We also found that 23% to 56% of mosquitoes collected in temperate regions, *A. albopictus* TYS (Tyson, MO) and *A. aegypti* SAL (Salto, Uruguay) and BUE (Buenos Aires, Argentina) were able to efficiently transmit CHIKV_0621. Moreover, *A. aegypti* mosquitoes from the last two sites of the Southern Cone were also competent to efficiently transmit CHIKV_0115 and CHIKV_NC at day 7 p.i., respectively (SAL, 70% for CHIKV_115;

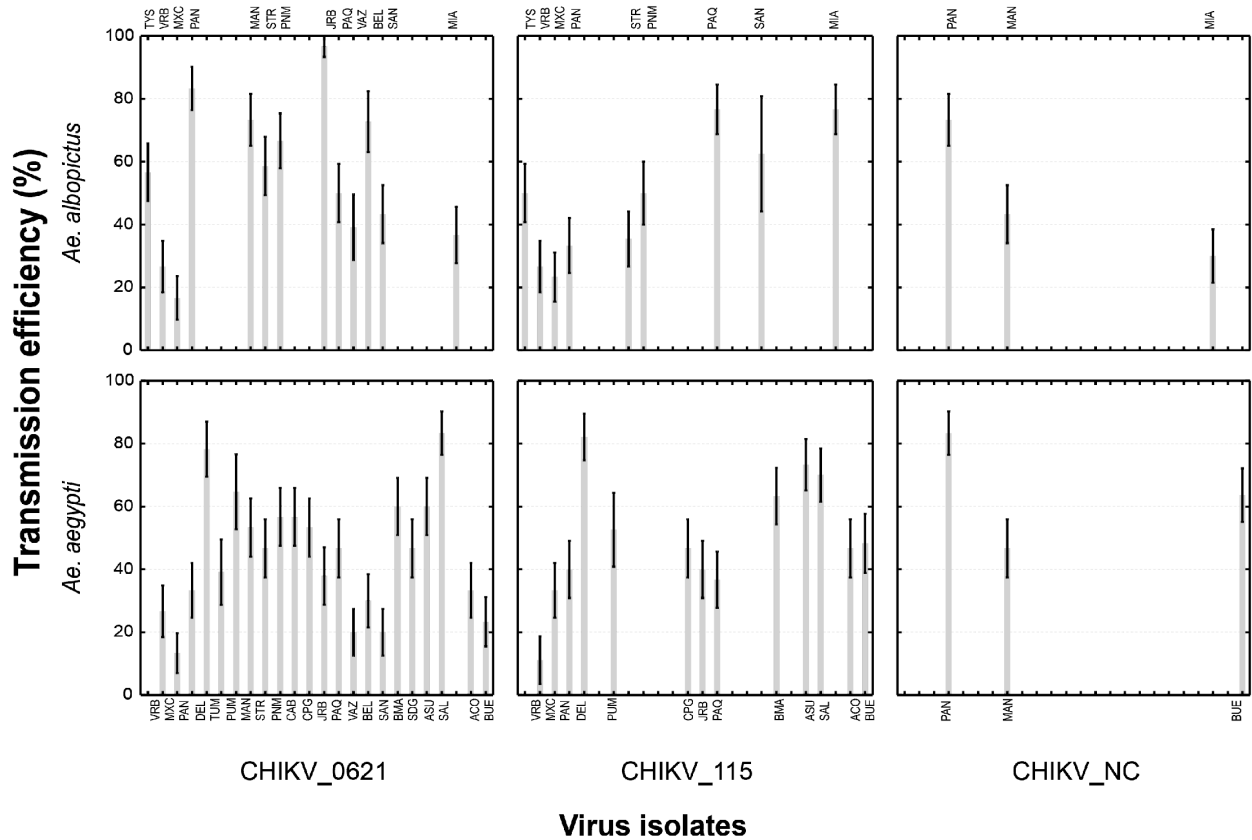


Figure 26: Transmission efficiency of three CHIKV isolates in 35 *A. albopictus* and *A. aegypti* populations from 10 American countries at day 7 post-infection. After an infectious blood meal, mosquitoes were sacrificed and saliva was collected from individual mosquitoes and titrated by focus fluorescent assay on C6/36 *A. albopictus* cells to determine infectious status. Transmission efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among tested ones. Viral strains: CHIKV_0621 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226V and E1-98A substitution), CHIKV_115 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226A and E1-98A substitution) and CHIKV_NC isolated from New Caledonia (Asian genotype, E1-226A and E1-98T substitution). Mosquito populations (from North to South): **TYS** Tyson (United States), **VRB** Vero Beach (United States), **MXC** Chiapas (Mexico), **PAN** Panamá (Panama), **DEL** Delta Amacuro (Venezuela), **TUM** Tumbes (Peru), **PUM** Punchana (Peru), **MAN** Manaus (Brazil), **STR** Santarém (Brazil), **PNM** Parnamirim (Brazil), **CAB** Campos Belos (Brazil), **CPG** Campo Grande (Brazil), **JRB** Jurujuba (Brazil), **PAQ** Paquetá (Brazil), **VAZ** Vaz Lobo (Brazil), **BEL** Belford Roxo (Brazil), **SAN** Santos (Brazil), **BMA** Monteagudo (Bolivia), **SDG** Salto del Guairá (Paraguay), **ASU** Asuncion (Paraguay), **SAL** Salto (Uruguay), **MIA** Misiones (Argentina), **ACO** Corrientes (Argentina), **BUE** Buenos Aires (Argentina). Error bars show the confidence intervals (95%).

BUE, 48.3% for CHIKV_115 and 63.6% for CHIKV_NC).

Intensity of transmission. The intensity of viral transmission can be calculated by estimating the viral load in saliva collected from mosquitoes. When infected with the

CHIKV_0621 isolate, the number of viral particles in saliva ranged from 0.4 to 4.4 log₁₀ particles for *A. albopictus* and from 0.4 to 5.1 log₁₀ particles for *A. aegypti*. Concerning mosquitoes infected with the CHIKV_115 isolate, the number of viral infectious particles varied from 0.4 to 4.7 log₁₀ for *A. albopictus*

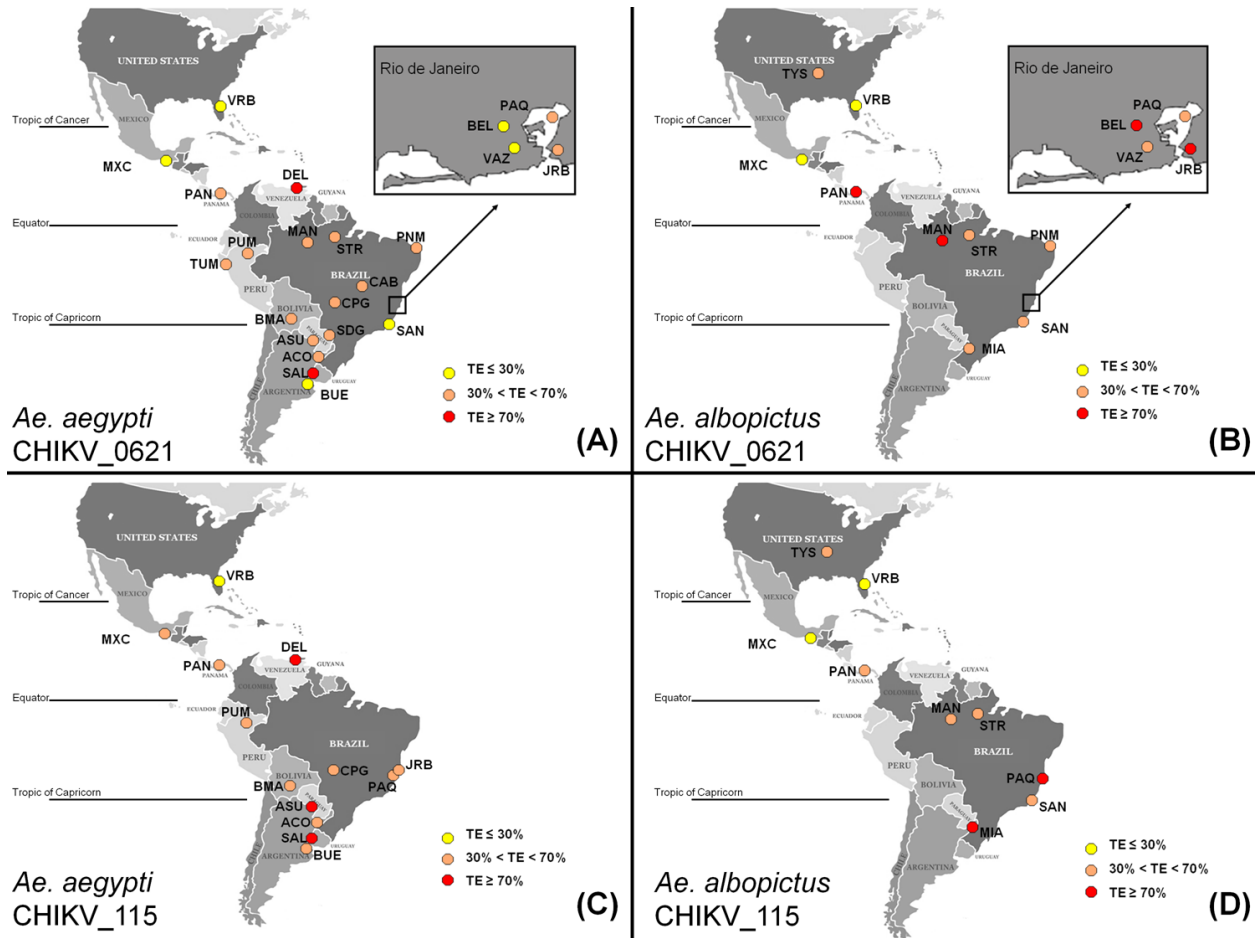


Figure 27: Transmission efficiency of CHIKV_0621 and CHIKV_115 isolates in 35 *A. aegypti* and *A. albopictus* populations from 10 American countries at day 7 post-infection. Transmission efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among tested ones. Color-code indicates different degrees of transmission efficiency (TE): yellow, mosquito strains with $TE \leq 30\%$ (low TE); pale-orange, strains with $30\% < TE < 70\%$ (moderated TE); red, strains with $TE \geq 70\%$ (high TE). Viral strains: CHIKV_0621 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226V substitution) and CHIKV_115 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226A substitution). Mosquito populations (from North to South): **TYS** Tyson (United States), **VRB** Vero Beach (United States), **MXC** Chiapas (Mexico), **PAN** Panamá (Panama), **DEL** Delta Amacuro (Venezuela), **TUM** Tumbes (Peru), **PUM** Punchana (Peru), **MAN** Manaus (Brazil), **STR** Santarém (Brazil), **PNM** Parnamirim (Brazil), **CAB** Campos Belos (Brazil), **CPG** Campo Grande (Brazil), **JRB** Jurujuba (Brazil), **PAQ** Paquetá (Brazil), **VAZ** Vaz Lobo (Brazil), **BEL** Belford Roxo (Brazil), **SAN** Santos (Brazil), **BMA** Monteagudo (Bolivia), **SDG** Salto del Guairá (Paraguay), **ASU** Asuncion (Paraguay), **SAL** Salto (Uruguay), **MIA** Misiones (Argentina), **ACO** Corrientes (Argentina), **BUE** Buenos Aires (Argentina).

tus and from 0.4 to 5.0 \log_{10} for *A. aegypti*. For mosquitoes exposed to CHIKV_NC, the viral load in saliva ranged from 0.4 to 2.9 \log_{10} particles for *A. albopictus* and from 0.4 to 4.2 \log_{10} particles for *A. aegypti* (Fig. 28). Viral loads of the three tested

CHIKV strains were equivalent in *A. aegypti* populations, whereas *A. albopictus* displayed a slightly lower titer when challenged with CHIKV_NC in comparison to CHIKV_0621 and CHIKV_115, both at day 7 p.i. Viral loads were highly heterogeneous between in-

dividuals belonging to the same population and infected with a given viral strain, but the means calculated for each mosquito population were roughly similar overall. Indeed, when comparing viral loads in saliva between mosquito strains for a given virus at days 7 and 10 p.i. (Fig. 28; see Fig. A1 in the supplemental material; Annex 3), no significant differences were found for either *A. aegypti* or *A. albopictus* (Kruskal-Wallis test, $P > 0.05$), except for *A. albopictus* challenged with CHIKV_115.

Discussion

All 35 populations of *A. aegypti* and *A. albopictus* mosquitoes collected throughout the Americas were susceptible to CHIKV infection by all three tested genotypes. Thus, temperate as well as tropical and subtropical North, Central, and South American *Aedes* mosquitoes are efficient CHIKV vectors. *A. albopictus* better transmitted the epidemic CHIKV_0621 strain isolated on La Réunion Island in 2006 (34) than *A. aegypti*, whereas the latter species was more capable at transmitting the original strain, CHIKV_115, both belonging to the ECSA genotype (39). The Asian genotype represented by the CHIKV_NC strain (27) was better transmitted by *A. aegypti*, although it was also efficiently transmitted by *A. albopictus*.

Most American *Aedes* mosquitoes are highly susceptible to CHIKV. More than 60% of mosquitoes per population were

able to disseminate CHIKV after crossing the midgut barrier (*i.e.*, entry in epithelial cells, viral replication, and release of virions from the midgut basal lamina). Thus, after being ingested with a blood meal provided at a titer of $10^{7.5}$ PFU/ml, CHIKV succeeded in disseminating within the mosquito hemocele, which is an essential prerequisite for transmission. It has been shown that a titer of 10^4 PFU/ml in monkeys was sufficient to infect mosquitoes (40). CHIKV transmission was highly heterogeneous in American mosquitoes, ranging from 11.1% to 96.7% at day 7 p.i. when considering all CHIKV strains. It should be underlined that we are not able to provide a control of salivation, and we hypothesize that a CHIKV-negative saliva sample did not correspond to mosquitoes unable to salivate but to mosquitoes delivering noninfected saliva. As expected from previous studies (22, 24, 30, 41), *A. albopictus* better transmitted the epidemic strain CHIKV_0621 of the ECSA genotype than *A. aegypti*, even in cases where both mosquito species cohabit. *A. aegypti* transmitted preferentially CHIKV_115 and also the Asian genotype CHIKV_NC in accordance with previous findings (28). CHIKV Asian strains have a particular E1-98T substitution that constrains CHIKV adaptation to *A. albopictus* via E1-A226V mutation (24). *A. aegypti* mosquitoes are more abundant in the Americas than *A. albopictus* mosquitoes, and the E1-98T substitution of CHIKV viral strains does not have a negative ef-

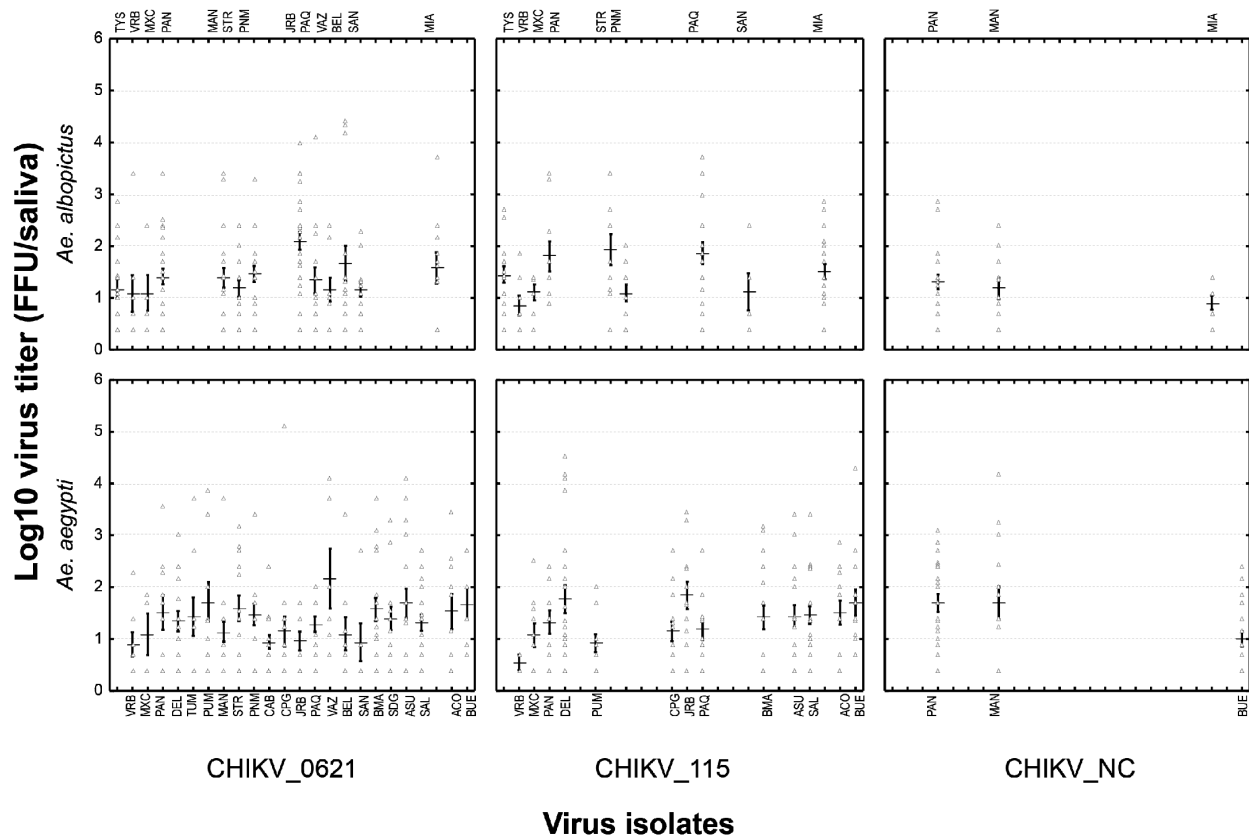


Figure 28: Viral loads of three CHIKV isolates in saliva of *A. albopictus* and *A. aegypti* mosquitoes from 35 populations from the Americas at day 7 postinfection. At day 7 after an infectious blood meal, mosquitoes were sacrificed, and saliva was collected from individual mosquitoes and titrated by focus fluorescent assay on *A. albopictus* C6/36 cells. The viral strains are as follows: CHIKV_0621 was isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226V and E1-98A substitutions), CHIKV_115 was isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226A and E1-98A substitutions), and CHIKV_NC was isolated from New Caledonia (Asian genotype, E1-226A and E1-98T substitutions). The mosquito populations are as follows (from north to south): **TYS**, Tyson, United States; **VRB**, Vero Beach, United states; **MXC**, Chiapas, Mexico; **PAN**, Panamá, Panama; **DEL**, Delta Amacuro, Venezuela; **TUM**, Tumbes, Peru; **PUM**, Punchana, Peru; **MAN**, Manaus, Brazil; **STR**, Santarém, Brazil; **PNM**, Paranamirim, Brazil; **CAB**, Campos Belos, Brazil; **CPG**, Campo Grande, Brazil; **JRB**, Jurujuba, Brazil; **PAQ**, Paquetá, Brazil; **VAZ**, Vaz Lobo, Brazil; **BEL**, Belford Roxo, Brazil; **SAN**, Santos, Brazil; **BMA**, Monteagudo, Bolivia; **SDG**, Salto del Guairá, Paraguay; **ASU**, Asunción, Paraguay; **SAL**, Salto, Uruguay; **MIA**, Misiones, Argentina; **ACO**, Corrientes, Argentina; **BUE**, Buenos Aires, Argentina. Error bars refer to the standard error of the mean titer for each pairing of mosquito population and virus strain.

fect on CHIKV interaction with *A. aegypti*. Thus, CHIKV Asian strains together with the CHIKV ECSA strains represent a real danger to the Americas. Intriguingly, the CHIKV strain isolated during the last outbreak in the Caribbean also belongs to the Asian genotype (42) primarily transmitted in

the past by *A. aegypti*. Although the intensity of transmission is highly variable between mosquitoes, the mean numbers of viral particles delivered by mosquitoes were quite similar for each combination of mosquito strain and viral strain.

Mosquitoes collected in tropical Latin America, Panama, Venezuela, Brazil, Bolivia, Paraguay, Argentina, and Uruguay showed the highest transmission efficiency, with up to 10,000 viral particles detected in mosquito saliva. Interestingly, mosquitoes from the main Brazilian city of Rio de Janeiro showed high transmission efficiencies. For example, 96.7% of *A. albopictus* JRB mosquitoes were able to transmit CHIKV_0621 (see Table A2 in the supplemental material; Annex 3). Moreover, the extrinsic incubation periods of CHIKV (*i.e.*, the time necessary for the virus to be detected in saliva ready for transmission after being ingested with the blood meal [43]), in both mosquito species are quite short (38). Indeed, an *A. albopictus* population from Rio de Janeiro (PAQ) was able to transmit infectious viral particles as rapidly as 2 days p.i. (Fig. 25). Therefore, the risk of CHIKV establishment in densely populated cities, such as Rio de Janeiro, hosting more than 6 million people and infested by anthropophilic *Aedes* mosquitoes, should be considered very high.

Mosquitoes from temperate regions of the Americas are potentially capable of sustaining CHIKV transmission.

The ability of CHIKV to extend its natural range of distribution to include temperate regions was exemplified by the Italian outbreak in 2007 and the French local, autochthonous cases in 2010 (44, 45). In the Americas, more than 100 imported CHIKV cases were

detected in the United States between 1995 and 2009 (11). Some of them developed a viremia high enough to infect mosquitoes. We found that 56.7% of *A. albopictus* TYS mosquitoes from Tyson, MO, and 83.3% of *A. aegypti* SAL mosquitoes from Salto, Uruguay, were able to transmit CHIKV_0621 at day 7 p.i. (see Table A2 in the supplemental material; Annex 3). Transmission efficiencies were lower for *A. aegypti* BUE from Buenos Aires, Argentina (*i.e.*, 23.3%) (Fig. 26; see Table A2), but were higher when infected with the CHIKV_NC Asian genotype (*i.e.*, 63.6%) (Fig. 26; see Table A2). Therefore, the establishment of CHIKV in temperate American countries is not simply a fiction, even if less than 30% of both mosquito species collected in the southern part of the United States (VRB from Florida) were able to transmit CHIKV_0621. It has been found that *A. albopictus* mosquitoes from Florida are more competent vectors of CHIKV than *A. aegypti* (30–32). Outbreaks of DENV, also transmitted by *Aedes* mosquitoes, have occurred in Texas and Florida in the past few years (46), reinforcing the risk of epidemics due to imported arboviruses in the United States. Local transmission of CHIKV could be maintained if the virus is introduced in the right place at the right time. Taken together, these findings underline the high variation of susceptibility to CHIKV of American mosquitoes, calling for the inclusion of other factors (biological and environmental) in assessing potential risk of transmission (47).

Moreover, the mosquitoes' genetic structure should be promptly investigated. Phylogenetic analysis of both mosquito species should bring additional information on the colonization history of *A. aegypti* and *A. albopictus* in the different countries of the Americas (48, 49). *A. aegypti* was most likely introduced in North America during the slave trade (50), while *A. albopictus* was established in 1985 in the United States (51), probably introduced in shipments of used tires from Japan (52), and in Brazil in 1986 (53), probably arriving from tropical Asia (52).

The fear becomes a reality. Still absent until very recently, CHIKV was detected for the first time in the Americas in late December 2013. Currently, among the 2,030 suspected CHIKV cases from the island of Saint-Martin in the Caribbean, more than 765 were confirmed positive for CHIKV by serology (15). The virus then spread to neighboring islands: Saint-Barthelemy with 380 cases, Martinique with 3,940 cases, and Guadeloupe with 1,460 cases. Until now, 10 autochthonous cases have been reported in French Guiana, which maintains a daily air link with the two other French Overseas Territories of Guadeloupe and Martinique. We previously showed that *A. aegypti* mosquitoes from French Guiana and French West Indies were highly competent to disseminate CHIKV and that mosquito populations collected in dense housing environments exhibited the highest susceptibility (34). Thus, the

risk of CHIKV spread and establishment is real and should concern all areas in the Americas where the vector mosquitoes are present.

Cocirculation of CHIKV and DENV could have great implication for human health. Interestingly, DENV is still circulating in the Caribbean, together with CHIKV. Cases of DENV-CHIKV coinfection in patients were first reported in 1967 (54), and since the emergence of CHIKV, reports of coinfections have been increasing (10, 55–63). Both viruses are transmitted by the same mosquito vectors, *A. aegypti* and *A. albopictus*. Coinfection of a mosquito vector by two viruses can occur after two successive infectious blood meals taken from two different viremic hosts or after a single blood meal taken from a coinfecting host. It has been shown that CHIKV and DENV can be delivered together in one mosquito bite (64). As coinfections are a quite common phenomenon, consequences for the clinical presentation of the disease are expected. Finally, the assessment of vector competence should be considered a prerequisite to better evaluate the potential risk of CHIKV outbreaks once the virus is introduced from regions of endemicity. The numerous imported CHIKV viremic cases presaged the potential importance of this emerging arbovirus for the Americas, where both mosquito species are well established. In light of epidemics now starting in the Caribbean, it remains imperative to pursue and reinforce epidemiological

and entomological surveillance actions and control against mosquitoes of the species *A. aegypti* and *A. albopictus*.

Acknowledgments

We thank Anayansi C Valderrama, Carlos Eduardo Borda, Darío Vezzani, Daniel Sánchez-Guillén, Eduardo A. Lestani, Fátima Domingos, Gabriel Sylvestre, Gabriela Willat, Glenda Velásquez, Ima Braga, José Bento Lima, L. Phil Lounibos, Lorenzo Carceres, Marcelo Celestino dos Santos, Márcia Gonçalves de Castro, Maria de Lourdes Macoris, Mário Navarro, Nidia Martínez Acosta, Maria C. Carrasquilla, Maria Ignez L. Bersot, Mirian G. Palomino Salcedo, Mirko Rojas-Cortez, Oscar D. Salomon, Rafael Maciel-de-Freitas, Romeo Humberto Montoya, Sérgio L. Bessa Luz, Steve Juliano, Tamara Chávez Espada, Teresa F. Silva-do-Nascimento, and Yasmin Rubio-Palis for help with mosquito sampling in the field and/or mosquito rearing; Marie Vazeille and Laurence Mousson for technical advice; Myrielle Dupont-Pouzeyrol for providing CHIKV_NC; and Peter Sahlins and Henri Jupille for correcting the manuscript.

This work was funded by CNPq (grants 202106/2011-0 and 306340/2009-7), Instituto Oswaldo Cruz, Institut Pasteur (ACIP grant A-03-2012), and the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative

Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant no. ANR-10-LABX-62-IBEID). A.V.-R. was supported by the French Ministry of Superior Education and Research and K.Z. by the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under the project "VECTORIE", EC grant agreement no. 261466, and the Foundation Inkermann (Fondation de France).

The authors declare that they have neither competing interests nor conflicts of interest related to this article. R.L.-D.-O. and A.-B.F. conceived the study. R.L.-D.-O., A.V.-R., and K.Z. carried out experimental infections of mosquitoes and performed titration assays. A.V.-R., R.L.-D.-O., and A.-B.F. drafted the manuscript. K.Z. and R.G. helped to draft and to revise the manuscript. All authors read and approved the final version of the manuscript.

References

1. **Staples JE, Breiman RF, Powers AM. 2009.** Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clin. Infect. Dis.* 49:942–948. <http://dx.doi.org/10.1086/605496>.
2. **Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, Filippis AMB, Failloux A-B. 2004.** *Aedes aegypti* in Brazil: genetically differentiated populations with high susceptibility to dengue and yellow fever viruses. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 98:43–54. [http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203\(03\)00006-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0035-9203(03)00006-3).
3. **Lourenço-de-Oliveira R, Vazeille M, de Filippis AM, Failloux AB. 2003.** Large genetic differentiation and low variation in vector competence for dengue and yellow fever viruses of *Aedes albopictus* from Brazil, the United States, and the Cayman Islands. *Am. J. Trop.*

Med. Hyg. 69:105–114. <http://www.ajtmh.org/content/69/1/105.long>.

4. **Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP.** 2007. Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7:76–85. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2006.0562>.

5. **Organización Panamericana de la Salud.** Dengue. http://new.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=264&Itemid=363&lang_es. Accessed 6 January 2014.

6. **Organización Panamericana de la Salud.** Epidemiological alert. Chikungunya fever, 9 December 2013. http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&task=doc_view&gid=23806&Itemid=999999&lang_en. Accessed 6 January 2014.

7. **Figueiredo LT.** 2007. Emergent arbovirus in Brazil. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 40:224–229. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000200016>.

8. **Maciel-de-Freitas R, Aguiar R, Bruno RV, Guimarães MC, Lourenço de-Oliveira R, Sorgine MH, Struchiner CJ, Valle D, O'Neill SL, Moreira LA.** 2012. Why do we need alternative tools to control mosquito-borne diseases in Latin America? *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107:828–829. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000600021>.

9. **Mackenzie JS, Chua KB, Daniels PW, Eaton BT, Field HE, Hall RA, Halpin K, Johansen CA, Kirkland PD, Lam SK, McMinn P, Nisbet DJ, Paru R, Pyke AT, Ritchie SA, Siba P, Smith DW, Smith GA, Van den Hurk AF, Wang LF, Williams DT.** 2012. Emerging viral diseases of Southeast Asia and the Western Pacific. *Emerg. Infect. Dis.* 7(Suppl 3):497–504. <http://dx.doi.org/10.3201/eid0707.017703>.

10. **Chahar HS, Bharaj P, Dar L, Guleria R, Kabra SK, Broor S.** 2009. Coinfections with chikungunya virus and dengue virus in Delhi, India. *Emerg. Infect. Dis.* 15:1077–1080. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1507.080638>.

11. **Gibney KB, Fischer M, Prince HE, Kramer LD, St. George K, Kosoy OL, Laven JJ, Staples JE.** 2011. Chikungunya fever in the United States: a fifteen year review of cases. *Clin. Infect. Dis.* 52:e121–e126. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/ciq214>.

12. **Chaves TS, Pellini AC, Mascheretti M, Jahnel MT, Ribeiro AF, Rodrigues SG, Vasconcelos PF, Boulos M.** 2012. Travelers as sentinels for chikungunya fever, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.* 18:529–530. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1803.110838>.

13. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2006. Chikungunya fever diagnosed among international travelers—United States, 2005–2006. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 55:1040–1042. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5538a2.htm>.

14. **Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers F, George DB, Jaenisch T, Wint GRW, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI.** 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496:504–507. <http://dx.doi.org/10.1038/nature12060>.

15. **CIRE Antilles Guyane.** Le chikungunya dans les Antilles-Guyane. Le point épidémiologique, n. 8, 17–23 February 2014. <http://www.invs.sante.fr/fr/Publications-et-outils/Points-epidemiologiques/Tous-les-numeros/Antilles-Guyane/2014/Situation-epidemiologique-du-chikungunya-dans-les-Antilles-Point-au-27-fevrier-2014>. Accessed 27 February 2014.

16. **Lambrechts L, Failloux AB.** 2012. Vector biology prospects in dengue research. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 107:1080–1082. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762012000800022>.

17. **Bennett KE, Olson KE, Muñoz ML, Fernández-Salas I, Farfán JA, Higgs S, Black WC, Beaty BJ.** 2002. Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am. J. Trop.*

Med. Hyg. 67:85–92. <http://www.ajtmh.org/content/67/1/85.long>.

18. **Failloux AB, Vazeille M, Rodhain F.** 2002. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *J. Mol. Evol.* 55:653–663. <http://dx.doi.org/10.1007/s00239-002-2360-y>.

19. **Black WC, IV, Bennett KE, Gorrochótegui-Escalante N, Barrilas-Mury CV, Fernandez-Salas I, Munoz ML, Farfan-Ale JÁ, Olson KE, Beaty BJ.** 2002. Flavivirus susceptibility in *Aedes aegypti*. *Arch. Med. Res.* 33:379–388. [http://dx.doi.org/10.1016/S0188-4409\(02\)00373-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0188-4409(02)00373-9).

20. **Tabachnick WJ.** 2013. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 10:249–277. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph10010249>.

21. **Bosio CF, Fulton RE, Salasek ML, Beaty BJ, Black WC, IV.** 2000. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* 156:687–698. <http://www.genetics.org/content/156/2/687.long>.

22. **Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S.** 2007. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* 3:e201. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>.

23. **Tsetsarkin KA, McGee CE, Volk SM, Vanlandingham DL, Weaver SC, Higgs S.** 2009. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaptation of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *PLoS One* 4:e6835. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0006835>.

24. **Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, Huerre M, Thiria J, Dehecq JS, Fontenille D, Schuffenecker I, Despres P, Failloux AB.** 2007. Two chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2:e1168. <http://dx.doi.org/>

10.1371/journal.pone.0001168.

25. **Lambrechts L.** 2011. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol.* 27:111–114. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.001>.

26. **Volk SM, Chen R, Tsetsarkin KA, Adams AP, Garcia TI, Sall AA, Nasar F, Schuh AJ, Holmes EC, Higgs S, Maharaj PD, Brault AC, Weaver SC.** 2010. Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J. Virol.* 84:6497–6504. <http://dx.doi.org/10.1128/JVI.01603-09>.

27. **Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D'Ortenzio E, Thiberge JM, Baroux N, Gourinat AC, Grandadam M, Failloux AB.** 2012. Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12:1036–1041. <http://dx.doi.org/10.1089/vbz.2011.0937>.

28. **Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, Grandadam M, Failloux AB.** 2013. High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One* 8:e59716. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0059716>.

29. **Arias-Goeta C, Mousson L, Rougeon F, Failloux AB.** 2013. Dissemination and transmission of the E1-226V variant of chikungunya virus in *Aedes albopictus* are controlled at the midgut barrier level. *PLoS One* 8:e57548. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0057548>.

30. **Reiskind MH, Pesko K, Westbrook CJ, Mores CN.** 2008. Susceptibility of Florida mosquitoes to infection with chikungunya virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 78:422–425. <http://www.ajtmh.org/content/78/3/422.full.pdf+html>.

31. **Richards SL, Anderson SL, Smartt CT.** 2010. Vector competence of Florida mosquitoes for chikungunya virus. *J. Vector Ecol.* 35:439–443. <http://dx.doi.org/10.>

1111/j.1948-7134.2010.00105.x.

32. **Pesko K, Westbrook CJ, Mores CN, Lounibos LP, Reiskind MH.** 2009. 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. <http://dx.doi.org/10.1603/033.046.0228>.

33. **Girod R, Gaborit P, Marrama L, Etienne M, Ramdini C, Rakotoarivony I, Dollin C, Carinci R, Issaly J, Dusfour I, Gustave J, Yp-Tcha MM, Yébakima A, Failloux AB, Vazeille M.** 2011. High susceptibility to Chikungunya virus of *Aedes aegypti* from the French West Indies and French Guiana. *Trop. Med. Int. Health* 16:134–139. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02613.x>.

34. **Schuffenecker I, Iteaman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, Vaney MC, Lavenir R, Pardigon N, Reynes JM, Pettinelli F, Biscornet L, Diancourt L, Michel S, Duquerroy S, Guigon G, Frenkiel MP, Bréhin AC, Cubito N, Desprès P, Kunst F, Rey FA, Zeller H, Brisse S.** 2006. Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* 3:e263. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pmed.0030263>.

35. **Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonrhein C, Girard-Blanc C, Crublet E, Thompson A, Bricogne G, Rey FA.** 2010. Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 468:709–712. <http://dx.doi.org/10.1038/nature09555>.

36. **Tsatsarkin KA, Chen R, Leal G, Forrester N, Higgs S, Huang J, Weaver SC.** 2011. Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineagespecific adaptive landscapes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108:7872–7877. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1018344108>.

37. **Alibert A, Pfannstiel A, Grangeon JP.** 2011. Chikungunya outbreak in New Caledonia in. Status report as at 22 August 2011. Informa'Action no. 34. <https://www.spc.int/phs/ENGLISH/Publications/InformACTION/>

IA34/Status_report_Chikungunya_Outbreak_New_Caledonia-22Aug2011.pdf. Accessed 7 January 2014.

38. **Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, Failloux AB.** 2009. Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS One* 4:e5895. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0005895>.

39. **Powers AM, Logue CH.** 2007. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J. Gen. Virol.* 88:2363–2377. <http://dx.doi.org/10.1099/vir.0.82858-0>.

40. **Turell MJ, Beaman JR, Tammariello RF.** 1992. Susceptibility of selected strains of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) to chikungunya virus. *J. Med. Entomol.* 29:49–53.

41. **Martin E, Moutailler S, Madec Y, Failloux AB.** 2010. Differential responses of the mosquito *Aedes albopictus* from the Indian Ocean region to two chikungunya isolates. *BMC Ecol.* 10:8. <http://dx.doi.org/10.1186/1472-6785-10-8>.

42. **Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X.** 2014. Chikungunya in the Americas. *Lancet* 383:514. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)60185-9](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)60185-9).

43. **Kramer LD, Ebel GD.** 2003. Dynamics of flavivirus infection in mosquitoes. *Adv. Virus Res.* 60:187–232. [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3527\(03\)60006-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-3527(03)60006-0).

44. **Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, Panning M, Cordioli P, Fortuna C, Boros S, Magurano F, Silvi G, Angelini P, Dottori M, Ciufolini MG, Majori GC, Cassone A, CHIKV Study Group.** 2007. Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370:1840–1846. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(07\)61779-6](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(07)61779-6).

45. **Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge JM, Souares Y, Failloux AB, Tolou HJ, Budelot M, Cosserat D, Leparc-Goffart I, Desprès P.** 2011. Chikungunya

virus, southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* 17:910–913. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1705.101873>.

46. **Centers for Disease Control and Prevention.** 2010. Locally acquired dengue—Key West, Florida, 2009–2010. *MMWR Morb. Mortal. Wkly. Rep.* 59:577–581. <http://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/mm5919a1.htm>.

47. **Fontenille D, Failloux A-B, Romi R.** 2007. Should we expect chikungunya and dengue in Southern Europe?, p 69–184. In Takken W, Knols BGJ (ed). *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*. Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands.

48. **Bracco JE, Capurro ML, Lourenço-de-Oliveira R, Sallum MA.** 2007. Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 102: 573–580. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762007005000062>.

49. **Mousson L, Dauga C, Garrigues T, Schaffner F, Vazeille M, Failloux AB.** 2005. Phylogeography of *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* (L.) and *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet. Res.* 86:1–11. <http://dx.doi.org/10.1017/S0016672305007627>.

50. **Powell JR, Tabachnick WJ.** 2013. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*—a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 108(Suppl I):11–17. <http://dx.doi.org/10.1590/0074-0276130395>.

51. **Sprenger D, Wuithiranyagool T.** 1986. The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2:217–219.

52. **Hawley WA, Reiter P, Copeland RS, Pumpuni CB, Craig GB, Jr.** 1987. *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science* 236:1114–1116. <http://dx.doi.org/10.1126/science.3576225>.

53. **Consoli RAGB, Lourenço-de-Oliveira R.** 1994. Principais mosquitos de importância sanitária no Brasil. Fiocruz, Rio de

Janeiro, Brazil.

54. **Myers RM, Carey DE.** 1967. Concurrent isolation from patient of two arboviruses, chikungunya and dengue type 2. *Science* 157:1307–1308. <http://dx.doi.org/10.1126/science.157.3794.1307>.

55. **Nayar SK, Noridah O, Paranthaman V, Ranjit K, Norizah K, Chem Mustafa YKB, Chua KB.** 2007. Co-infection of dengue virus and chikungunya virus in two patients with acute febrile illness. *Med. J. Malaysia* 62:335–336. http://www.e-mjm.org/2007/v62n4/Dengue_Virus_Chikungunya_Virus.pdf.

56. **Hapuarachchi HAC, Bandara KBAT, Hapugoda MD, Williams S, Abeyewickreme W.** 2008. Laboratory confirmation of dengue and chikungunya co-infection. *Ceylon Med. J.* 53:104–105. <http://dx.doi.org/10.4038/cmj.v53.i3.252>.

57. **Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes JM, Zeller H, Raoelina Y, Talarmin A, Richard V, Louis Soares J.** 2008. Outbreak of dengue and chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* 14:1135–1137. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1407.071521>.

58. **Schilling S, Emmerich P, Günter S, Schmidt-Chanasit J.** 2009. Dengue and chikungunya virus co-infection in a German traveler. *J. Clin. Virol.* 45:163–164. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2009.04.001>.

59. **Leroy EM, Nkoghe D, Olomo B, Nze-Nkogue C, Becquart P, Grard G, Pourrut X, Charrel R, Moureau G, Ndjoiy-Mbiguino A, De-Lamballerie X.** 2009. Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* 15:591–593. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1504.080664>.

60. **Chang SF, Su CL, Shu PY, Yang CF, Liao TL, Cheng CH, Hu HC, Huang JH.** 2010. Concurrent isolation of chikungunya virus and dengue virus from a patient with coinfection resulting from a trip to Singapore. *J. Clin. Microbiol.* 48:4586–4589. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.01458-10>.

doi.org/10.1128/JCM.01228-10.

61. **Kalawat U, Sharma KK, Reddy SG.** 2011. Prevalence of dengue and chikungunya fever and their co-infection. *Indian J. Pathol. Microbiol.* 54:844-846. <http://dx.doi.org/10.4103/0377-4929.91518>.

62. **Kumar KJ, Manjunath VG, Shailashree M, Girish GN.** 2012. Coinfection with dengue and chikungunya—a case report. *J. Indian Med. Assoc.* 110:749-752.

63. **Caron M, Paupy C, Grard G, Bequart P, Mombo I, Nso BB, Kassa F, Nkoghe D, Leroy EM.** 2012. Recent introduction and rapid dissemination of Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in Gabon, central Africa. *Clin. Infect. Dis.* 55:e45- e53. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis530>.

64. **Vazeille M, Mousson L, Martin E, Failloux AB.** 2010. Orally co-infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 4:e706. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000706>.

Photo : progressivechristianity.org



Chapitre 5

CONTENU DU CHAPITRE

Propagation du virus chikungunya en Amérique et risque d'introduction en Europe

– Ce chapitre présente l'article « Chikungunya virus Transmission Potential by Local *Aedes* Mosquitoes in the Americas and Europe », accepté dans le journal « Plos Neglected Tropical Diseases »

Chapter 5

Propagation du virus chikungunya en Amérique et risque d'introduction en Europe

5.1 Contexte

En Octobre 2013, les premiers cas autochtones du CHIK ont été signalés sur l'île de Saint-Martin dans la Caraïbe. A ce jour, l'épidémie a atteint 43 pays du continent américain avec plus d'un million de cas humains (<http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/americas.html>). La circulation importante du virus menace les régions infestées par *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* à la fois en Amérique et en Europe. En effet, le nombre de cas de CHIK importés d'Amérique vers l'Europe a augmenté de manière significative. La France est un des pays européen ayant le risque le plus élevé en raison des nombreux échanges avec ses territoires d'Outre Mer. Ainsi, entre mai et juillet 2014, 126 cas importés de CHIK en France ont été confirmés en laboratoire (PATY *et al.* 2014).

Curieusement, la souche de CHIKV isolée à partir du premier cas autochtone sur l'île de Saint-Martin, est phylogénétiquement proche des isolats qui ont circulé aux Philippines (2013) et en Chine (2012), suggérant ainsi une importation du virus depuis l'Asie (LEPARC-GOFFART *et al.* 2014). Le CHIKV qui circule actuellement dans la majorité des Amériques appartient donc au génotype Asiatique et non pas au génotype ECSA qui sévissait dans l'Océan Indien en 2006 comme on pouvait s'y attendre. Ceci soulève la question suivante : pourquoi est-ce le génotype asiatique du CHIKV qui a émergé en Amérique et non pas le ECSA, malgré l'importation de ce dernier à plusieurs reprises sur le continent ? Bien que la compétence vectorielle des moustiques en Amérique vis-à-vis de cette souche reste très peu documentée, la réponse à la question énoncée peut probablement reposer sur une réceptivité plus grande des moustiques des Amériques, et particulièrement ceux des Caraïbes vis-à-vis du génotype asiatique.

Autre fait curieux : jusqu'à présent seulement des moustiques *Ae. aegypti* ont été impliqués

comme vecteur dans l'épidémie (MORRISON 2014). Des études précédentes ont démontré que le génotype asiatique de CHIKV est limité dans sa capacité d'adaptation à *Ae. albopictus* (TSETSARKIN *et al.* 2011), conduisant à la spéculation que la propagation du CHIKV asiatique peut être limitée seulement aux régions où *Ae. aegypti* est l'espèce dominante (MORRISON 2014). Néanmoins, l'étude réalisée dans le chapitre 4 de cette thèse montre que les *Ae. albopictus* d'Amérique peuvent transmettre avec une efficacité modérée la souche de génotype asiatique CHIKV_NC isolée en Nouvelle Calédonie en 2011 (DUPONT-ROUZEYROL *et al.* 2012). Bien que la souche isolée en Nouvelle Calédonie ne soit pas identique à celle des Caraïbes (LEPARC-GOFFART *et al.* 2014), il a été démontré que les populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique pouvaient aussi transmettre CHIKV_NC (VEGA-RÚA *et al.* 2014, article 1). Le rôle potentiel des *Ae. albopictus* d'Amérique et d'Europe dans la transmission de la souche épidémique de CHIKV de la Caraïbe doit être évalué, étant donné que cette espèce invasive de moustique est présente dans 19 pays en Amérique et 20 pays européens. Pour préciser si un scénario d'importation et d'établissement du CHIKV asiatique en Europe depuis les Amériques est plausible, l'évaluation de la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* d'Europe est nécessaire.

Ce contexte épidémiologique particulier a motivé la deuxième partie de ma thèse qui vise à **(i) comparer la réceptivité de populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* des Amériques vis-à-vis des souches de CHIKV de génotypes ECSA et asiatique, et (ii) évaluer le risque de transmission locale du CHIKV dans d'autres régions d'Amérique et en Europe en tenant compte des compétences vectorielles des *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* locaux.**

5.2 Démarche Expérimentale

Nous formulons l'hypothèse que dans les Amériques et notamment dans la Caraïbe, les moustiques vecteurs du chikungunya ont une plus grande réceptivité vis-à-vis de souches de CHIKV de génotype asiatique par rapport aux souches ECSA. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons alors comparé la compétence vectorielle de populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* des Amériques vis-à-vis des souches de CHIKV de génotypes ECSA et asiatique. Cette évaluation nous permet également de comparer la compétence vectorielle des populations d'*Ae. aegypti* provenant de localités où le CHIKV circule par rapport aux populations des localités où CHIKV est absent. Ce dernier aspect va permettre d'aborder le deuxième objectif de ce travail qui re-

pose sur l'évaluation du **risque de transmission locale du CHIKV dans d'autres régions d'Amérique et en Europe**. Pour mieux répondre à cet objectif, nous évaluons en parallèle la compétence vectorielle des populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique et de France. Étant donné que les populations d'*Ae. albopictus* de France sont capables de se développer dans des environnements propres au climat tempéré, nous avons entrepris d'évaluer la compétence vectorielle de ces moustiques sous trois régimes de température différents, la température étant un facteur entrant dans l'estimation des interactions G x G x T (génotype moustique x génotype pathogène x température) (ZOUACHE *et al.* 2014).

Ainsi, 11 populations de moustiques provenant des Caraïbes, d'Amérique continentale et de France métropolitaine ont été utilisées : huit populations d'*Ae. aegypti* (États-Unis, Saint-Martin, Les Saintes, Guadeloupe, Martinique, Guyane Française, Macapà, Rio de Janeiro) et trois d'*Ae. albopictus* (États-Unis, Rio de Janeiro, France). Les moustiques ont été prélevés sur le terrain en 2013 à l'aide de pondoires-pièges (10-58 par site de collecte). L'élevage des moustiques a été réalisé par la suite sous des conditions contrôlées comme décrit dans le chapitre 4 (paragraphe "Démarche expérimentale"). La génération F1 de moustiques a été utilisée pour toutes les expériences sauf pour les *Ae. aegypti* de Saint-Martin (génération F3) et des États-Unis (génération F10).

Les femelles âgées de 7 jours ont été infectées expérimentalement avec la souche CHIKV_20235 (CHIKV_SM; génotype asiatique) isolée à partir du premier cas autochtone de CHIKV sur l'île de Saint-Martin (LEPARC-GOFFART *et al.* 2014), ainsi qu'avec la souche CHIKV_0621 (CHIKV_LR) de génotype ECSA (E1-226V) isolée lors de l'épidémie sur l'île de la Réunion en 2005 (SCHUFFENECKER *et al.* 2006). Le titre des repas infectieux a été de 10^7 PFU/ml et chaque souche virale a été administrée séparément dans le repas. Au terme du repas, les femelles pleinement gorgées ont été maintenues jusqu'au 7ème jour pi en incubateur sous 80% d'humidité et une température de $28^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$, sauf pour les *Ae. albopictus* de France, qui ont été incubés sous trois régimes de température différents : (i) température constante de $28^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$, (ii) température constante de $20^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$, et (iii) températures avec des fluctuations journalières entre $17^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ et $23^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$ (moyenne : $20^\circ\text{C} \pm 0.1^\circ\text{C}$) (Figure 29). La température constante de 20°C et le régime de température avec les fluctuations journalières autour de 20°C correspondent aux températures enregistrées lors de l'épidémie de CHIKV en Italie en 2007, (REZZA *et al.* 2007; TILSTON *et al.* 2009), et lors la détection des premiers cas autochtones de CHIKV dans le sud-France en Septembre 2010 (<http://www.meteociel.fr>) (GRAN-

DADAM *et al.* 2011).

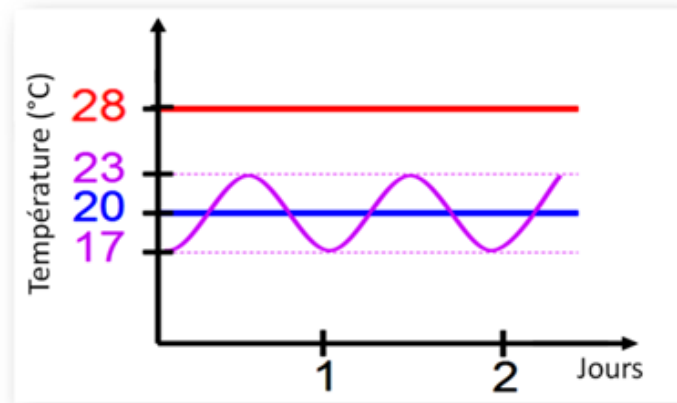


FIGURE 29 – Représentation schématique des régimes de température utilisés pour l'incubation d'*Ae. albopictus* de France après infection expérimentale avec le CHIKV. En rouge : température constante de $28^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. En bleu : température constante de $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$. En violet : températures avec des fluctuations journalières entre $17^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ et $23^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ (moyenne : $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$).

La salive de 20 femelles par condition a été récupérée aux jours 3, 5 et 7 pi, puis titrée sur des cellules C6/36 pour évaluer l'efficacité de transmission, qui correspond à la proportion de femelles avec la salive infectée parmi les femelles analysées. La salive a été récoltée aussi le 2ème jour pi pour *Ae. aegypti* de Saint-Martin et pour *Ae. albopictus* de France, afin de déterminer la période d'incubation extrinsèque de CHIKV_{SM} (temps nécessaire au virus ingéré pour atteindre les glandes salivaires prêt à être émis lors de la pique à un nouvel hôte). Après titrage, la salive des 20 femelles a été groupée par condition et chaque pool a été soumis à un séquençage profond ou « Deep sequencing » dans le but d'analyser la diversité de la population virale dans la salive des moustiques, ce qui peut donner des indications sur l'évolution du virus, ainsi que sur l'adaptation du virus au vecteur.

5.3 Résultats

Les résultats obtenus font l'objet d'une publication acceptée dans la revue « *Plos Neglected Tropical Diseases* » : **Chikungunya Virus Transmission Potential by Local *Aedes* Mosquitoes in the Americas and Europe.**

5.4 Conclusions

Cette étude a révélé qu'*Ae. aegypti* de Saint-Martin transmet de façon similaire les souches de CHIKV appartenant aux génotypes Asiatique et ECSA, ce qui démontre que les souches de CHIKV du génotype ECSA auraient pu aussi être à l'origine de la première chaîne de transmission autochtone de CHIKV dans le Nouveau Monde. Par contre, nous avons observé des différences de patterns de transmission des deux souches virales entre *Ae. aegypti* de la Caraïbe et d'Amérique continentale. En outre, les expériences de « Deep sequencing » révèlent que la population virale détectée dans la salive d'*Ae. aegypti* de Saint-Martin avait un nombre plus élevé de mutations synonymes par rapport aux autres populations de moustiques, suggérant que la souche CHIKV_SM était probablement adaptée à *Ae. aegypti* de Saint-Martin. Enfin, l'ensemble des résultats suggère rétrospectivement que l'émergence de CHIKV dans le Nouveau Monde et la propagation rapide à travers les Caraïbes sont dues à un CHIKV_SM naturellement bien adapté à *Ae. aegypti* de l'île de Saint-Martin, ainsi qu'à la capacité des moustiques des Antilles de transmettre des souches asiatiques de CHIKV.

Notre analyse du risque de propagation du CHIKV qui circule dans la Caraïbe révèle que l'épidémie de CHIKV en cours dans les Amériques pourrait se propager rapidement à travers les régions du continent où *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* sont présents, avec des conséquences possibles pour les régions d'Europe infestées avec *Ae. albopictus*. En effet, les populations d'*Ae. aegypti* des Amériques présentent des efficacités de transmission modérées voire importantes (30%-70%) vis-à-vis du CHIKV_SM, soulignant ainsi l'éventualité d'une propagation rapide vers des localités où ce virus ne circule pas encore (*e.g.* Rio de Janeiro). De plus, les populations d'*Ae. albopictus* des Amériques transmettent la souche CHIKV_SM avec une efficacité comparable à celle d'*Ae. aegypti* du même continent, ce qui souligne le rôle potentiel d'*Ae. albopictus* dans la propagation de l'épidémie en cours dans les Amériques au delà des territoires où *Ae. aegypti* est l'espèce dominante.

L'évaluation de la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* de Bar-sur-Loup (sud de la France) a révélé que cette espèce de régions tempérées est capable de transmettre les deux souches de CHIKV à 28°C, ce qui souligne la possibilité d'émergence du CHIKV même en Europe. Néanmoins, lorsque *Ae. albopictus* de Bar-sur-Loup est incubé à 20°C après infection, température relevée lors la détection des premiers cas autochtones de CHIKV dans le

Sud de la France en Septembre 2010, la compétence vectorielle vis-à-vis de CHIKV_{SM} a diminué considérablement. En effet, le CHIKV_{SM} a été détecté tardivement au jour 7 pi dans 10% des salives issues de moustiques incubés à une température constante, et dans 30% des salives pour les moustiques incubés avec à un régime de température soumis à des fluctuations journalières autour de 20°C. Ces résultats contrastent avec ceux obtenus par Zouache et al. (2014), où *Ae. albopictus* de Bar sur Loup est capable de mieux transmettre le génotype ECSA à 20°C qu'à 28°C. La détection des cinq cas autochtones de CHIKV de génotype ECSA (I. Leparc-Goffart, communication personnelle, Octobre 2014) à Montpellier en fin Octobre 2014 (<http://www.invs.sante.fr>) conforte ce résultat. En effet, malgré les centaines de personnes infectées par CHIKV rentrant en France de la Caraïbe, aucune transmission autochtone de ce virus n'a eu lieu. Il semblerait donc que les souches de CHIKV appartenant au génotype ECSA soient les plus propices à émerger en France. Bien que le risque soit moindre par rapport aux souches ECSA, les souches asiatiques de CHIKV pourraient aussi émerger en France dans les périodes de forte activité des moustiques où les températures excèdent 20°C (*i.e.* de juin à octobre).

Article 2

Chikungunya Virus Transmission Potential by Local *Aedes* Mosquitoes in the Americas and Europe

Vega-Rúa, A.^{1,2}

Ricardo Lourenço-de-Oliveira³

Laurence Mousson¹

Marie Vazeille¹

Sappho Fuchs¹

André Yébakima⁴

Joel Gustave⁵

Romain Girod⁶

Isabelle Dusfour⁶

Isabelle Leparc-Goffart⁷

Dana L Vanlandingham^{8,9}

Yan-Jang S Huang⁹

L Philip Lounibos¹⁰

Souand Mohamed Ali^{11,12}

Antoine Nougairede^{11,12}

Xavier de Lamballerie^{11,12}

Anna-Bella Failloux¹

1. Pasteur, Arboviruses and Insect Vectors, Paris, France
2. Université Pierre et Marie Curie
3. Laboratório de Transmissores de Hematozoários, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, Brazil
4. Centre de Démoustication/Conseil Général de La Martinique, France
5. ARS Guadeloupe, Saint-Martin et Saint-Barthélemy, France
6. Institut Pasteur de la Guyane, France
7. CNR des Arbovirus, Marseille, France
8. Department of Diagnostic Medicine and Pathobiology, USA
9. Biosecurity Research Institute, USA
10. Florida Medical Entomology Laboratory, USA
11. Aix Marseille Université, France
12. IHU Méditerranée Infection, Marseille, France

More than one million chikungunya cases have been reported in the Americas since October 2013 when the Asian genotype of chikungunya virus (CHIKV) has been imported by an infected traveller returning from Asia. CHIKV is mainly transmitted in urban areas by the domestic mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. In this study, we evaluate the potential for the CHIKV circulating in the Caribbean to initiate outbreaks in *Aedes*-infested regions of continental America and Europe by assessing the ability of local mosquitoes to experimentally transmit the virus. Mosquitoes were exposed to a blood-meal containing the virus which must overcome several physical barriers to disseminate and infect various tissues in the insect vector before being secreted in the mosquito saliva when biting a host. Here we found that most mosquito populations, *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus*, transmitted similarly the virus. When exposing *Ae. albopictus* from Europe at a temperature of 20°C after infection, we detect a significant drop of CHIKV transmission potential. Our results suggest that the CHIKV outbreak in the Americas could potentially spread throughout *Ae. aegypti*- and *Ae. albopictus*-infested regions of the Americas however with a limited risk of spillovers in *Ae. albopictus*-infested regions in Europe. These data will be useful for adapting vector control strategies and epidemiological surveillance.

5.5 Article 2

Abstract

Background Chikungunya virus (CHIKV), mainly transmitted in urban areas by the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* constitutes a major public health problem. In late 2013, CHIKV emerged on Saint-Martin Island in the Caribbean and spread throughout the region reaching more than 40 countries. Thus far, *Ae. aegypti* mosquitoes have been implicated as the sole vector in the outbreaks, leading to the hypothesis that CHIKV spread could be limited only to regions where this mosquito species is dominant.

Methodology/Principal Findings We determined the ability of local populations of *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* from the Americas and Europe to transmit the CHIKV strain of the Asian genotype isolated from Saint-Martin Island (CHIKV_SM) during the recent epidemic, and an East-Central-South African (ECSA) genotype CHIKV strain isolated from La Réunion Island (CHIKV_LR) as a well-characterized control virus. We also evaluate the effect of temperature on transmission of CHIKV_SM by European *Ae. albopictus*. We found that (i) *Aedes aegypti* from Saint-Martin Island transmit CHIKV_SM and CHIKV_LR with similar efficiency, (ii) *Ae. aegypti* from the Ameri-

cas display similar transmission efficiency for CHIKV_SM, (iii) American and European populations of the alternative vector species *Ae. albopictus* were as competent as *Ae. aegypti* populations with respect to transmission of CHIKV_SM and (iv) exposure of European *Ae. albopictus* to low temperatures (20°C) significantly reduced the transmission potential for CHIKV_SM.

Conclusions/Significance CHIKV strains belonging to the ECSA genotype could also have initiated local transmission in the new world. Additionally, the ongoing CHIKV outbreak in the Americas could potentially spread throughout *Ae. aegypti*- and *Ae. albopictus*-infested regions of the Americas with possible imported cases of CHIKV to *Ae. albopictus*-infested regions in Europe. Colder temperatures may decrease the local transmission of CHIKV_SM by European *Ae. albopictus*, potentially explaining the lack of autochthonous transmission of CHIKV_SM in Europe despite the hundreds of imported CHIKV cases returning from the Caribbean.

Introduction

Chikungunya virus (CHIKV) is a mosquito-borne alphavirus that causes an acute febrile illness characterized by severe arthralgia. International travel and the global expansion of the two main CHIKV urban mosquito vectors, *Aedes aegypti* and

Aedes albopictus, have enhanced the ability of the virus to spread to new regions where environmental conditions are permissive for viral transmission. Phylogenetically, CHIKV strains are classified into three distinct genotypes: Asian, West African, and Central/East/South African (ECSA). Over the past decade, the ECSA genotype significantly expanded its geographical range resulting in epidemics throughout India, Africa, Asia, and temperate Europe [1]. The ECSA genotype has also been repeatedly imported into the Americas, but autochthonous transmission has not been detected despite the ability of local vector species to transmit CHIKV [2,3]. Between 1995 and 2009, 109 imported CHIKV cases were identified in the United States alone, and among those, 13 (12%) developed a viremia high enough to infect mosquitoes [4]. Following the La Réunion epidemic in 2004, nine imported CHIKV cases were reported during 2006 in the French overseas departments of America [5].

In late 2013, the first locally-acquired CHIKV infections in the Americas were reported from Saint-Martin Island in the Caribbean [6,7]. The virus successively spread to other *Ae. aegypti*-infested islands. At the time of writing, this epidemic has caused more than 1,000,000 suspected cases in 43 countries from the Americas [8], with the potential for further spread to the rest

of the continent. Surprisingly, the CHIKV strain responsible for this epidemic belongs to the Asian genotype [6] and not to the ECSA genotype as might have been predicted, based upon the high numbers of imported cases reported in recent years [4],[5]. Until now, only *Ae. aegypti* mosquitoes have been implicated in CHIKV transmission in the Americas [9]. Previous studies have suggested that the Asian genotype of CHIKV is constrained in its ability to adapt to *Ae. albopictus* via negative epistatic interactions of a single residue (E1-98T) with the E1-A226V substitution [10], which could limit viral spread to regions where this mosquito species is dominant [9]. Nevertheless, the potential role of *Ae. albopictus* as a vector in the Americas for the currently circulating CHIKV strain must also be considered. Indeed, *Ae. albopictus* is present in at least 19 countries in the Americas [11], and have previously been shown to experimentally transmit Asian strains of CHIKV [3].

This recent CHIKV epidemic in the Caribbean was also a threat for Europe. In France, from May 2 through July 4, 2014, the number of laboratory confirmed imported cases of CHIKV was much higher (126 cases) than in previous years [12]. This increase could potentially enhance the risk of local transmission in *Ae. albopictus*-infested European regions. Since its first report in Albania in 1979, *Ae. albopictus* has progressively spread and today is found in 20 Euro-

pean countries, causing a major public health concern [13]. Previous autochthonous transmissions of CHIKV in Italy and in France highlight the potential to establish transmission cycles involving temperate *Ae. albopictus* populations [14,15]. Furthermore, several studies revealed that European *Ae. albopictus* transmit ECSA CHIKV strains efficiently, at both 28°C and at lower temperatures [16,17].

Without a vaccine or specific treatment available, the only strategy for control of CHIKV outbreaks remains the suppression of vector populations, the use of individual protections (*e.g.* repellents) and the reinforcement of epidemiological surveillance in areas at high epidemic risk. The determination of vector competence in mosquito populations, defined as the ability of the vector to ingest, disseminate and transmit a pathogen, is essential in evaluating the risk of CHIKV transmission and spread into new areas as well as to design appropriate control strategies. Examination of virus population diversity by deep sequencing revealed strong bottlenecks when CHIKV passes mosquito anatomical barriers (midgut and salivary glands) leading to select variants with high epidemic potential in mosquito saliva [18]. Vector competence can be highly variable in natural populations and is determined by genotype-genotype interactions, in which successful transmission depends on some specific combination of mosquito and viral genetic char-

acteristics [19], under specific environmental conditions [20]. Ambient temperatures and even daily fluctuations of temperature play a key role in shaping mosquito vector competence for pathogens [21,22]. Moreover, it has been shown that the potential of CHIKV transmission by *Ae. albopictus* strongly depends on the three-way combination of mosquito population, virus strain and temperature or Genotype x Genotype x Environment (G x G x E) interactions [17]. Additionally, knowledge about factors shaping vector capacity corresponding to the ability of a mosquito to act as a vector in the field (*e.g.*, mosquito densities, mosquito trophic preferences, mosquito survival rate...) will be informative for a more accurate appraisal of CHIKV transmission. This study aims to evaluate the potential for the Asian CHIKV strain currently circulating in the Caribbean to initiate outbreaks in other countries of the Americas and to examine the effect of temperature on viral transmission in temperate Europe.

Methods

Ethics Statement The Institut Pasteur animal facility has received accreditation from the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live animals in compliance with the French and European regulations on care and protection of laboratory animals. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the Institut Pasteur. No spe-

cific permits were required for the described field studies in locations which are not protected in any way and did not involve endangered or protected species.

Mosquitoes

Eleven mosquito populations from the Caribbean, continental America and metropolitan France were used: eight populations of *Ae. aegypti* and three of *Ae. albopictus* (Table 5). The mosquitoes were field-collected in 2013 using ovitraps (10-58 per collection site). The field-collected eggs were immersed in water for hatching; larvae were reared at densities of 100-150 individuals per pan and fed with yeast tablets. Emerged adults were identified according to morphological criteria and maintained in cages at $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ with a 16h:8h light:dark cycle, 80% relative humidity, and supplied with a 10% sucrose solution. The F1 generation of mosquitoes was used for all infection assays except for *Ae. aegypti* from Saint-Martin (F3 generation) and from United States (F10 generation).

Viral strains

Two CHIKV isolates of different genotypes were used: one CHIKV isolate from Saint-Martin Island belonging to the Asian lineage and one from La Réunion belonging to the East-Central-South African lineage. The isolate from La Réunion was the strain CHIKV_0621 (CHIKV_LR) isolated in 2005

[23], and provided by the French National Reference Center for Arboviruses at the Institut Pasteur in Paris. The CHIKV strain from Saint-Martin was the CHIKV 20235 [6], isolated in 2013 from the serum of the first confirmed CHIKV local case in the New World. This strain was kindly provided by the French National Reference Center for Arboviruses in Marseille. The CHIKV_20235 (CHIKV_SM) is phylogenetically related to strains recently identified in Asia, *i.e.* China (2012), and the Philippines (2013), most of them sharing a specific four amino-acid deletion in the nsp3 gene [6]. The consensus sequences of CHIKV_LR and CHIKV_SM diverge by $\sim 7\%$ at the amino-acid level including two interesting changes at E1-226 (valine for CHIKV_LR and alanine for CHIKV_SM) [24] and E1-98 (alanine for CHIKV_LR and threonine for CHIKV_SM) [10]. The residue E1-98T exerts a negative epistatic interaction which blocks the ability of Asian strains to adapt to *Ae. albopictus* via the E1-A226V substitution [10]. None of the CHIKV strains harbor the E2 *Ae. albopictus*-adaptive mutations (E2-K252Q, E2-L210Q, E2-K233Q) described or predicted for CHIKV ECSA strains [25]. Stocks of CHIKV_LR were produced following three passages on *Ae. albopictus* C6/36 cells and CHIKV_SM was obtained after two passages on Vero cells. Supernatants were harvested and stored at -80°C until used for mosquito experimental infection assays. Viral titers were determined by serial 10-fold dilutions on Vero cells.

Table 5: Mosquito populations used. Populations are listed according to their collection locality.

Mosquito population	Collection site	Region	Country	Coordinates	Mosquito species used	Climate
USA	Vero Beach, Florida	North America	United States	27° 35' N 80° 22' W	AL	Subtropical
USA	Key West, Florida	North America	United States	24° 33' N 81° 46' W	AE	Subtropical
RIO	Jurujuba, Rio de Janeiro	South America	Brazil	22° 55' S 43° 07' W	AE/AL	Tropical
MACA	Macapá, Amapá	South America	Brazil	0° 02' N 51° 04' W	AE	Tropical
SMAR	Saint-Martin	Caribbean	France	18° 04' N 63° 03' W	AE	Tropical
SAIN	Les Saintes, Guadeloupe	Caribbean	France	15° 51' N 61° 34' W	AE	Tropical
GUAD	Abymes, Guadeloupe	Caribbean	France	16° 16' N 61° 30' W	AE	Tropical
MARTI	Vauclin, Martinica	Caribbean	France	14° 34' N 60° 51' W	AE	Tropical
CAYE	Cayenne, French Guiana	South America	France	4° 55' N 52° 19' W	AE	Tropical
FRA	Bar sur Loup, Metropolitan France	Europe	France	43° 42' N 6° 59' E	AL	Temperate

AE: *Ae. aegypti*; AL: *Ae. albopictus*.

Mosquito oral infections

Five to seven day-old female vectors were fed on an infectious blood-meal containing 1.4 mL of washed rabbit erythrocytes and 700 L of viral suspension supplemented with a phagostimulant (ATP) at a final concentration of 5 mM. Four to six boxes of 60 mosquitoes were tested for each population. All 11 mosquito populations were challenged with CHIKV_LR and CHIKV_SM, each viral strain was provided separately in the blood meal. The titer of infectious blood-meals was $10^{6.5}$ pfu/mL in agreement with viremia levels detected in patients [26]. After the infectious blood-meal, fully engorged females were transferred to cardboard containers and maintained with 10% sucrose at $28^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, a 16h:8h light:dark cycle and 80% humidity.

Incubation temperature regimes

After infection, *Ae. albopictus* from Bar-

sur-Loup in southeastern France (FRA in Table 5) were maintained in climatic chambers (KB 53, Binder, Tuttlingen, Germany) with a 16h:8h light:dark cycle under three different temperature regimes: (i) a constant temperature of $28^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$, (ii) a constant temperature of $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ or (iii) at temperatures displaying daily fluctuations between $17^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ and $23^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$ (average: $20^{\circ}\text{C} \pm 0.1^{\circ}\text{C}$). The constant temperature of 28°C was chosen both because it serves as a typical mean temperature in tropical regions and because this temperature is commonly used in our vector competence assays [3,27]. The constant temperature of 20°C and the temperature regime with daily fluctuations around 20°C were chosen as representative of the low-temperature threshold recorded during the Italian epidemic of CHIKV between June and September 2007 [14,28] and in southeast France in Septem-

ber 2010 (<http://www.meteociel.fr>) [15].

Transmission analysis

Batches of ~ 20 mosquitoes of each combination of mosquito population-virus strain (and temperature regime for *Ae. albopictus* from Bar-sur-Loup, FRA in Table 5) were analyzed at days 3, 5 and 7 post-infection (pi) for the two CHIKV strains tested. Time-points were chosen based on the kinetics of CHIKV transmission efficiency obtained with mosquitoes from Rio de Janeiro, Brazil [3]. Additionally, mosquitoes from Saint-Martin (*Ae. aegypti*, SMAR) and from Bar-sur-Loup (*Ae. albopictus*, FRA) were also analyzed at day 2 pi to estimate the extrinsic incubation period [27]. To estimate viral transmission, saliva was collected from individual mosquitoes as described by Dubrulle and colleagues [27]. Briefly, wings and legs were removed from each mosquito and the proboscis was inserted into a 20 L tip containing 5 L of Fetal Bovine Serum (FBS). After 30 min of salivation, FBS containing saliva was expelled into 45 L of Leibovitz L15 medium for further titration.

Transmission efficiency was determined by the proportion of mosquitoes with virus in the saliva among tested ones (*i.e.*, surviving females including females unable to disseminate the virus and those able to disseminate). The number of infectious particles per saliva was determined by titration using focus fluorescent assay on C6/36 *Ae. albopictus* cells.

Saliva samples were serially diluted and inoculated onto C6/36 *Ae. albopictus* cell culture in 96-well plates. After incubation at 28°C for three days, plates were stained using hyper-immune ascetic fluid specific to CHIKV as primary antibody. Alexa Fluor® 488 goat anti-mouse IgG was used as the second antibody (Life technologies TM). The lower detection limit of an assay was 2 FFU/saliva.

Deep sequencing of saliva samples

About 20 saliva samples from each mosquito population infected with CHIKV_SM were collected at day 7 pi, pooled and deep sequenced. Before pooling, saliva were diluted to obtain comparable numbers of CHIKV particles allowing to have an appropriate representation of the overall viral population. Whole genome sequences (excluding the first 19 nucleotides of the 5'UTR, the 3'UTR and the 25 last nucleotides of the second open reading frame) were determined for pooled saliva using the Ion PGM Sequencer (Life Technologies) as described by Rothberg and colleagues [29], and sequence analysis was conducted using CLC Genomics Workbench 6 software. For deep sequencing, a set of four primer pairs (Table A3; Annex 4) was used to generate amplicons with 3 L of nucleic acid extract and the Superscript III One-Step RT-PCR Platinum TaqHifi kit (Life Technologies) according to manufacturer's instructions using the following cycling parame-

ters: 50°C for 30 min, 94°C for 2 min followed by 45 cycles of 94°C for 15 sec, 56°C for 30 sec and 68°C for 4 min. PCR products were verified by gel electrophoresis, and amplicons were purified using Amicon Ultra – 0.5 mL 30K kit (Millipore) according to the manufacturer’s instructions. For each sample, an equimolar mix of all amplicons was used to build a library and produce the corresponding sequences for the Ion PGM Sequencer according to the manufacturer’s instructions. The reads obtained were trimmed: first using quality score and then by removing the primers used for amplification. Reads were mapped to the genome sequence of CHIKV_SM produced following two passages on Vero cells, which was used as a reference. Mutation frequencies (proportion of viral genomes with a specific mutation) at each position were calculated as the number of reads with the mutation compared to the reference divided by the total number of reads at that site. Only substitutions with a mutation frequency $\geq 5\%$ were considered significant for further analysis. The 5% cut-off was considered in our NGS experimental protocol applied to CHIKV plasmid sequence to avoid any background minor variants due to the sequencing method.

Statistical analysis

All statistical tests were conducted using the STATA software (StataCorp LP, Texas,

USA). P-values >0.05 were considered non-significant. Frequencies were compared using Fisher’s exact test and sample distributions with the Kruskal-Wallis test. If multiple Fisher’s tests were applied to the same data set, then the significance level for each test was adjusted by the sequential Bonferroni method to accommodate the multiple tests.

Results

***Aedes aegypti* from Saint-Martin Island transmit CHIKV_SM and CHIKV_LR with similar efficiency**

To characterize the ability of *Ae. aegypti* from Saint-Martin to transmit CHIKV_SM, we evaluated transmission efficiencies and viral loads in saliva at days 2, 3, 5, and 7 pi. As a control, we also infected mosquitoes with CHIKV_LR. Our studies indicate that CHIKV_LR could be detected from day 2 pi (transmission efficiency: 10%; viral load: $0.8 \pm 0.5 \log_{10}$) and CHIKV_SM from day 3 pi (transmission efficiency: 35%; viral load: $1.5 \pm 0.9 \log_{10}$) when provided in blood-meals to *Ae. aegypti* SMAR from Saint-Martin. In addition, we found that at a given day pi, no significant difference in transmission efficiencies were detected between the two viruses, CHIKV_SM and CHIKV_LR (P-value > 0.05) (Figure 30A). When examining viral loads in saliva, a similar pattern was obtained except at day 5 pi where the distribution of viral loads in *Ae. aegypti* SMAR was signifi-

cantly higher when infected with CHIKV_SM than with CHIKV_LR (P-value < 0.05) (Figure 30B).

***Aedes aegypti* from the Americas display similar and moderate transmission efficiency for CHIKV_SM**

To evaluate the risk of CHIKV spread throughout the Americas, we compared transmission efficiencies among *Ae. aegypti* mosquitoes from localities in the Americas. All mosquitoes were susceptible to CHIKV_SM (Figure 31A, 31B). At each day pi, we did not find any significant difference in transmission efficiencies between mosquito populations (P-value > 0.05), except for mosquitoes from French Guiana and Macapá (P-value < 0.05). At day 3 pi, transmission efficiency was significantly reduced (~10%) in these populations (P-value < 0.05). When examining mosquito susceptibilities to CHIKV_LR, no differences were found between mosquito populations except for *Ae. aegypti* from Macapá which displayed low transmission efficiencies not exceeding 25% (P-value < 0.05) (Figure A2; Annex 4). When examining viral loads, no significant differences were detected regardless of population (P-value > 0.05) (Figures 31A, 31B).

No differences detected between *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* from continental America in transmission efficiency of CHIKV_SM

To characterize the susceptibility of

the alternative vector *Ae. albopictus* to CHIKV_SM, we compared transmission efficiencies and viral loads in saliva between *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* collected from two regions (Brazil and the United States). CHIKV_LR was used as a control. Both mosquito species exhibited similar transmission efficiencies for CHIKV_SM at each day pi (P-value > 0.05) (Figure 32A). *Ae. aegypti* was significantly more susceptible to CHIKV_LR than *Ae. albopictus* at day 3 pi for mosquitoes from Brazil, and at days 5 and 7 pi for mosquitoes from the United States (Figure 32B). When comparing *Ae. albopictus* transmission efficiencies between viral strains, differences were only observed for *Ae. albopictus* from Rio de Janeiro at day 3 pi (47.06% for CHIKV_LR versus 5% for CHIKV_SM). Overall, viral loads were similar (Figures 32C, 32D) except at day 7 pi for mosquitoes from the United States infected with CHIKV_LR (Figure 32D).

***Ae. albopictus* from Southern France transmit both CHIKV_LR and CHIKV_SM at 28°C, but CHIKV_SM transmission is significantly decreased at 20°C**

To determine if temperate *Ae. albopictus* were more susceptible to CHIKV_SM than to CHIKV_LR, we evaluated transmission efficiencies and viral loads in saliva at days 3, 5, and 7 pi (Figure 33A). We found that transmission efficiency was significantly higher with CHIKV_LR at day 3 pi (P-value

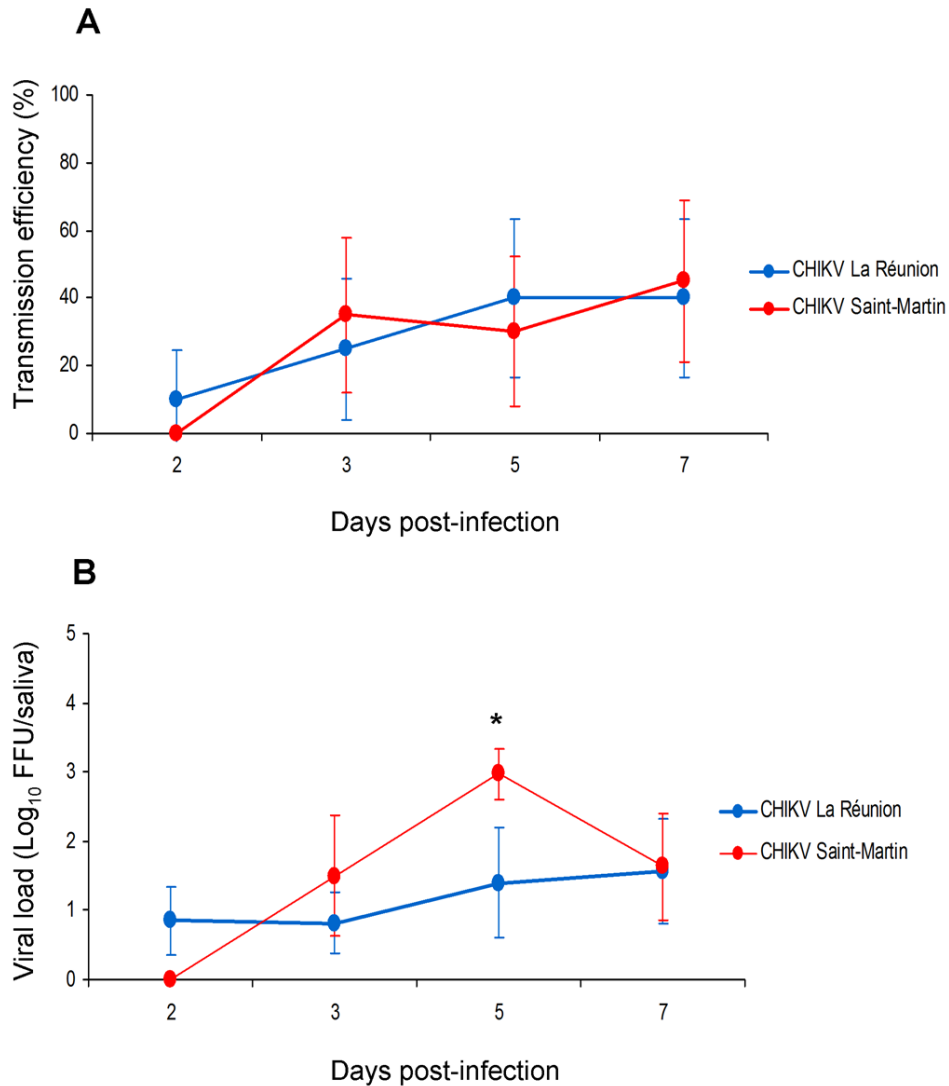


Figure 30: Transmission efficiencies (A) and viral loads (B) in saliva of *Aedes aegypti* from Saint-Martin at different days after infection with CHIKV_LR and CHIKV_SM provided at a titer of $10^{6.5}$ PFU/mL. Mosquitoes incubated at 28°C were examined at days 2, 3, 5 and 7 to determine the transmission efficiency and the number of viral particles in saliva. Transmission efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among the tested ones. An asterisk refers to a significant difference (P-value < 0.05). Error bars represent the confidence interval (95%) for transmission efficiencies, and the standard deviation for viral loads.

< 0.05), while no difference was found between viral strains at days 5 and 7 pi (P-value > 0.05). Viral loads in saliva were not significantly different (P-value > 0.05) at any day pi.

To define if transmission of CHIKV_SM was lowered at a colder temperature, we compared transmission efficiencies and viral loads

in saliva at each day pi between temperate *Ae. albopictus* incubated at 28°C and at 20°C after oral infection. The virus was detected from day 3 pi when mosquitoes were incubated at 28°C and only at day 7 pi when incubated at 20°C (Figure 33B). At day 7 pi, transmission efficiencies were significantly higher at 28°C ($57.5\% \pm 7.9$) than at 20°C

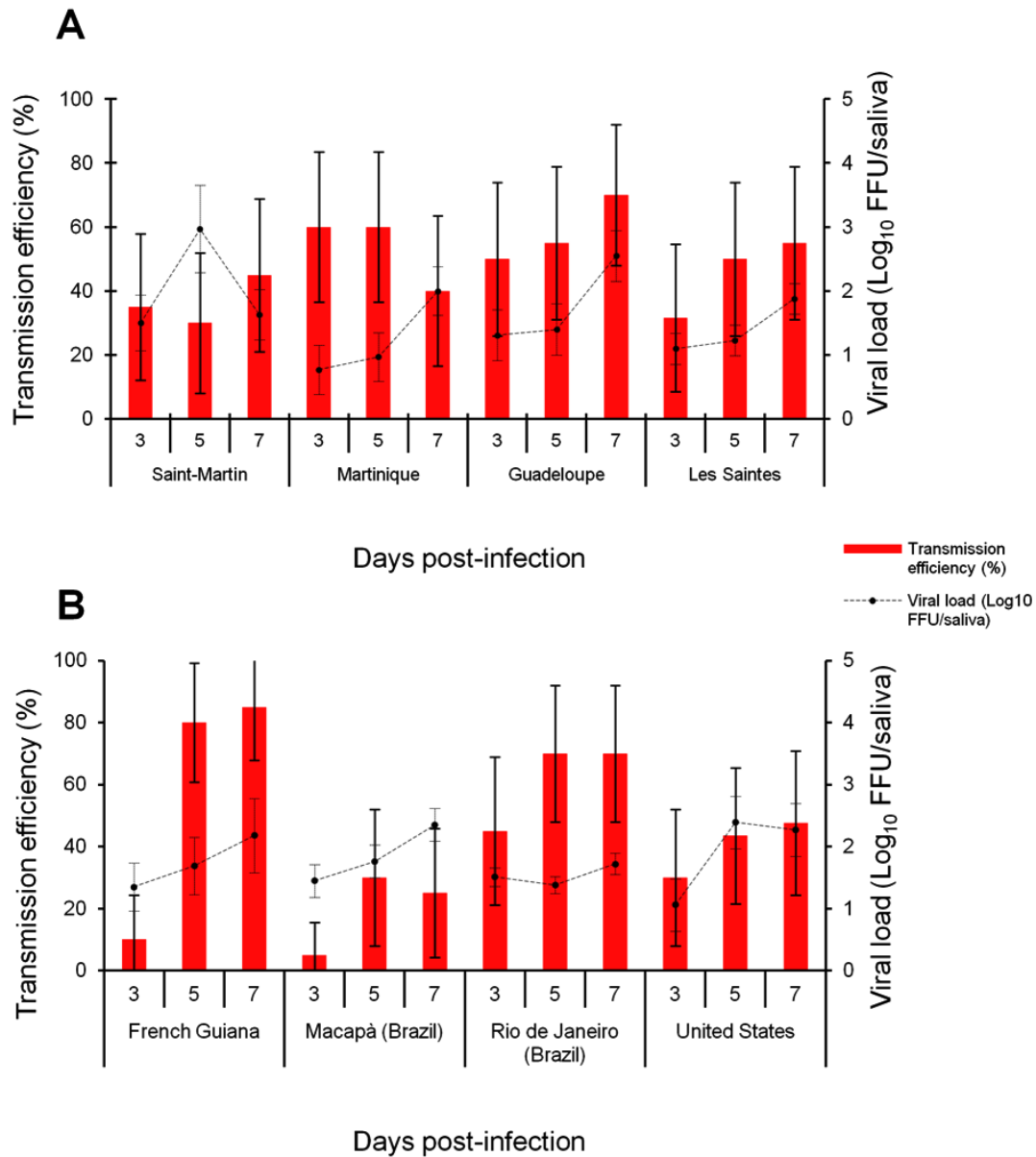


Figure 31: Transmission efficiencies (A) and viral loads (B) of CHIKV_SM in saliva of *Ae. aegypti* collected in the Caribbean (A) and the continental America (B). At days 3, 5 and 7 after an infectious blood-meal, 20 mosquitoes per condition were sacrificed for saliva collection and saliva was titrated on C6/36 *Ae. albopictus* cells. Transmission efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among the tested ones. Error bars represent the confidence interval (95%) for transmission efficiencies, and the standard deviation for viral loads.

(10%±6.9) (P-value < 0.05) (Figure 33B). When examining viral loads in saliva, we obtained the same pattern with a higher viral load detected in saliva of mosquitoes incubated at 28°C (1.7±0.8 log₁₀) than at 20°C (0.7±0.3 log₁₀) (Figure 33A, 33B). When mosquitoes were incubated with daily fluc-

tuations of temperature with a mean value of 20°C, transmission efficiencies and viral loads in *Ae. albopictus* saliva were slightly increased (Figure 33B).

More viral genetic diversity of CHIKV_SM is observed after passage

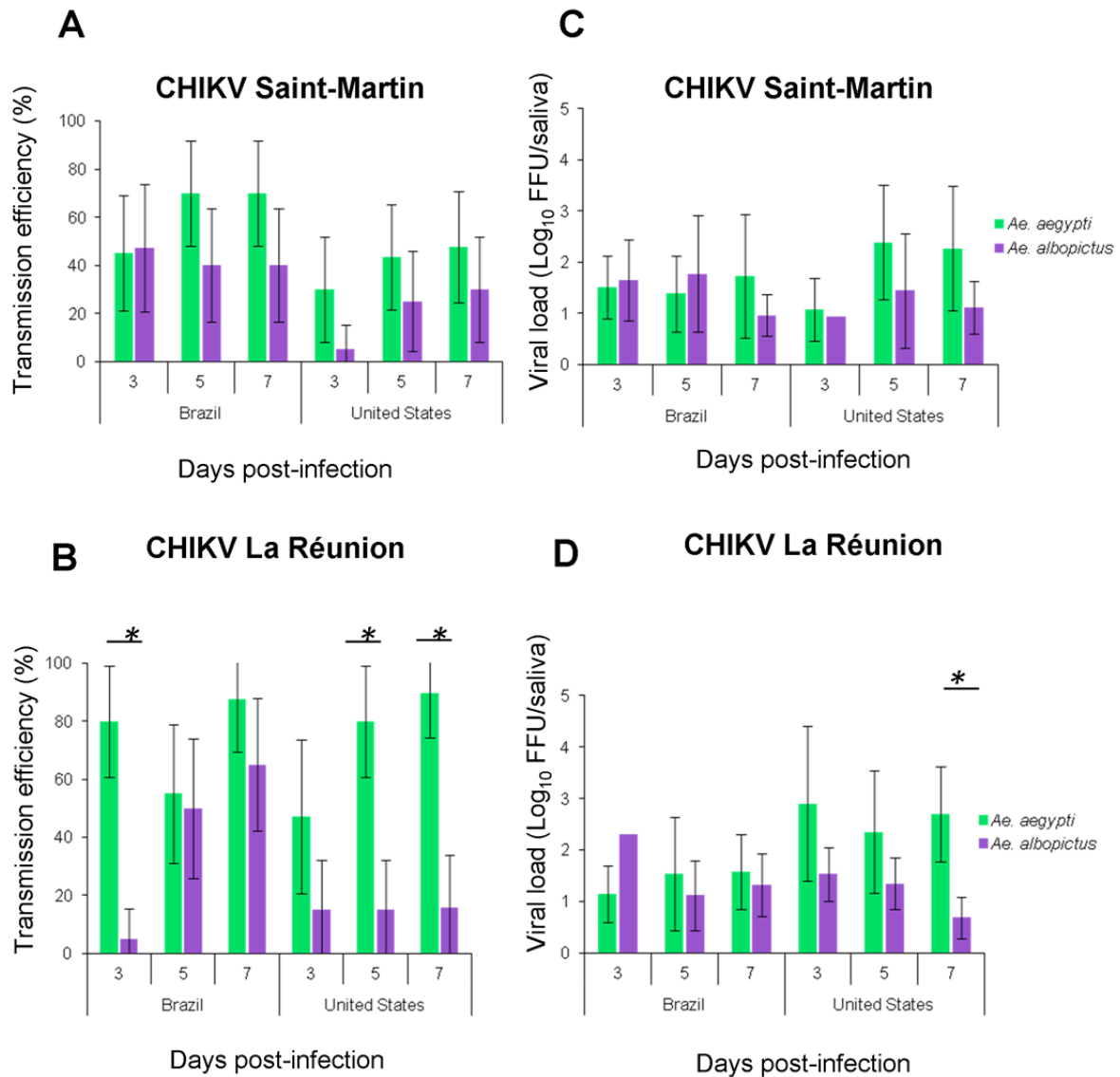


Figure 32: Susceptibility of *Aedes aegypti* compared to *Aedes albopictus* from the same locality when infected with CHIKV_SM and CHIKV_LR and examined at different days after infection. Twenty mosquitoes per condition were processed to determine the transmission efficiency (A and B) and the viral load in saliva at days 3, 5 and 7 after an infectious blood-meal (C and D). Transmission efficiency corresponds to the proportion (%) of mosquitoes with infectious saliva among the tested ones. An asterisk refers to a significant difference (P-value < 0.05). Error bars represent the confidence interval (95%) for transmission efficiencies, and the standard deviation for viral loads.

through *Ae. aegypti* from Saint-Martin

Using pools of saliva from each mosquito populations, mutation frequencies were estimated from nucleotide polymorphisms at each position of the viral genome using the CHIKV_SM produced on Vero cells as reference. Thirty-four nucleotide substitutions

(of frequency higher than 5%) were detected throughout the viral genome: 25 in non-structural genes, and nine in structural genes. (Table 6). Notably, we did detect neither E1-A226V nor E1-T98A substitutions, or other described *Ae. albopictus*-adaptive mutations in any pool of mosquito saliva. Overall, re-

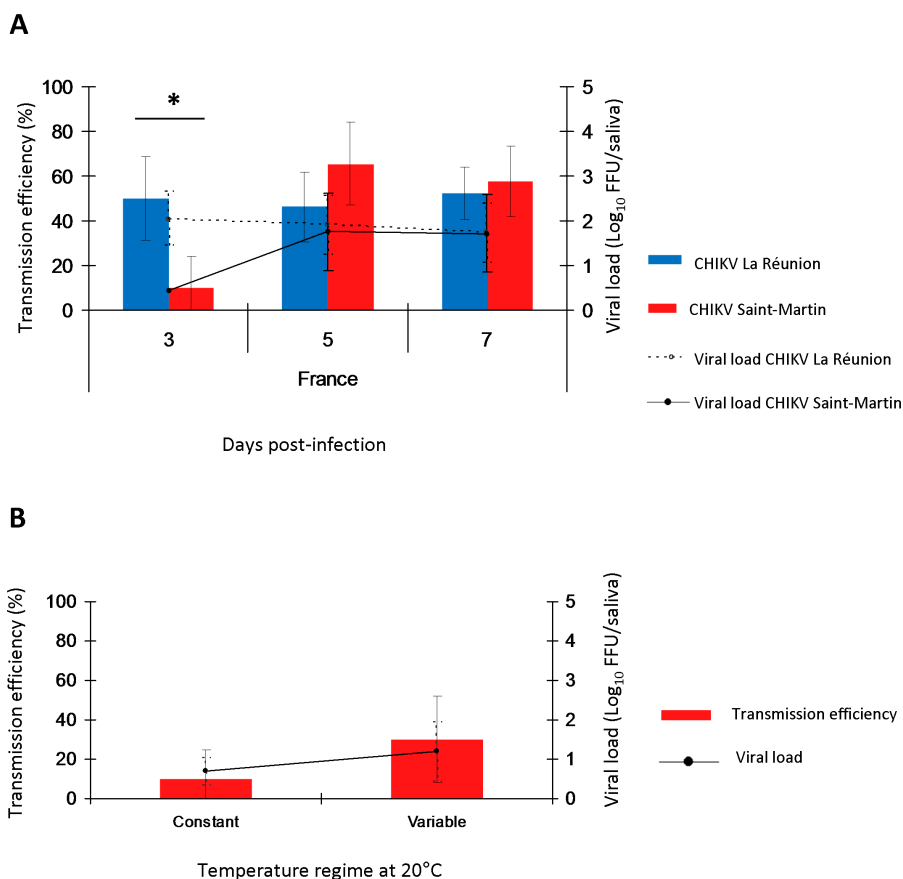


Figure 33: Effect of temperature on CHIKV transmission. *Ae. albopictus* from Bar-sur-Loup (France) were infected with CHIKV_LR and CHIKV_SM and incubated at 28°C (A). Mosquitoes infected with CHIKV_SM were also exposed at a constant temperature of 20°C or at variable temperatures mimicking daily fluctuations around an average of 20°C (B). Transmission efficiencies and viral loads in saliva were determined as previously described using 20 mosquitoes per condition. An asterisk refers to a significant difference (P-value < 0.05). Error bars represent the confidence interval (95%) for transmission efficiencies, and the standard deviation for viral loads.

sults were heterogeneous regardless of *Ae. aegypti* or *Ae. albopictus* populations, with one exception, *Ae. aegypti* SMAR from Saint-Martin. While the number of mutations for other mosquito populations ranged from 0 to 6 (median=3), we detected 13 mutations for the *Ae. aegypti* SMAR. In addition, 62% (8/13) of these mutations were synonymous while the proportion of synonymous mutations for other mosquito populations ranged from 0% to 50% (median=17%). This specific mutation pattern was also associated with a

particular distribution in the viral genome: 54% (7/13) of them were located in the structural genes (almost all of them were synonymous) representing 78% of the mutations detected in this region. Only two other mutations were detected in the structural genes of the virus population from saliva of *Ae. aegypti* MACA from Brazil. Saliva from *Ae. aegypti* SAIN and *Ae. albopictus* USA were not analyzed due to technical problems.

Discussion

Table 6: Viral populations in the saliva of mosquitoes used. CHIKV_SM produced after two passages on Vero cells was used to infect mosquitoes and as reference genome.

nt position	nt change	Gene	aa change	Frequency of reads (%)									
				<i>Aedes aegypti</i>						<i>Aedes albopictus</i>			
				SMAR	GUAD	MARTI	CAYE	MACA	RIO	USA	RIO	FRA	
330	G → A	nsP1	R85H					7.3					
719	A → C	nsP1	T215P						16.6	13.7			
764	G → A	nsP1	G230R						7.6				
1195	A → T	nsP1	Q373H							33.8			
1359	T → C	nsP1	T428I						6.3		9	15.8	
1440	T → C	nsP1	L455P		26.2								
3309	A → G	nsP2	Y543C				27.4						8.4
3424	C → T	nsP2	-						18.3				
3650	C → A	nsP2	L657I	5.6									
3790	G → A	nsP2	I703M	90.9									
4154	G → A	nsP3	G27R								38.7		
4264	T → C	nsP3	-									9.4	
4555	C → T	nsP3	-	15.9									
4876	C → T	nsP3	-					5.3					
5300	A → G	nsP3	I409V	5.5									
5439	T → C	nsP3	A455V	91									
5544	T → C	nsP3	L490P		9.9								
5633	C → T	nsP3	R520stop		60.2		33.4	6.6	36.4	64		38.9	
	C → A		-				12.8						
5635	A → T	nsP3	-				5.9						
5878	A → C	nsP4	-									8.1	
6219	C → T	nsP4	S189F						15.0				
6460	T → G	nsP4	-									5.4	
7018	G → A	nsP4	-	86.9									
7331	A → G	nsP4	T560A								83.3		
7644	C → T	capsid	-					83.3					
8832	T → C	E2	-	7.7									
8922	T → C	E2	-	10.1									
8940	C → T	E2	-	9.4									
9057	A → T	E2	-	10									
9952	C → A	6K	L52M	10.1									
10242	C → T	E1	-	9.6									
10365	C → T	E1	-	10.2									
10875	C → T	E1	-					10					

nt, nucleotide; aa, amino-acid; nt; SMAR corresponds to Saint-Martin; GUAD, Guadeloupe; MARTI, Martinique; CAYE, Cayenne; MACA, Macapà; RIO, Rio de Janeiro; USA, United States; FRA, France.

In December 2013, local transmission of CHIKV was reported on Saint-Martin Island in the Caribbean [6]. Although multiple imported cases of CHIKV had been reported in the New World, epidemic spread of the virus did not occur until approximately ten years after its expansion from coastal Kenya in 2004 [1]. Surprisingly, it was the Asian genotype of CHIKV which caused this epidemic, as opposed to the more widespread ECSA genotype. Additionally, the mosquito *Ae. aegypti* has been implicated as the main vector in this epidemic. Although this combination of mosquito and virus has been documented in sporadic outbreaks [30], our un-

derstanding of virus-vector interactions remains limited. Here, we demonstrate that (i) *Ae. aegypti* from Saint-Martin Island were able to efficiently transmit both Asian and ECSA genotype CHIKV strains isolated from Saint-Martin and La Reunion respectively, (ii) *Aedes aegypti* from the Americas display similar and moderate transmission efficiency for CHIKV_SM, and (iii) *Ae. albopictus* from the Americas were as competent as *Ae. aegypti* in transmission of CHIKV_SM. Taken together, our findings highlight the potential for further spread of CHIKV within the Americas as well as a potential role of *Ae. albopictus* in this context. Additionally, our

findings that European *Ae. albopictus* are capable of transmitting both CHIKV_SM and CHIKV_LR raises concerns about the potential for future CHIKV epidemics in Europe.

First isolated in 1952 in Tanzania, CHIKV dramatically expanded its geographic distribution over the last decades, the first wave spreading from Africa to India and Southeast Asia, and the second wave from the coastal Kenya to the Indian Ocean region [9]. In 2004, the ECSA genotype was responsible for the spread of CHIKV beyond its traditional geographic distribution into many tropical regions [31]. In addition, CHIKV strains from the ECSA genotype have previously been identified in Europe: in Italy in 2007 and France in 2010 [14,15]. A common theme for this second wave of expansions is the role of *Ae. albopictus* as the primary arthropod vector. This is due in large part to a single amino-acid mutation in the CHIKV E1 glycoprotein (E1-A226V) which increased the vector competence of *Ae. albopictus* approximately 50-fold compared to the more traditional vector *Ae. aegypti* [32,33]. Second-step *Ae. albopictus*-adaptive mutations such as E2-K252Q and E2-L210Q, detected in CHIKV isolated from India in 2007 and 2009 respectively, may also have contributed to the spread and rapid diversification of CHIKV lineages [34],10,24]. Our results contrast with previous findings since we found that *Ae. aegypti* was more susceptible to CHIKV_LR than *Ae. albopic-*

tus at day 3 pi for mosquitoes from Brazil, and at days 5 and 7 pi for mosquitoes from the United States (Figure 32B). Geographically distant mosquito populations can correspond to genetically differentiated populations presumably causing the differences observed. While previous studies were mainly based on field-collected mosquitoes [32] or laboratory-adapted strains [33], our study reports on transmission by detecting virus in saliva of mosquitoes of the F1 generation.

While the ECSA genotype has continued to spread throughout Southeast Asia [1], the Asian genotype has affected limited regions in the Pacific region with the virus progressing in small jumps from East Asia to the Western Pacific [30,35]. As early as 2007, the potential of CHIKV emergence in the Americas was strengthened by human populations mostly naïve to CHIKV combined with high densities of competent *Ae. aegypti* and *Ae. albopictus* vectors [1,3]. The threat became reality in late 2013 with the detection of the first autochthonous CHIKV cases on the Caribbean island of Saint-Martin. The virus belonged to the Asian genotype and was closely related to strains from East Asia (Philippines and China) [6]. At the time of writing, local transmission had been identified in 43 countries in the Americas with more than 1,000,000 cases reported (<http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/index.html>). The mosquito *Ae. aegypti* has been identified as the main vector in this epidemic, spreading

the virus from Saint-Martin, throughout the Caribbean. Here, we showed that *Ae. aegypti* SMAR were able to efficiently transmit both ECSA and Asian genotypes of CHIKV at rates similar to *Ae. aegypti* from New Caledonia [35]. Deep sequencing reveals that this efficient transmission was not associated with the emergence of viral populations harboring the E1-A1226V and/or the E1-T98A in any *Ae. aegypti* or *Ae. albopictus* population. Intriguingly, we found a large number of synonymous mutations in the saliva of *Ae. aegypti* SMAR seven days after oral challenge with CHIKV_SM (Table 6) while up to three variants were identified in *Ae. aegypti* collected from neighboring islands (Martinique and Guadeloupe). This may suggest that bottlenecks induced by mosquito internal barriers (i.e midgut, salivary glands) were less constraining for the CHIKV_SM in *Ae. aegypti* SMAR mosquitoes than in *Ae. aegypti* from neighboring islands. It is tempting to propose that CHIKV_SM is naturally well adapted to *Ae. aegypti* SMAR, and therefore able to rapidly express a particular mutant spectrum consisting of a majority of synonymous mutations. Thus, CHIKV emergence and rapid spread through the Caribbean is due to a CHIKV_SM well adapted to *Ae. aegypti* from Saint-Martin Island, and to the ability of mosquitoes from the West Indies to transmit Asian strains of CHIKV.

Similar to previous epidemics of other vector-borne diseases, CHIKV has expanded

outside its traditional range of distribution (and unusually, emerging in temperate regions) following the worldwide expansion of *Ae. albopictus*. This vector is an invasive species currently found in temperate and tropical regions [11,13]. Here, we found that regardless of population origin, susceptibility of *Ae. albopictus* from the Americas was similar for both the ECSA genotype (CHIKV_LR) and the Asian genotype (CHIKV_SM) at days 5 and 7 pi. Differences were only detected at day 3 pi where, surprisingly, transmission by *Ae. albopictus* collected from Rio de Janeiro (Brazil) was 10 times higher with CHIKV_SM ($\sim 50\%$) than with CHIKV_LR ($\sim 5\%$) (Figure 32A, 32B), corroborating the threat of CHIKV_SM for this country. However, temperate *Ae. albopictus* exhibited the opposite pattern of transmission: with CHIKV_LR, transmission efficiency remained high ($\sim 50\%$) from day 3 pi while it reached a similar level only at day 5 pi with CHIKV_SM (Figure 33A). Differences on transmission efficiencies of CHIKV_SM and CHIKV_LR observed between *Ae. albopictus* from the Americas and Europe highlight the need for further genetic analysis in order to elucidate the phylogenetic relationships for these mosquito populations.

Since ambient temperature plays a key role in modulating mosquito vector competence for pathogens [21,22], we also incubated temperate *Ae. albopictus* at lower temperatures. When infected mosquitoes were incu-

bated at 20°C, corresponding to a mean temperature recorded where local CHIKV transmission was detected in Italy and in south-east France [14,28], the virus was detected very late at day 7 pi in mosquito saliva (transmission efficiency, $\sim 10\%$). When mimicking daily fluctuations of temperature around the mean value of 20°C, transmission efficiency was slightly enhanced though no significant differences were observed (Figure 33B). This result contrasts with our previous findings where *Ae. albopictus* from southern France transmitted the ECSA genotype better at 20°C compared to 28°C [17]. This was supported in late October 2014 with the detection of 5 CHIKV autochthonous cases in Montpellier, Southern France ([url: http://www.invs.sante.fr/](http://www.invs.sante.fr/)). Viral isolates from these patients belonged to the ECSA genotype (Leparc-Goffart, personal communication). Despite the hundreds of infected people returning to France from the Caribbean during the summer and later [12], no autochthonous transmission of the imported Asian CHIKV genotype was detected, supporting that transmission is strongly dependent on the mosquito population genetics, the viral genotype and environmental conditions such as the temperature [17]. According to our results based mainly on vector competence, it is crucial for American and European countries to be prepared for more vector-borne disease epidemics. Vector control measures should be triggered very quickly to prevent transmission of the virus

by local mosquitoes. With CHIKV_LR and CHIKV_SM, only three days after infection are needed to initiate an outbreak. Although our results show differences in vector competence, other factors (mosquito densities, feeding behavior, mosquito survival rate...) composing the vector capacity, are needed to assess more accurately the risk of CHIKV transmission.

Contributors

AVR contributed to conceive, design, perform, analyse the experiments and in writing the article. RLO contributed in designing and performing the experiments, and providing mosquito samples. LM, MV and SF participated in experiments on mosquitoes. AY, JG, RG, ID, DV, YJH and LPL were involved in providing mosquito samples. ILG contributed in designing experiments in virology. SMA, AN and XDL were responsible for NGS experiments, analysis and interpretation of data. ABF participated in conceiving and designing the experiments, analysing and interpreting the data and the writing of the article. All authors reviewed the paper.

Declaration of interests

We declare that we have no competing interests.

Acknowledgments

The authors thank Karima Zouache for scientific advices and Henri Jupille for his invaluable contribution in correcting the

manuscript. We also thank the two PI of the Labex IBEID program, Pascale Cossart and Philippe Sansonetti, and Stephen Higgs for their support. We are grateful to Prof. Ernest A. Gould for his help in searching contacts to get mosquito samples. This study was funded by the Institut Pasteur, the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant n°ANR-10-LABX-62-IBEID), and the CAPES-COFECUB. AVR was supported by the French Ministry of Superior Education and Research.

References

1. **Weaver SC** (2014) Arrival of chikungunya virus in the new world: prospects for spread and impact on public health. *PLoS Negl Trop Dis* 8: e2921.
2. **Girod R, Gaborit P, Marrama L, Etienne M, Ramdini C, et al.** (2011) High susceptibility to Chikungunya virus of *Aedes aegypti* from the French West Indies and French Guiana. *Trop Med Int Health* 16: 134-139.
3. **Vega-Rua A, Zouache K, Girod R, Failloux AB, Lourenco-de-Oliveira R** (2014) High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J Virol* 88: 6294-6306.
4. **Gibney KB, Fischer M, Prince HE, Kramer LD, St George K, et al.** (2011) Chikungunya fever in the United States: a fifteen year review of cases. *Clin Infect Dis* 52: e121-126.
5. **PAHO** (2007) Health in the Americas. In: 622 SaTPN, editor. pp. 745.
6. **Leparc-Goffart I, Nougairede A, Cassadou S, Prat C, de Lamballerie X** (2014) Chikungunya in the Americas. *Lancet* 383: 514.
7. **Cassadou S, Boucau S, Petit-Sinturel M, Huc P, Leparc-Goffart I, et al.** (2014) Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. *Euro Surveill* 19.
8. **PAHO** (2014) Chikungunya. Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas.
9. **Morrison TE** (2014) Reemergence of chikungunya virus. *J Virol* 88: 11644-11647.
10. **Tsetsarkin KA, Chen R, Leal G, Forrester N, Higgs S, et al.** (2011) Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7872-7877.
11. **Carvalho RG, Lourenco-de-Oliveira R, Braga IA** (2014) Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 109: 787-796.
12. **Paty MC, Six C, Charlet F, Heuze G, Cochet A, et al.** (2014) Large number of imported chikungunya cases in mainland France, 2014: a challenge for surveillance and response. *Euro Surveill* 19: 20856.
13. **Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, et al.** (2012) A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 435-447.
14. **Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, et al.** (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370: 1840-1846.
15. **Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge JM, Souares Y, et al.** (2011) Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis* 17: 910-913.
16. **Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, et al.** (2013) High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PLoS One* 8: e59716.

17. **Zouache K, Fontaine A, Vega-Rua A, Mousson L, Thiberge JM, et al.** (2014) Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci* 281.
18. **Stapleford KA, Coffey LL, Lay S, Borderia AV, Duong V, et al.** (2014) Emergence and transmission of arbovirus evolutionary intermediates with epidemic potential. *Cell host microbe* 15: 706-716.
19. **Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, et al.** (2009) Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol* 9: 160.
20. **Tabachnick WJ** (2013) Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int J Environ Res Public Health* 10: 249-277.
21. **Lefevre T, Vantaux A, Dabire KR, Mouline K, Cohuet A** (2013) Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLoS Pathog* 9: e1003365.
22. **Lambrechts L, Paaijmans KP, Fansiri T, Carrington LB, Kramer LD, et al.** (2011) Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7460-7465.
23. **Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, et al.** (2006) Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* 3: e263.
24. **Voss JE, Vaney MC, Duquerroy S, Vonrhein C, Girard-Blanc C, et al.** (2010) Glycoprotein organization of Chikungunya virus particles revealed by X-ray crystallography. *Nature* 468: 709-712.
25. **Tsetsarkin KA, Chen R, Yun R, Rossi SL, Plante KS, et al.** (2014) Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nat Commun* 5: 4084.
26. **Leo YS, Chow AL, Tan LK, Lye DC, Lin L, et al.** (2009) Chikungunya outbreak, Singapore, 2008. *Emerg Infect Dis* 15: 836-837.
27. **Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, Failloux AB** (2009) Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS one* 4: e5895.
28. **Tilston N, Skelly C, Weinstein P** (2009) Pan-European Chikungunya surveillance: designing risk stratified surveillance zones. *Int J Health Geogr* 8: 61.
29. **Rothberg JM, Hinz W, Rearick TM, Schultz J, Mileski W, et al.** (2011) An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing. *Nature* 475: 348-352.
30. **Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, et al.** (2014) Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveill* 19.
31. **Powers AM, Logue CH** (2007) Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. *J Gen Virol* 88: 2363-2377.
32. **Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, et al.** (2007) Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2: e1168.
33. **Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S** (2007) A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 3: e201.
34. **Das B, Sahu A, Das M, Patra A, Dwibedi B, et al.** (2012) Molecular investigations of chikungunya virus during outbreaks in Orissa, Eastern India in 2010. *Infect Genet Evol* 12: 1094-1101.
35. **Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D'Ortenzio E, et**

al. (2012) Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 1036-1041.



Chapitre 6

CONTENU DU CHAPITRE

Variabilité génétique d'*Aedes albopictus* en Amérique

- Ce chapitre présente le contexte, la démarche expérimentale employée, ainsi que les principaux résultats obtenus concernant la caractérisation de la variabilité génétique de diverses populations d'*Aedes albopictus* des Amériques. Cette caractérisation a été effectuée à l'aide de marqueurs microsatellites.

Chapitre 6

Variabilité génétique d'*Ae. albopictus* en Amérique

6.1 Contexte

Dans les chapitres 4 et 5 de ce manuscrit, nous avons mis en évidence des différences de compétence vectorielle vis-à-vis du CHIKV entre les populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* des Amériques. Nous avons ainsi démontré que les populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* de Chiapas (Mexique) et Vero Beach (Floride, Etats Unis) avaient une efficacité de transmission (TE) beaucoup plus faible vis-à-vis de la souche CHIKV_0621 (<30%) que leurs homologues d'Amérique Centrale et Amérique du Sud (*i.e.* *Ae. albopictus* de Panama, *Ae. aegypti* de Venezuela, *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* de Rio de Janeiro). Ces résultats ont été, par la suite, confortés pour *Ae. albopictus* où pour la souche virale CHIKV_0621 (appelée CHIKV_LR dans l'article 2), les populations d'*Ae. albopictus* du Brésil présentaient des efficacités de transmission supérieures (~50-60%) à celles des populations d'*Ae. albopictus* des Etats Unis (~10%) (Figure 32, article 2). En ce qui concerne la souche CHIKV_SM, les moustiques *Ae. aegypti* de Macapà ont présenté des efficacités de transmission inférieures (TE \leq 30%) à celles des *Ae. aegypti* des Amériques (*i.e.* Rio de Janeiro, Guyane Française, Guadeloupe, Martinique) (Figure 31, article 2). Ces expériences menées dans des conditions environnementales et biologiques contrôlées (*i.e.* température, humidité, âge des femelles) permettent de minimiser les variations de compétence vectorielle dues à ces paramètres extrinsèques. Ainsi, les différences de compétence vectorielle précédemment présentées peuvent être principalement dues aux différences génétiques entre les populations de moustiques, ce qui peut moduler fortement les interactions de type G x G (génotype virus x génotype vecteur) et G x G x E (génotype virus x génotype vecteur x environnement).

Comme présenté dans la synthèse bibliographique, plusieurs techniques et marqueurs génétiques ont été utilisés afin d'étudier l'origine et la variabilité génétiques des populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* des Amériques. Concernant *Ae. aegypti*, ces études ont notam-

ment démontré l'origine africaine des populations d'Amérique et l'existence de plusieurs haplotypes dans de nombreuses localités, suggérant ainsi l'occurrence de multiples réintroductions d'*Ae. aegypti* en Amérique à partir de diverses sources, avant et après l'arrêt des traitements insecticides visant l'éradication d'*Ae. aegypti* (BRACCO *et al.* 2007; DA COSTA-DA-SILVA *et al.* 2005). Ces multiples réintroductions complexifient considérablement la mise en évidence des liens génétiques qui existent entre l'ensemble des populations du continent. En outre, la plupart des études ont pour but la caractérisation génétique d'*Ae. aegypti* à une échelle locale qui peut s'étendre à l'échelle d'un pays et rarement à l'échelle d'un continent. A ce jour, les connaissances sur les populations d'*Ae. albopictus* des Amériques reposent notamment sur l'origine différente des populations d'États-Unis et celles du Brésil (BIRUNGI & MUNSTERMANN 2002; MOUSSON *et al.* 2005; PAUPY *et al.* 2009), et l'établissement des liens phylogénétiques entre quelques populations d'Amérique du Sud (*i.e.* Brésil, Venezuela, Colombie) (NAVARRO *et al.* 2013). La colonisation récente du continent par ce moustique explique en partie le faible nombre d'études génétiques concernant *Ae. albopictus* par rapport à celles visant *Ae. aegypti*. L'utilisation des marqueurs mitochondriaux ou nucléaires a permis de dévoiler un faible niveau de différenciation génétique entre les populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique (MAIA *et al.* 2009; MOUSSON *et al.* 2005; RAI 1991), soulignant ainsi le besoin d'utiliser des marqueurs plus polymorphes et discriminants pour l'étude de leur variabilité génétique.

Ainsi, la troisième partie de ma thèse vise à **étudier la variabilité génétique des *Ae. albopictus* d'Amérique** à l'aide des marqueurs microsatellites. Pour cela, nous allons déterminer les liens génétiques existants entre les populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique et **analyser leur éventuelle relation avec les différences de compétence vectorielles vis-à-vis du CHIKV** mises en évidence dans les chapitres 4 et 5 de cette thèse. Nous avons donné une priorité à l'analyse d'*Ae. albopictus* en raison des éléments précédemment exposés, notamment le peu de données sur le sujet dans le contexte américain par rapport au moustique *Ae. aegypti*. Les analyses et les données présentées dans ce chapitre constituent des résultats préliminaires obtenus grâce à une collaboration avec le Département de Biologie et Biotechnologie de l'Université de Pavie, Italie.

6.2 Démarche expérimentale

Afin de caractériser génétiquement les populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique, nous avons utilisé 30 individus (~15 mâles et 15 femelles) issus de 14 populations (Table 7). Dix de ces populations ont été choisies parmi les populations d'*Ae. albopictus* utilisées pour l'évaluation de la compétence vectorielle vis-à-vis du CHIKV du chapitre 4 (Table 2, article 1). Les quatre populations restantes (ALPROV, BL, CONG, CAL) provenant d'autres continents ont été incluses afin de les positionner par rapport aux populations des Amériques. La première génération de moustiques (F1) a été utilisée sauf pour les *Ae. albopictus* de Manaus (F2) et Calcutta (colonie du laboratoire). Étant donné le faible polymorphisme génétique observé chez les *Ae. albopictus* en utilisant des marqueurs mitochondriaux comme le NADH déshydrogénase 5 ou ND5 (MAIA *et al.* 2009; MOUSSON *et al.* 2005; NAVARRO *et al.* 2013), nous avons eu recours aux marqueurs microsatellites récemment proposés pour la caractérisation génétique de cette espèce de moustique (MANNI *et al.* 2015).

TABLE 7 – Populations d'*Ae. albopictus* utilisées.

Population	Lieu de collecte	Pays	Région	Coordonnées
TYS	Tyson	États-Unis	Amérique du Nord	38°31'N 90°33'W
VRB	Vero Beach, Florida	États-Unis	Amérique du Nord	27°35'N 80°22'W
MXA	Tapachula	Mexique	Amérique Centrale	14°53'N 92°15'W
PNA	Colon	Panama	Amérique Centrale	09°21'N 79°53'W
MAN	Manaus	Brésil	Amérique du Sud	03°06'S 60°03'W
STR	Santarém	Brésil	Amérique du Sud	02°25'S 54°42'W
PNM	Parnamirim	Brésil	Amérique du Sud	05°54'S 35°16'W
JRB	Jurujuba	Brésil	Amérique du Sud	22°55'S 43°07'W
SAN	Santos	Brésil	Amérique du Sud	23°57'S 46°20'W
MIA	Misiones	Argentine	Amérique du Sud	25°36'S 54°34'W
BL	Bar sur Loup	France	Europe	43°42' N 6°59' E
ALPROV	Providence	La Réunion (France)	Océan Indien	20°53' S 55°27' E
CONG	Brazzaville	Congo	Afrique	4°16' S 15°17' E
CAL	Calcutta	Inde	Asie	22°34' N 88°21' E

L'ADN total des moustiques a été extrait à l'aide du kit Nucleospin® 96 Tissue (Macherey-Nagel). Brièvement, les moustiques entiers ont été broyés individuellement dans des tubes avec

des billes de verre (Dutscher) contenant 180 μL du tampon de lyse. Par la suite, 25 μL de protéinase K ont été ajoutés au tampon et les moustiques ont été mis à incuber dans ce mélange pendant au moins 6 h à 56°C. Les homogénats ont été ensuite filtrés au travers de colonnes auxquelles les acides nucléiques totaux vont se lier. Après trois lavages successifs, l'ADN est élué dans 100 μL de tampon. Les 11 loci microsatellites utilisés (Table 8) ont été amplifiés par PCR dans un thermocycleur Gene Amp® PCR System 9700 (Applied Biosystems). Des amorces sens et anti-sens encadrent chacun des microsatellites étudiés, l'amorce sens étant marquée en position 5' terminale avec l'un des marqueurs phosphoramidites fluorescents HEX ou FAM (Table 8). Le milieu réactionnel (15 μL) de la PCR est composé de 50 ng d'ADN génomique, 1,5 μL du tampon PCR à 1X, 0,45 μL de MgCl_2 à 1,5 mM, 0,4 μL de dNTP à 0,27 mM, 1 μL de chaque amorce à 10 μM et 1 U de Taq polymérase (Invitrogen). Le programme d'amplification utilisé a été le suivant : dénaturation initiale à 94°C pendant 5 min ; 30 cycles de 30 sec à 94°C, 30 sec d'élongation à 59°C et 30 sec à 72°C, suivi d'une extension finale à 72°C pendant 7 min. Des aliquots des produits PCR sont testés sur gel d'agarose à 1,5-2%. Les produits PCR ont été dilués 10 fois dans l'eau distillée avant le génotypage des moustiques à l'aide d'un séquenceur

TABLE 8 – Loci microsatellites et amorces utilisés.

Locus	Type ¹	Motif microsatellite	Amorces (5' → 3') ²
Aealbmic1	P	(TC) ₁₀	F : [6FAM]ACCTTGCGTAGGATGACGAT R : GCCATGATCACGAGCCTATT
Aealbmic2	I	(GTT) ₅ TGGAGTGAG(GTT) ₆	F : [6FAM]ACGATGCGTAACCATTCGAT R : AACACCGCCGAATATGAAAC
Aealbmic3		(AAC) ₉	F : [HEX]ACCATACAGCCTGGAGTTCG R : GGGGTTGTGTGAATTGTCGT
Aealbmic5	P	(TGT) ₁₃	F : [HEX]AACCCATCGAACACAGAAGG R : GTACGGTTGACTCGCTGTGA
Aealbmic6	I	(GTT) ₃ GCT(GTT) ₃ GGT(GTT) ₄	F : [HEX]GATGGTCCGTATTTGGGTTG R : ATCTTCACTCATCCGCCATC
Aealbmic9	P	(GAT) ₇	F : [HEX]GCGATGACAGTGGAACAAGA R : GCTTGGCAGGGAACAAATTA
Aealbmic11	P	(TGT) ₅	F : [6FAM]CTCTGCGTTCGTTCTATC R : AGGCAACCTCTCGAATGAAA
Aealbmic14	I	(CT) ₁₁ T(CT) ₂	F : [6FAM]CAGAAGGTCTTGGATTCACTC R : TTTCCAATTCGTTTCTGGTTC
Aealbmic15	P	(GTT) ₇	F : [6FAM]GGAATGGTTCCTGGCTAAT : CCAACTCCGAAGAAGCCATA
Aealbmic16	P	(CAT) ₇	F : [HEX]CACAACAACGAGAGTGTGCGAA R : CCGAGGGCAACACGATATAC
Aealbmic17	P	(CAA) ₁₅	F : [HEX]TCACCACAACAAACGGAATC R : AGAGTTTTGGGCGCAGTTTA

¹Type de motif microsatellite (P : répétitions parfaites ; I : répétitions imparfaites).

²Les marqueurs phosphoramidites fluorescents (6FAM ou HEX) présents dans l'amorce sens sont indiqués pour les 11 loci utilisés.

à capillaires ABI3730XL (Applied Biosystems). Pour le génotypage, le milieu réactionnel est composé de 10 μL de formamide déionisée, de 0,75 μL du marqueur de taille 500 ROX (Applied Biosystems), et de 2 μL de produit PCR dilué.

Le traitement des données microsatellites se fait à l'aide du logiciel Gene Mapper V3.7 (Applied Biosystem) qui convertit les signaux de fluorescence en pics de tailles définies en nombre de bases. Sur l'électrophorégramme, un pic (homozygote) ou deux pics (hétérozygotes) peuvent être observés. Les tailles des pics obtenus ont été en accord avec les tailles attendues des allèles en fonction du nombre de répétitions du motif de base et également en concordance avec les tailles obtenues pour ces mêmes microsatellites chez d'autres populations d'*Ae. albopictus* (MANNI *et al.* 2015). Pour limiter d'éventuelles erreurs liées au génotypage, le programme TANDEM (MATSCHINER & SALZBURGER 2009) a été utilisé pour l'estimation automatique des tailles des variants microsatellites et leur classement.

6.2.1 Fréquences alléliques et écart à l'équilibre de Hardy-Weinberg

Dans une population à l'état d'équilibre de Hardy-Weinberg, les fréquences alléliques ne changent pas d'une génération à l'autre et les fréquences à l'équilibre sont atteintes en une seule génération de croisement au hasard. Nous testons l'hypothèse (H_0) selon laquelle les populations seraient à l'équilibre de Hardy-Weinberg. Si l'hypothèse H_0 est rejetée, alors c'est l'hypothèse alternative H_1 « déficit en hétérozygotes » ou « excès en hétérozygotes » qui devrait être acceptée. Le programme GENEPOP 4.7 (ROUSSET 2008) permet le calcul du paramètre F_{IS} qui représente le coefficient de consanguinité d'un individu provoqué par un écart à la panmixie. Il mesure la réduction de l'hétérozygotie des individus à l'intérieur de leur sous-population. F_{IS} varie de -1 (excès d'hétérozygotes) à $+1$ (déficit en hétérozygotes). L'hétérozygotie dans ce cas est la proportion moyenne de loci polymorphes parmi les loci du génome d'un individu.

6.2.2 Le déséquilibre de liaison

Quand des allèles de gènes différents s'associent au hasard, la fréquence d'un gamète portant cette combinaison particulière d'allèles est égale au produit des fréquences des allèles. Les gènes sont dits en équilibre de liaison. Dans le cas contraire, ils sont dits en déséquilibre d'association gamétique ou déséquilibre de liaison. Ce déséquilibre peut être dû, outre à une liaison physique

entre deux gènes, à la sélection naturelle ou à la dérive génétique. Les mesures de déséquilibre de liaison quantifient l'écart entre les proportions haplotypiques observées et celles attendues sous l'hypothèse d'indépendance entre allèles. Le déséquilibre de liaison D_{ij} (WEIR 1996), est testé en utilisant le test exact de Fisher à l'aide du logiciel GENEPOP V4.7 (ROUSSET 2008).

6.2.3 Structuration génétique des populations

La structure génétique des populations est établie en estimant la différenciation génique. Grace à une approximation du test exact de Fisher, il est possible de tester la distribution des fréquences alléliques entre échantillons pour chaque locus et entre loci pour tous les échantillons. Une série d'analyses peut être effectuée soit en considérant les échantillons indépendamment soit après divers regroupements. Le programme FSTAT V.2.9.3.2 (GOUDET 1995) permet le calcul du paramètre F_{ST} (WEIR & COCKERHAM 1984), correspondant à l'indice de différenciation qui mesure la diminution de l'hétérozygotie d'une sous-population par rapport à la population totale provoquée par la dérive génétique (dans ce cas précis, l'hétérozygotie correspond à la proportion moyenne des individus hétérozygotes à un locus donné parmi les individus de la population). F_{ST} mesure la différenciation entre les échantillons ; il varie de 0 (absence de différenciation) à 1 (différenciation totale). Le programme GENEPOP v 3.2. fournit la probabilité d'erreur associée à l'hypothèse nulle (homogénéité de la distribution des fréquences alléliques).

Afin de déterminer le niveau de structuration des populations, nous avons utilisé les distances génétiques basées sur la proportion d'allèles partagés pour réaliser (i) une analyse en composantes principales (ACP) avec le logiciel GenALEX (PEAKALL & SMOUSE 2012), et (ii) un dendrogramme avec les logiciels Neighborn et Consense du package PHYLIP V3.696 (FELSENSTEIN 1989), et le logiciel FigTree v 1.3.1 (RAMBAUT 2009). Les distances génétiques ont été calculées en utilisant 10000 permutations à l'aide du logiciel MSA V4.05 (DIERINGER & SCHLÖTTERER 2003). Nous avons également utilisé l'approche bayésienne décrite par PRITCHARD *et al.* (2000) à l'aide du logiciel STRUCTURE V2.3.2 (PRITCHARD 2010). Cette approche utilise l'individu comme unité et évalue si celui-ci appartient à un ou plusieurs « clusters génétiques » (K) sans a priori en assumant une indépendance des fréquences alléliques. Pour cela, des simulations ont été effectuées avec plusieurs valeurs de K allant de 1 au total des populations ou groupes analysés (14 dans notre cas). Nous avons effectué 10 répétitions pour chaque valeur de K en fixant l'étape de « burn-in » à 100000 répétitions, suivies par 1000000

réplications réalisées avec les méthodes de Monte-Carlo par chaînes de Markov (MCMC). La détermination de la valeur exacte de K se fait en utilisant le logarithme naturel de la vraisemblance des données $\ln P(X / K)$ (PRITCHARD *et al.* 2000). Enfin, les logiciels CLUMPP (JAKOBSSON & ROSENBERG 2007) et DISTRICT (ROSENBERG 2004) ont été utilisés pour visualiser la répartition des clusters génétiques dans les populations.

6.2.4 Tests statistiques

L'analyse de variance de Kruskal-Wallis a été utilisée pour comparer l'efficacité de transmission des moustiques en fonction du cluster génétique auquel ils appartiennent à l'aide du logiciel STATISTICA© 8.0 (STASOFT INC 2013).

Le seuil de significativité de chaque test est ajusté en tenant compte du nombre de comparaisons selon la procédure séquentielle de Bonferroni (HOLM 1979 ; RICE 1989).

6.3 Résultats

6.3.1 Variabilité génétique des populations d'*Ae. albopictus*

Nos résultats sont basés sur le génotypage de 420 individus issus de 14 populations en utilisant 11 loci microsatellites. Tous les loci se sont révélés polymorphes avec des niveaux de polymorphisme variables en fonction des populations et un nombre d'allèles allant de 3 (Aealbm2) à 16 (Aealbm3, Aealbm5). Des allèles privés ("The average frequency of private alleles in a partially isolated population") qui présentent la particularité de n'être présents que dans une seule population sont observés pour chacun des 11 loci microsatellites (Annexe 5).

6.3.2 Equilibre de Hardy-Weinberg

L'équilibre de Hardy-Weinberg a été testé pour chaque locus dans chaque population à l'aide d'un test de probabilité. Pour 133 tests de probabilité effectués (pour chaque locus et chaque population), 40 tests sont significatifs ($P < 0,05$). Si on teste l'équilibre de Hardy-Weinberg (H_0) en considérant que l'hypothèse alternative H_1 est un déficit d'hétérozygotes, 27 tests sont significatifs ($P < 0,05$). Si on considère l'ensemble des loci pour chaque population, 11 populations présentent un déficit en hétérozygotes ($P < 0,05$) (Table 9).

TABLE 9 – Valeurs du coefficient de consanguinité (F_{IS}) pour les 11 loci microsatellites testés chez *Ae. albopictus*.

Locus Aealb- mic	Population													
	MIA	JRB	MAN	TYS	PNA	VRB	SAN	PNM	STR	BL	GAL	CONG	MXA	AL- PROV
1	-0,3594	-0,3741	0	-0,6186***	0,1335	0,1512	0,2991	0,4862	-0,2161	-0,1373	0,8221***	0,8596***	-0,1154	0
2	-	-0,266	0,035	0,044	0,067	-0,051	-0,085	-0,16	0,136	-0,161	-0,293	-0,131	0,006	0,47
3	0,2551**	-0,0113	0,3261**	-0,0079	-0,1891	-0,0296	0,0987	0,1625**	0,3612**	0,0569	0,6667***	0,4735***	-0,1429	0,0664
5	-0,1837	0,1412	0,1976	0,4827***	0,0885***	0,2892	-0,2876	-0,1186	-0,2069	0,3216	-0,2071	0,0146	-0,1226**	0,219
6	-0,16	0,0104	0,0785	0,1512	-0,2747	-0,216	-0,0841	-0,1485	-0,1636	-0,0514	-0,222	-0,1245	0,1558	0,1857
9	-0,1781	-0,0158	0,1594**	-1,0000***	-0,5369	-0,1753	-0,1797	0,0645	0,1412	0,0186	0,0076	0,1499	0,2153	-0,0648
11	-0,1391	-0,2388	0,4779***	0,3297	1,0000***	0,5356***	-0,1658	0,2234**	0,1139	-0,041	0,0033	0,0434	0,1574	0,023
14	1,0000***	1,0000***	1,0000***	-0,0087	0,6250**	-0,1352	1,0000***	0,6647***	1,0000***	0,3278***	-0,0175	1,0000***	-	0,7773***
15	-	-	-	-	-	-	0,5000*	-0,0357	-	-	0	-	-	-
16	0,3846***	0,0409	0,2168***	0,0234	-0,0943	-0,0723	0,2903	-0,1154	0,5157***	-0,053	0,2067	0,0471	0,5922***	0,0445***
17	-	-	-	1,0000***	1,0000***	1,0000***	-	1,0000*	-	-	-	-	0,8796***	1,0000*
Total loci	0,1238	0,0046	0,2622***	0,0154***	0,0653***	0,0776***	0,0824	0,1271**	0,1152***	0,0516**	0,1123***	0,1870***	0,2059***	0,1659***

Trente individus ont été analysés par population. MIA (Misiones, Argentine), JRB (Jurujuba, Rio de Janeiro, Brésil), MAN (Mauaus, Brésil), TYS (Tyson, Etats Unis), PNA (Panama), VRB (Vero Beach, Floride, États Unis), SAN (Santos, Brésil), PNM (Pannamirim, Brésil), STR (Santarém, Brésil), BL (Bar sur Loup, France), CAL (Calcutta, Inde), CONG (Congo), MXA (Chiapas, Mexique), ALPROV (Providence, La Réunion). Les astérisques indiquent des différences significatives pour $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) et $P < 0.0001$ (***). En gras : déficit en hétérozygotes.

6.3.3 Déséquilibre de liaison

Sur 555 combinaisons alléliques testées sur l'ensemble des 14 populations, aucune association gamétique significative n'a été détectée.

6.3.4 Différenciation génétique

La différenciation génétique entre les populations d'*Ae. albopictus* a été examinée entre paires d'échantillons (Annexe 6) et selon leur localisation géographique (Table 10). Dans tous les cas, une forte différenciation génétique a été observée ($P < 0,05$). Quand on considère l'ensemble des échantillons, la différenciation génétique a été révélée hautement significative ($F_{ST} = 0,182$; $P < 10^{-4}$). Quand on considère les échantillons récoltés en Amérique, la différenciation reste hautement significative ($F_{ST} = 0,183$; $P < 10^{-4}$), que les échantillons proviennent d'Amérique du Nord ($F_{ST} = 0,081$; $P < 10^{-4}$), Amérique Centrale ($F_{ST} = 0,18$; $P < 10^{-4}$) ou d'Amérique du Sud ($F_{ST} = 0,157$; $P < 10^{-4}$). Par ailleurs, l'analyse des échantillons récoltés dans les régions tempérées d'Amérique a révélé une forte différenciation ($F_{ST} = 0,252$; $P < 10^{-4}$). Lorsqu'on considère les échantillons des régions tropicales d'Amérique, la différenciation génétique reste très élevée ($F_{ST} = 0,168$; $P < 10^{-4}$).

6.3.5 Structuration des populations

L'analyse en composantes principales à deux dimensions basée sur les distances génétiques entre les populations d'*Ae. albopictus*, révèle l'existence de deux clusters bien définis : l'un regroupant la plupart de populations brésiliennes (PNM, SAN, STR, JRB) et celle de l'Argentine (MIA), et l'autre regroupant les populations des États-Unis (VRB), du Mexique (MXA) et du Panama (PNA). Ces deux clusters sont séparés par la première composante qui explique 32,66% de la variabilité génétique observée. Curieusement, les moustiques de Manaus au Brésil (MAN) semblent plus similaires aux moustiques de La Réunion (ALPROV; $F_{ST} = 0,058$) ou du Congo (CONG; $F_{ST} = 0,042$) que du reste des populations brésiliennes (F_{ST} entre 0,105 à 0,244) (Figure 34). Les moustiques de Bar-sur-Loup, semblent plus proches des *Ae. albopictus* de Vero Beach (VRB; $F_{ST} = 0,084$) et de La Réunion (ALPROV; $F_{ST} = 0,091$).

L'approche bayésienne utilisée à l'aide du logiciel STRUCTURE pour des valeurs de K variant entre 1-14 a permis de déterminer le nombre exact de clusters (K) (PRITCHARD *et al.*

TABLE 10 – Valeurs des indices de fixation F_{ST} pour les 11 loci microsatellites testés chez *Ae. albopictus*.

Locus	Toutes les populations	Amérique	Amérique du Nord	Amérique Centrale	Amérique du Nord + Amérique Centrale	Amérique du Sud	Toutes régions tempérées	Régions tempérées - Amérique	Toutes régions tropicales	Régions tropicales - Amérique
N	14	10	2	2	4	6	3	2	11	8
1	0,172****	0,136****	0,191***	0,209****	0,141****	0,112****	0,103****	0,048***	0,19****	0,135****
2	0,212****	0,191****	-0,002	0,285****	0,112****	0,246****	0,235****	0,315****	0,221****	0,189****
3	0,148****	0,124****	0,003*	0,162****	0,083****	0,085****	0,133****	0,179****	0,157****	0,121****
5	0,181****	0,156****	0,177****	0,123****	0,156****	0,063****	0,306****	0,436****	0,162****	0,105****
6	0,15****	0,176****	0,108****	-0,007	0,131****	0,187****	0,027****	0,061****	0,112****	0,128****
9	0,137****	0,145****	0,014	-0,01	-0,0001	0,16****	0,18****	0,286****	0,135****	0,138****
11	0,211****	0,236****	0,147****	0,236****	0,205****	0,157****	0,274****	0,354****	0,202****	0,219****
14	0,308****	0,317****	0,074****	0,111**	0,068****	0,248****	0,324****	0,179****	0,328****	0,337****
15	0,014**	0,018**	-	-	-	0,016	-	-	0,014**	0,017**
16	0,175****	0,202****	0,033**	0,431****	0,226****	0,188****	0,176****	0,234****	0,176****	0,184****
17	0,143****	0,145****	-0,027	0,121****	0,101****	0	0,017*	0,017	0,157****	0,161****
Total loci	0,182****	0,183****	0,081****	0,18****	0,135****	0,157****	0,206****	0,252****	0,177****	0,168****

Trente individus ont été analysés par population. Les astérisques indiquent des différences significatives pour $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**), et $P < 0.0001$ (****).

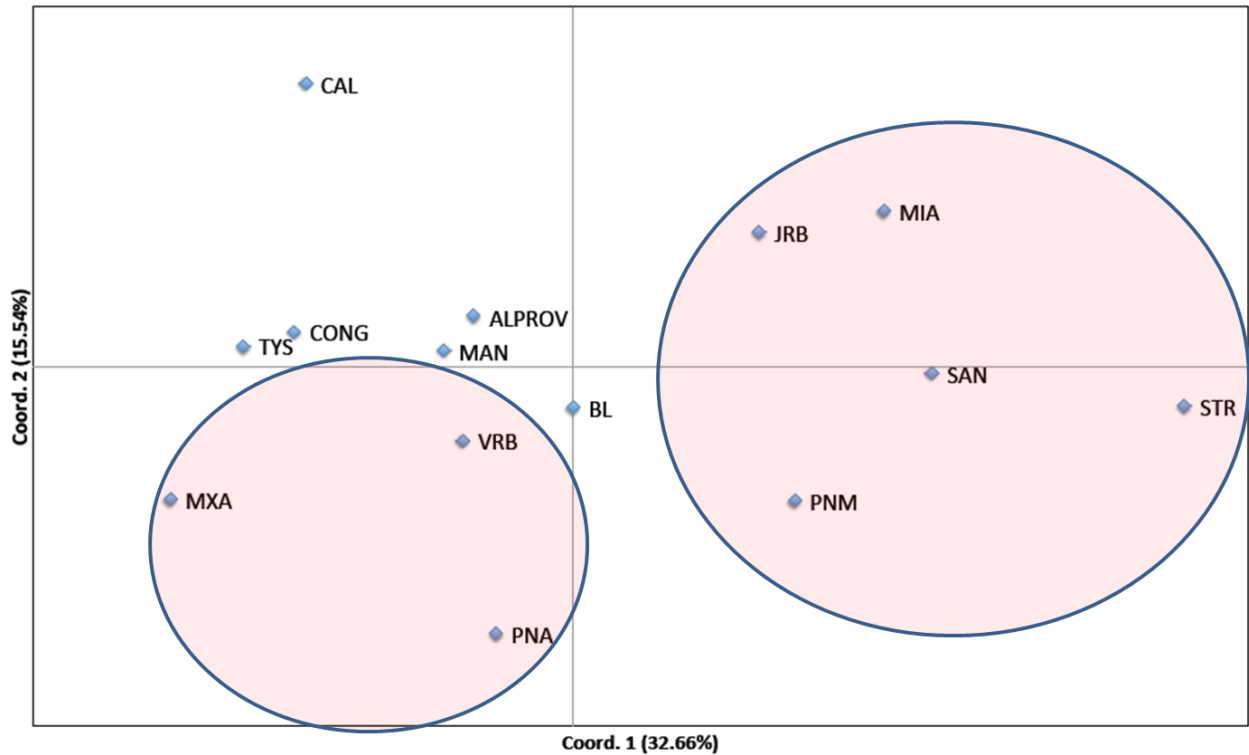


FIGURE 34 – Analyse en composantes principales de la distance génétique pour 11 loci microsatellites chez les populations d'*Ae. albopictus*. MIA (Misiones, Argentine), JRB (Jurujuba, Rio de Janeiro, Brésil), MAN (Manaus, Brésil), TYS (Tyson, Etats Unis), PNA (Colon, Panama), VRB (Vero Beach, Floride, États Unis), SAN (Santos, Brésil), PNM (Parnamirim, Brésil), STR (Santarém, Brésil), BL (Bar sur Loup, France), CAL (Calcutta, Inde), CONG (Congo), MXA (Chiapas, Mexique), ALPROV (Providence, La Réunion).

2000, (Figure 35A)) . Ainsi, ces analyses ont suggéré l'existence de quatre clusters génétiques ($k=4$) chez les populations d'*Ae. albopictus* utilisées (Figure 35B). Un de ces clusters regroupe les populations des États-Unis (TYS, VRB), du Mexique (MXA) et du Panama (PNA), un autre regroupe les populations d'Argentine (MIA) et du Brésil (JRB, SAN, STR, PNM) à l'exception des *Ae. albopictus* de Manaus (MAN), et le troisième regroupe les populations d'*Ae. albopictus* de Bar-sur-Loup (BL), Calcutta, (CAL) et La Réunion (ALPROV). La structuration des *Ae. albopictus* de Congo (CONG) est plus semblable à celle des *Ae. albopictus* de Manaus qu'à celle des autres populations.

Le dendrogramme réalisé en tenant compte de la proportion d'allèles partagés et en utilisant la méthode Neighbor-Joining avec bootstrap (logiciels Neighborn, Consense et FigTree v 1.3.1), est en accord avec les résultats précédents (Figure 36). En effet, nous constatons un clade bien défini regroupant les populations de moustiques d'Argentine et du Brésil (à l'exception des *Ae. albopictus* de Manaus), un clade regroupant les populations des États-Unis, du Mexique et du Panama, et enfin un clade regroupant les *Ae. albopictus* du Congo et de Manaus. Les

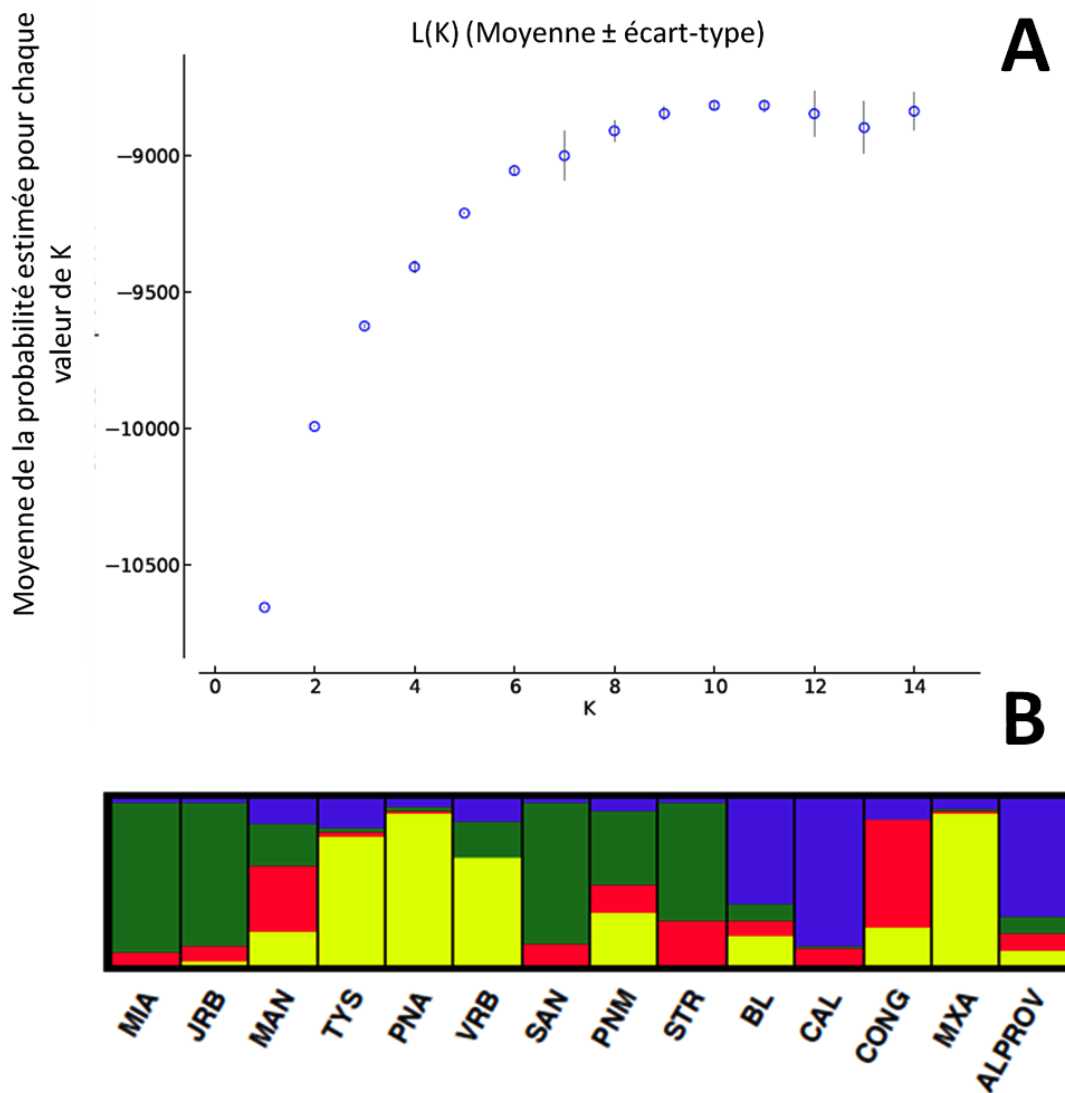


FIGURE 35 – (A) Estimation de la valeur de K à l'aide du logiciel STRUCTURE V2.3.2. (PRITCHARD *et al.* 2000). (B) Représentation graphique des clusters génétiques (K=4) déterminés avec 11 marqueurs microsatellites en utilisant les logiciels STRUCTURE V 2.3.2, CLUMPP et DISTRUCT. Le cluster 1 est représenté en jaune, le cluster deux en vert, le cluster 3 en bleu et le cluster 4 en rouge. Trente individus ont été analysés par population. MIA (Misiones, Argentine), JRB (Jurujuba, Rio de Janeiro, Brésil), MAN (Manaus, Brésil), TYS (Tyson, Etats Unis), PNA (Panama), VRB (Vero Beach, Floride, États Unis), SAN (Santos, Brésil), PNM (Parnamirim, Brésil), STR (Santarém, Brésil), BL (Bar sur Loup, France), CAL (Calcutta, Inde), CONG (Congo), MXA (Chiapas, Mexique), ALPROV (Providence, La Réunion).

moustiques *Ae. albopictus* de Calcutta (utilisés comme outgroup) semblent plus proches des *Ae. albopictus* de La Réunion.

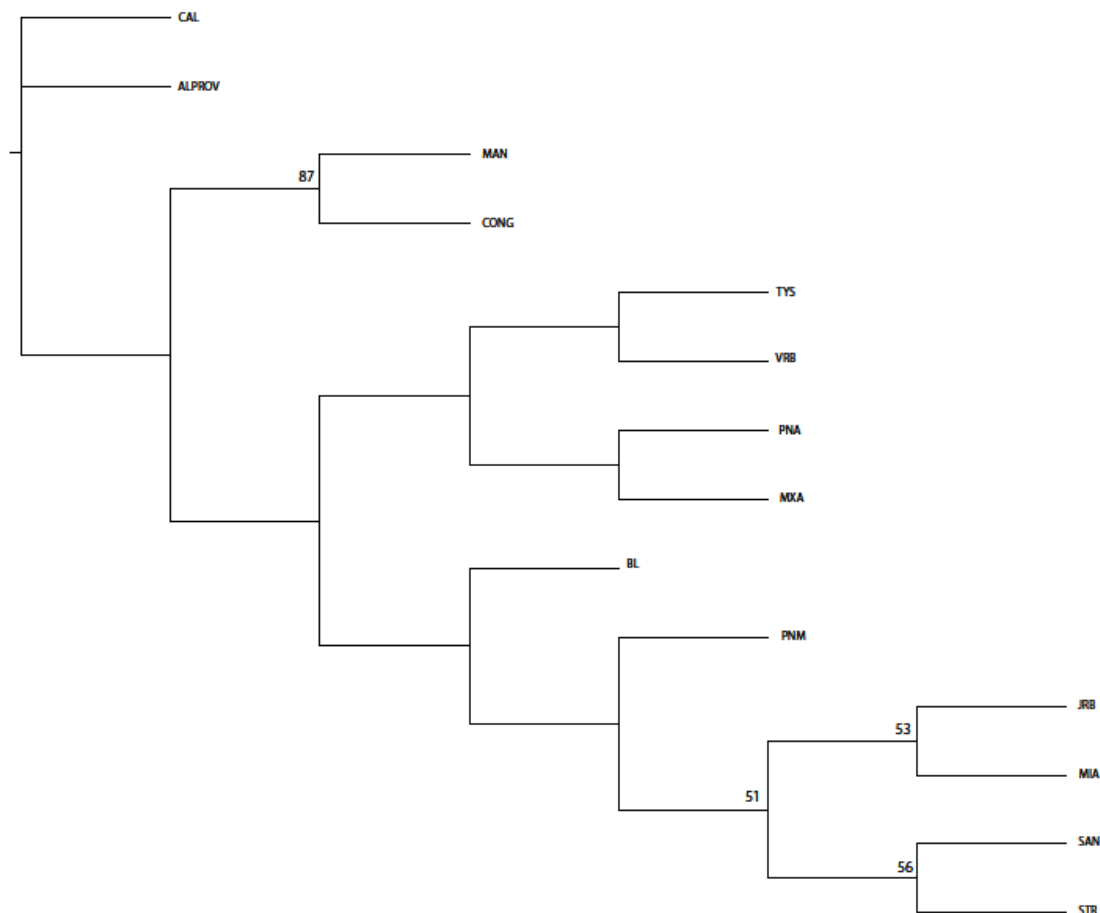


FIGURE 36 – Dendrogramme basé sur la proportion des allèles partagés entre les populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique. Méthode de construction : *Neighbor joining* avec *bootstrap* à l'aide des logiciels Neighbor, Consense et FigTree v 1.3.1. MIA (Misiones, Argentine), JRB (Jurujuba, Rio de Janeiro, Brésil), MAN (Manaus, Brésil), TYS (Tyson, Etats Unis), PNA (Panama), VRB (Vero Beach, Floride, États Unis), SAN (Santos, Brésil), PNM (Parnamirim, Brésil), STR (Santarém, Brésil), BL (Bar sur Loup, France), CAL (Calcutta, Inde), CONG (Congo), MXA (Chiapas, Mexique), ALPROV (Providence, La Réunion). Seules les valeurs de bootstrap supérieures à 50 sont représentées.

6.3.6 Structure génétique des populations et Compétence vectorielle

Afin d'analyser l'effet de différences génétiques observées sur la compétence vectorielle, et notamment sur l'efficacité de transmission, nous avons regroupé les populations des Amériques en tenant compte de deux clusters génétiques définis lors des analyses de la structuration des populations des *Ae. albopictus* d'Amérique (Tableau 11). Ainsi, le cluster 1 regroupe les populations des Etats-Unis (TYS, VRB), du Mexique (MXA) et du Panama (PNA), tandis que le cluster 2 contient les populations d'Argentine (MIA) et le Brésil (JRB, SAN, STR et PNM) à l'exception des *Ae. albopictus* de Manaus qui visiblement n'appartiennent pas à ce cluster génétique (Figures 34-36).

TABLE 11 – Regroupement génétique des populations pour les analyses de compétence vectorielle et valeurs d'efficacité de transmission vis-à-vis de trois isolats de CHIKV.

Population	Pays	Région	Cluster Génétique	TE		
				CHIKV_21	CHIKV_115	CHIKV_NC
TYS	États-Unis	Amérique du Nord	1	56,7% (30)	50% (30)	ND
VRB	États-Unis	Amérique du Nord	1	26,7% (30)	26,7%(30)	ND
MXA	Mexique	Amérique Centrale	1	16,7% (30)	23,3% (30)	ND
PNA	Panama	Amérique Centrale	1	83,3% (30)	33,3%(30)	73,3%(30)
STR	Brésil	Amérique du Sud	2	56,7% (30)	53,8% (26)	ND
PNM	Brésil	Amérique du Sud	2	66,7% (30)	ND	ND
JRB	Brésil	Amérique du Sud	2	96,7% (30)	ND	ND
SAN	Brésil	Amérique du Sud	2	43,3% (30)	62,5% (8)	ND
MIA	Argentine	Amérique du Sud	2	43,3% (30)	76,7% (30)	30% (30)

TE : Efficacité de transmission (proportion des femelles ayant la salive infectée sur le total des femelles analysées) le 7^{ème} jour post-infection. CHIKV_21 : souche de CHIKV de génotype ECSA ayant la substitution E1-226V. CHIKV_115 : souche de CHIKV de génotype ECSA ayant la substitution E1-226A. CHIK_NC souche génotype asiatique ayant la substitution E1-226A. Entre parenthèses, le nombre de moustiques analysés.

La différenciation génétique des neuf échantillons appartenant aux deux clusters décrits ci-dessus (Table 12) est fortement significative ($F_{ST} = 0,194$; $P < 10^{-4}$). Même si les valeurs de F_{ST} sont plus faibles, la différenciation demeure significative quand on analyse les quatre populations formant le cluster 1 ($F_{ST} = 0,135$; $P < 10^{-4}$) et les 5 populations du cluster 2 ($F_{ST} = 0,157$; $P < 10^{-4}$).

Les analyses statistiques effectuées montrent des efficacités de transmission significativement différentes vis-à-vis du CHIKV entre les deux clusters des populations (Kruskal-Wallis : $P < 0.01$). En effet, lorsqu'on considère les isolats CHIKV_21 (génotype ECSA, E1-226V) et CHIKV_115 (génotype ECSA, E1-226A) utilisés dans l'article 1, l'efficacité de transmission est plus élevée chez les moustiques appartenant au cluster 2 par rapport à ceux du cluster 1 (Test de Kruskal-Wallis : $P = 0,017$ pour CHIKV_21 et $P < 10^{-4}$ pour CHIKV_115) (Figure 37). Cette comparaison entre clusters génétiques n'a pas été effectuée pour la souche CHIKV_NC, étant donné le faible nombre de populations testées. En ce qui concerne le nombre de particules virales détectées dans la salive, les moustiques appartenant au cluster 2 ont un nombre supérieur par rapport à ceux du cluster 1 (test de Kruskal-Wallis : $P = 0,024$) pour la souche CHIKV_21 et aucune différence n'a été trouvée pour la souche CHIKV_115 (test de Kruskal-Wallis : $P > 0,05$).

TABLE 12 – Valeurs des indices de fixation F_{ST} pour les clusters génétiques d'*Ae. albopictus* d'Amérique.

Locus	Tous les échantillons		Cluster 1	Cluster 2
	N	9	4	5
Aealbm1c1		0,117***	0,141***	0,088***
Aealbm1c2		0,192***	0,112***	0,218***
Aealbm1c3		0,131***	0,083***	0,097***
Aealbm1c5		0,170***	0,156***	0,081***
Aealbm1c6		0,195***	0,131***	0,216***
Aealbm1c9		0,152***	-0,0001	0,145***
Aealbm1c11		0,260***	0,205***	0,148***
Aealbm1c14		0,331***	0,068***	0,216***
Aealbm1c15		0,018**	-	0,015*
Aealbm1c16		0,223***	0,226***	0,216***
Aealbm1c17		0,141***	0,101***	0
Total loci		0,194***	0,135***	0,157***

Trente individus ont été analysés par population. Les astérisques indiquent des différences significatives pour $P < 0.05$ (*), $P < 0.01$ (**) et $P < 0.0001$ (***).

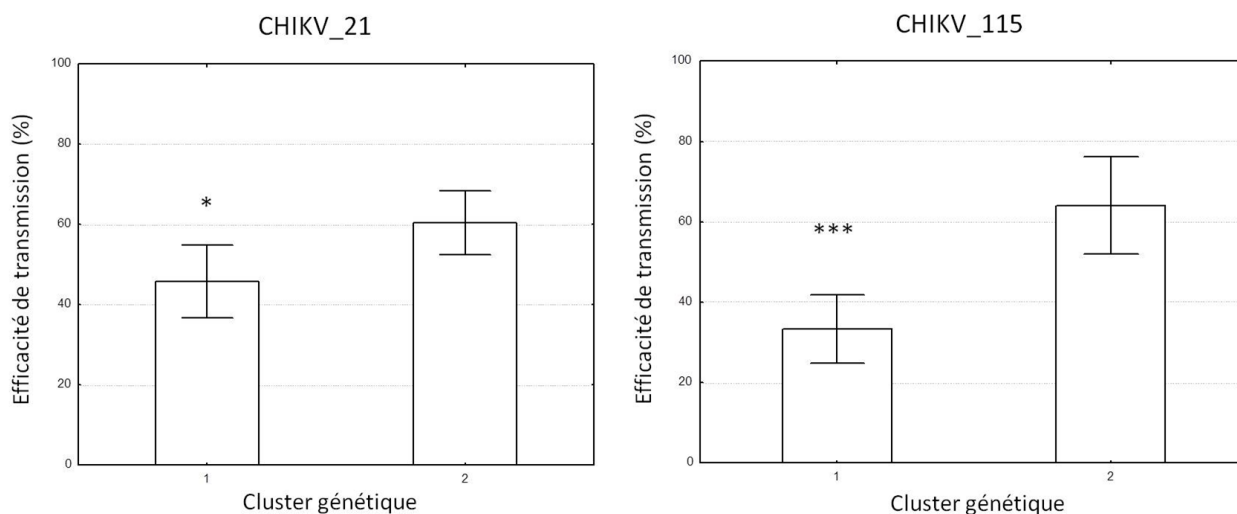


FIGURE 37 – Efficacité de transmission (moyenne \pm intervalle de confiance 95%) de clusters génétiques d'*Ae. albopictus* d'Amérique vis-à-vis deux souches de CHIKV. Le cluster 1 regroupe des populations des Etats-Unis, du Mexique et du Panama. Le cluster 2 regroupe des populations du Brésil et d'Argentine. Les astérisques indiquent des différences significatives pour une p-value inférieure à 0,05 (*) et à 0,001 (***)

6.4 Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons caractérisé la variabilité génétique et la structure génétique des populations d'*Ae. albopictus* en Amérique. Pour toutes les populations en tenant compte de l'ensemble des loci, des écarts à l'équilibre de Hardy-Weinberg ont été mis en évidence, prin-

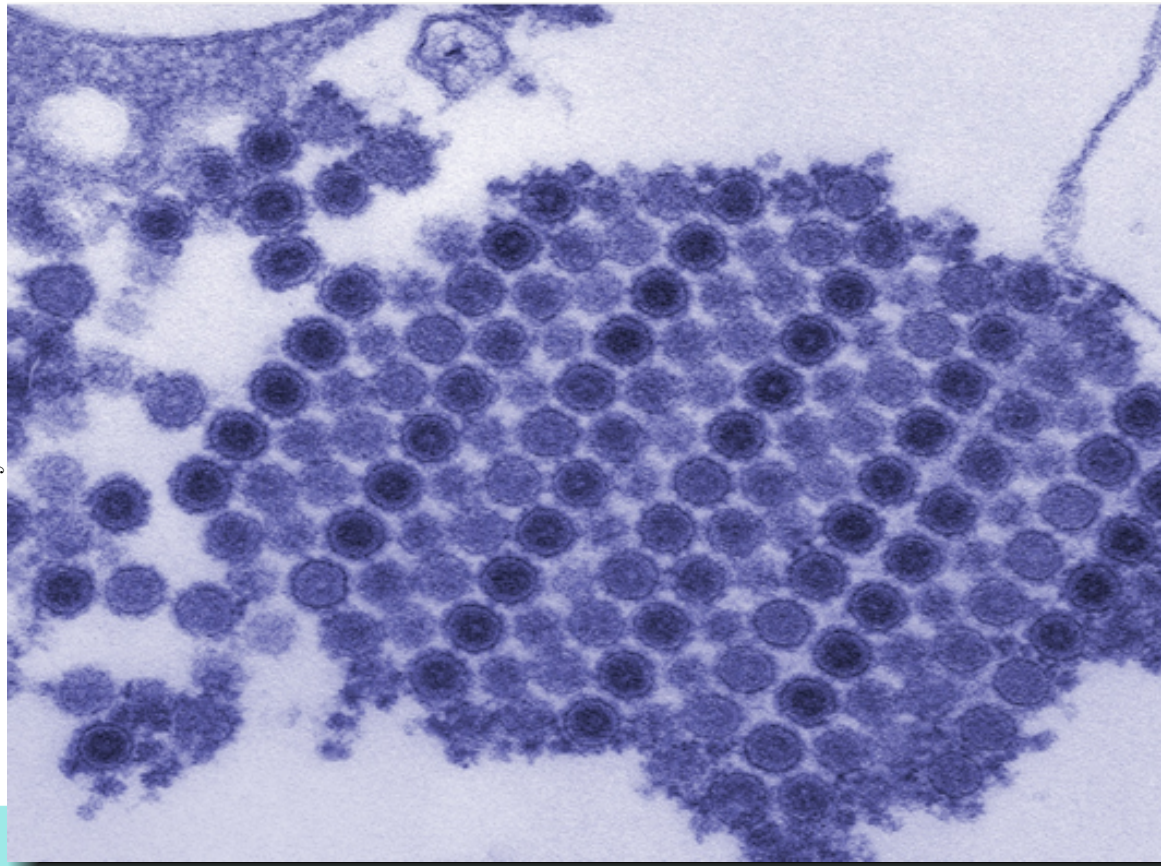
ci principalement liés à un déficit en hétérozygotes (Table 9). Ces déficits en hétérozygotes peuvent être dus à la présence d'allèles nuls ; ceux-ci représentent, en effet, une complication fréquente dans l'interprétation des données microsatellites (LEHMANN *et al.* 1996). Des mutations et des délétions dans les séquences complémentaires des amorces PCR flanquant le microsatellite peuvent inhiber l'amplification PCR. Par ailleurs, un déficit en hétérozygotes peut aussi s'expliquer par d'autres facteurs tels que la consanguinité ou la structuration des populations (effet Wahlund). L'hypothèse de consanguinité peut être rejetée dans notre cas car des déficits seraient observés à tous les loci, ce qui n'est pas le cas dans notre étude. Les valeurs significatives de F_{ST} peuvent donc être interprétées par un effet Wahlund (échantillonnage de deux pools géniques indépendants) dont l'origine reste à être déterminée.

Une forte différenciation génétique a été mise en évidence entre les populations d'*Ae. albopictus* utilisées, quelque soit le niveau de regroupement régional analysé (Table 10, Annexe 6). Nous avons mis en évidence que les populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique sont structurées selon deux clusters principaux : l'un regroupant les populations d'Amérique Centrale et du Nord, (cluster 1) et l'autre celles d'Amérique du Sud (cluster 2) (Figures 34-36). Ceci suggère une divergence évolutive de ces deux groupes de populations, pouvant être liée à l'origine différente des populations d'*Ae. albopictus* du Brésil et celles des États-Unis (BIRUNGI & MUNSTERMANN 2002 ; MOUSSON *et al.* 2005). Curieusement, les *Ae. albopictus* de Manaus ne font pas partie du cluster 2 en raison d'un polymorphisme génétique davantage proche de celui des populations d'Asie et d'Afrique que des autres populations brésiliennes (Figures 34-36), ce qui est également conforté par les valeurs de F_{ST} (*i.e.* $F_{ST} = 0,042$ entre Manaus et Congo vs $F_{ST} = 0,244$ entre Manaus et Santarém ; Annexe 6). Par ailleurs, de nombreux allèles privés ont été détectés ; la présence de ces allèles rares souligne la forte structuration des populations d'*Ae. albopictus*.

Enfin, nous avons mis en évidence que les populations d'*Ae. albopictus* appartenant au cluster génétique 1 qui regroupe les populations d'Amérique du Nord (*i.e.* États-Unis) et Amérique Centrale, présentent des efficacités de transmission significativement inférieures à celles du cluster 2 (*i.e.* Brésil) vis-à-vis des souches de CHIKV de génotype ECSA. Les différences de compétence vectorielle présentées dans l'article 1 sont très probablement liées aux différences génétiques entre *Ae. albopictus* d'Amérique. Ces différences génétiques sont le résultat d'histoires évolutives différentes au sein d'environnements contrastés. Cette différence de réceptivité des populations peut avoir des implications importantes en termes d'émergence et de distribu-

tion des géotypes de CHIKV sur le continent.

Photo : Cynthia Goldsmith



Chapitre 7

CONTENU DU CHAPITRE

Discussion générale et perspectives

- L'ensemble des résultats obtenus lors de cette thèse sont discutés dans le contexte des connaissances actuelles en termes d'émergence et épidémiologie du CHIKV, notamment en Amérique et en Europe. Plusieurs perspectives sont évoquées dont particulièrement : (i) l'étude plus approfondie du rôle des glandes salivaires sur la transmission virale, (ii) l'étude de l'effet des facteurs tels que la température, le microbiote ou le statut immunitaire du vecteur sur la compétence vectorielle, (iii) le besoin d'étendre aux populations d'*Ae. aegypti* d'Amérique les travaux effectués dans cette thèse sur la variabilité génétique.

Chapter 7

Discussion générale et perspectives

Aujourd'hui, nous sommes témoins d'une recrudescence des épidémies liées aux arboviroses, et l'émergence de CHIKV en Amérique abordée dans cette thèse, en constitue un très bon exemple. En effet, au cours de ces trois dernières années, le contexte épidémiologique des Amériques à l'égard de ce virus a considérablement changé : avant octobre 2013, aucun cas de transmission autochtone de CHIKV n'y avait été répertorié, alors qu'en avril 2015, le virus a déjà été responsable de 1,338,026 cas suspects rapportés dans au moins 49 pays et/ou territoires (Figure 38) (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO) 2015).

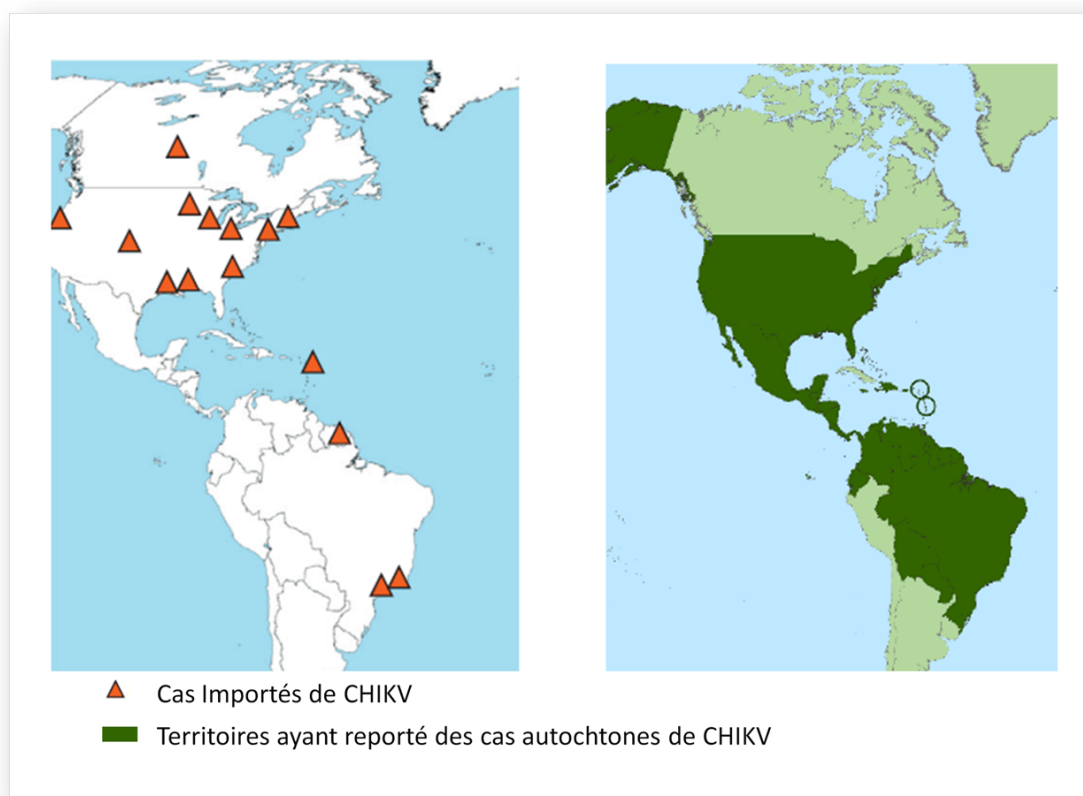


FIGURE 38 – Contexte épidémiologique à l'égard du CHIKV dans les Amériques. Situation avant octobre 2013 (gauche) et en avril 2015 (droite). Adapté de TSETSARKIN *et al.* (2011) et de CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC) (2015).

Cette émergence concorde avec les résultats obtenus dans l'article 1 présenté dans le mémoire expérimental, où nous avons montré pour la première fois, que la majorité des populations de moustiques des Amériques étaient capables de transmettre efficacement le CHIKV, soulignant ainsi le risque que présente ce virus pour le continent. Nos résultats ont également démontré que les moustiques d'Amérique continentale transmettent aussi bien des souches de CHIKV appartenant au génotype ECSA que des souches du génotype asiatique comme celle isolée en Nouvelle Calédonie en 2011 (DUPONT-ROUZEYROL *et al.* 2012). Ce résultat a également été conforté par l'émergence et la circulation inattendues de souches de CHIKV appartenant au génotype asiatique sur le continent américain. En effet, malgré l'importation à plusieurs reprises de souches de CHIKV de génotype ECSA dans les Amériques, la souche de CHIKV isolée à partir du cas autochtone rapporté sur l'île de Saint-Martin (CHIKV_SM) en décembre 2013 est phylogénétiquement proche des isolats qui ont circulé en Indonésie (2007), en Chine (2012) et aux Philippines (2013) (LEPARC-GOFFART *et al.* 2014). Par ailleurs, étant donné qu'aucune épidémie de CHIKV n'a été rapportée en Chine en 2013, il semblerait que l'importation du virus en Amérique ait eu lieu à partir de l'Indonésie ou des Philippines où des épidémies ont été observées en 2013 (VAN BORTEL *et al.* 2014). L'évaluation de la compétence vectorielle des *Ae. aegypti* de Saint-Martin vis-à-vis des souches CHIKV_LR (isolée sur l'île de La Réunion; génotype ECSA) et CHIKV_SM (article 2), a mis en lumière des compétences vectorielles comparables pour les deux souches. De plus, la période d'incubation extrinsèque du virus est plus courte pour les moustiques infectés avec la souche CHIKV_LR (PIE= 2 jours) que pour la souche CHIKV_SM (PIE=3 jours). Ce résultat témoigne que des souches de CHIKV appartenant au génotype ECSA auraient pu également être à l'origine des cas autochtones dans les Amériques. Des résultats de compétence vectorielle similaires à ceux observés pour les *Ae. aegypti* de Saint-Martin ont été obtenus pour les autres populations locales d'*Ae. aegypti* analysées dans la même étude, soulignant ainsi le risque potentiel d'émergence et d'expansion de souches de génotype ECSA sur l'ensemble du continent américain.

L'expansion de la souche CHIKV_SM dans les Amériques va se poursuivre; les résultats obtenus (article 2) attestent d'une compétence vectorielle importante des populations locales de moustiques. En effet, la compétence vectorielle des *Ae. aegypti* issus des localités où des épidémies importantes ont eu lieu (*i.e.* Martinique, 72520 cas suspects; Guadeloupe, 81350 cas suspects) (PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO) 2015) vis-à-vis de CHIKV_SM, est comparable à celle de moustiques issus des localités où des cas n'ont toujours pas été

recensés (*i.e.* Rio de Janeiro). De plus, bien qu'*Ae. aegypti* soit le seul vecteur impliqué dans la transmission du CHIKV sur le continent à ce jour (COFFEY *et al.* 2014; MORRISON 2014), nos résultats montrent également le potentiel d'*Ae. albopictus* des Amériques à intervenir dans la transmission. En effet, nous mettons en évidence pour la première fois que les populations d'*Ae. albopictus* des Amériques (*i.e.* Etats Unis et Rio de Janeiro) sont capables de transmettre la souche CHIKV_SM avec une efficacité similaire aux populations d'*Ae. aegypti*, démontrant ainsi le rôle potentiel de cette espèce dans la transmission autochtone du virus notamment dans les régions tempérées du continent, où ce moustique est également présent. Ce résultat est assez surprenant et inattendu, puisqu'il a été démontré que le génotype asiatique de CHIKV est limité dans sa capacité d'adaptation à *Ae. albopictus* (TSETSARKIN *et al.* 2011), laissant présager que la propagation du CHIKV asiatique peut être limitée seulement aux régions où *Ae. aegypti* est l'espèce dominante (MORRISON 2014; WEAVER 2014). En effet, les souches appartenant au génotype asiatique possèdent les mutations E1-226A et E1-86T, cette dernière exerçant un effet épistatique négatif sur la position E1-226, conduisant à limiter l'adaptation du virus à *Ae. albopictus* qui est favorisée par la substitution E1-A226V (TSETSARKIN *et al.* 2011). De plus, aucune des mutations décrites (E1-A226V, E2-L210Q, E2-K252Q) ou prédites (E2-K233Q) favorisant la transmission du CHIKV par *Ae. albopictus* (TSETSARKIN *et al.* 2014) n'a été mise en évidence ni dans la souche CHIKV_SM qui a été utilisé pour infecter les moustiques, ni dans la salive des moustiques récoltées après infection avec cette même souche virale (article 2). Aussi, dans l'article 1 de cette thèse, nous avons trouvé qu'en accord avec la littérature, les *Ae. albopictus* des Amériques transmettaient mieux la souche ECSA de CHIKV que les *Ae. aegypti* issus d'une même localité (Figure 26, article 1). Il faut noter que ces résultats contradictoires entre les deux articles peuvent être dus principalement aux différences entre les souches virales de génotype asiatique utilisées : dans l'article 1, nous avons utilisé une souche qui a émergé en Nouvelle Calédonie (DUPONT-ROUZEYROL *et al.* 2012) alors que dans l'article 2, nous avons utilisé la souche de Saint-Martin, plus proche des souches circulant récemment en Indonésie, Chine et les Philippines que de la souche de Nouvelle Calédonie (COFFEY *et al.* 2014; LEPARC-GOFFART *et al.* 2014).

La circulation du CHIKV en Amérique menace également les régions infestées par *Ae. albopictus* en Europe. En effet, le nombre de cas de CHIKV importés des Amériques vers l'Europe a augmenté de manière significative et notamment, en France. En 2014, des cas importés provenant des Amériques ont été rapportés en Italie (15), en Allemagne (207), en

Espagne (242), en Suisse (98), aux Pays Bas (181), aux Canaries (3) et en France (<http://www.chikungunya.net/>). Le risque pour la France métropolitaine est particulièrement élevé en raison des nombreux échanges avec ses territoires d’Outre Mer, comme en témoignent les 443 cas importés de CHIKV recensés en 2014 (<http://www.chikungunya.net/>). De plus, *Ae. albopictus* est désormais présent dans 25 pays Européens (MEDLOCK *et al.* 2015) dont la France où cette espèce a déjà été rapportée dans 20 départements (PATY *et al.* 2014). En décembre 2010, deux cas autochtones de CHIKV ont été recensés dans le Sud de la France (Fréjus). Des travaux précédents ont démontré que la compétence vectorielle d’*Ae. albopictus* de France vis-à-vis des souches de CHIKV de génotype ECSA isolées des cas autochtones, est comparable à celle des *Ae. aegypti* d’Inde, source de l’importation du cas à l’origine de la transmission autochtone (VEGA-RUA *et al.* 2013, , Annexe 1). Néanmoins, la compétence vectorielle d’*Ae. albopictus* de France vis-à-vis des souches de CHIKV appartenant au génotype asiatique, notamment celles circulant en Amérique, était encore méconnue.

Ainsi, nous avons également évalué dans l’article 2 de cette thèse la compétence vectorielle d’*Ae. albopictus* du Sud de la France (Bar sur Loup) vis-à-vis de la souche CHIKV_SM. Étant donné que ces moustiques sont adaptés aux régions tempérées, nous avons déterminé la compétence vectorielle après incubation des moustiques infectés à 28°C (moyenne constante), 20°C (moyenne constante), et 20°C (avec fluctuations journalières). Cette étude a montré qu’à 28°C, la compétence vectorielle d’*Ae. albopictus* de France était comparable à celle d’*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* des Amériques avec une efficacité de transmission d’environ 60% et une période d’incubation extrinsèque (PIE) de trois jours. En revanche, lorsque les moustiques sont incubés à 20°C, la compétence vectorielle d’*Ae. albopictus* de France vis-à-vis du CHIKV_SM devenait particulièrement faible, avec une PIE de sept jours et seulement 10% d’efficacité de transmission. L’incubation des moustiques à 20°C avec des fluctuations journalières de température a affecté positivement la compétence vectorielle, qui a été de 30% le 7ème jour pi. Ces résultats montrent une fois de plus que la compétence vectorielle dépend des interactions tripartites de type G x G x E (génotype du moustique x génotype du virus x environnement), où notamment la température et ses fluctuations journalières jouent un rôle essentiel comme il a été démontré pour *Ae. aegypti* et le DENV (LAMBRECHTS 2011), pour *Anopheles stephensi* et *Plasmodium chabaudi* (PAAIJMANS *et al.* 2010), pour *Ae. albopictus* et le CHIKV (ZOUACHE *et al.* 2014) et pour beaucoup d’autres couples pathogène-vecteur (ELLIOT *et al.* 2002 ; LEFÈVRE *et al.* 2013). Aussi, ces résultats contrastent avec ceux obtenus pour la même population de mous-

tiques infectés avec des souches de CHIKV de génotype ECSA. En effet, l'efficacité de transmission du CHIKV ECSA isolé à partir du cas autochtone rapporté en 2010 (2010-1909) est plus importante à 20°C qu'à 28°C (ZOUACHE *et al.* 2014). Curieusement, malgré les 449 cas d'importation du CHIKV recensés en France en 2014 à partir des Amériques, les 11 cas autochtones détectés en octobre 2014 à Montpellier (France) appartenaient au génotype ECSA et non pas au génotype asiatique (DELISLE *et al.* 2015). Ces événements, en accord avec nos résultats, suggèrent qu'à une température de 20°C (températures moyennes oscillant autour de 20°C entre septembre et octobre dans le sud de la France), les souches CHIKV ECSA peuvent être avantageusement transmises en France par les populations locales d'*Ae. albopictus* que les souches de génotype asiatique, ces dernières étant probablement plus sensibles aux basses températures. Des études portant sur la répllication de ces deux souches virales (CHIKV_{SM} et CHIKV ECSA isolée en 2014 en France) à différentes températures *in vitro* et *in vivo* chez le moustique seraient très utiles pour étayer ces hypothèses.

Les analyses de risque de transmission locale du CHIKV effectuées lors de cette thèse reposent sur l'évaluation de la compétence vectorielle des moustiques locaux. Une grande partie des prédictions énoncées à l'issue de ces travaux a été confortée par la suite, ce qui démontre l'importance et la pertinence de ce type d'études. Néanmoins, comme il a été énoncé dans l'introduction, la compétence vectorielle constitue une indication expérimentale de la transmission d'un agent pathogène par le vecteur, et celle-ci peut être très différente en conditions naturelles, en raison d'autres facteurs dont l'importance est manifeste dans l'estimation de la capacité vectorielle tels que la disponibilité de l'hôte vertébré, l'abondance, la longévité et les préférences trophiques du vecteur, ou encore le cortège bactérien, la nutrition et le statut immunitaire du vecteur (LEFÈVRE *et al.* 2013). Par exemple, si on tient compte uniquement des résultats de compétence vectorielle obtenus pour *Ae. albopictus* d'Amérique vis-à-vis du CHIKV dans les deux articles de cette thèse, on pourrait croire que cette espèce sera impliquée dans les épidémies de CHIKV sur le continent au même niveau que les *Ae. aegypti*. Cependant, comme c'est le cas pour le DENV (GRATZ 2004; VASILAKIS *et al.* 2011), *Ae. albopictus* aura probablement un rôle secondaire dans la transmission du CHIKV dans le continent par rapport à *Ae. aegypti*, étant donné les niveaux d'infestation plus importants de ce dernier. Par contre, son rôle en tant que vecteur de CHIKV sur le continent ne doit pas être négligé, étant donné que cette espèce présente dans les régions tempérées pourrait être le vecteur majeur là où *Ae. aegypti* est absent (*i.e.* Tyson aux Etats-Unis, Misiones en Argentine). De

plus, à la différence d'*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus* est un moustique péri-domestique présentant une préférence trophique à gamme d'hôtes plus large (*i.e.* singes, homme, bétail) et une plasticité écologique plus étendue occupant aussi bien des gîtes artificiels que naturels (PAUPY *et al.* 2009). L'espèce peut donc établir le lien entre le cycle selvatique et le cycle urbain du CHIKV en Amérique, où le danger d'établissement d'un cycle selvatique est important en raison de la forte abondance d'animaux sauvages pouvant jouer le rôle de réservoir viral (*e.g.* primates non humains) (COFFEY *et al.* 2014; WEAVER 2014).

Les barrières physiologiques présentes dans le moustique constituent également un facteur déterminant dans la compétence vectorielle. Par exemple, il a été démontré que la barrière intestinale joue un rôle prépondérant dans la sélection du variant E1-226V chez *Ae. albopictus* (ARIAS-GOETA *et al.* 2013). Pour cette raison, dans l'article 1, nous avons analysé des indicateurs de dissémination virale (têtes) et de transmission virale (salive), afin de caractériser le rôle respectif de l'intestin moyen et des glandes salivaires dans la transmission du CHIKV par les moustiques d'Amérique. Nous avons observé que les populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* d'Amérique continentale présentaient une efficacité de dissémination importante ($\sim 100\%$) des trois isolats de CHIKV, démontrant ainsi que le virus arrive à franchir la barrière intestinale dans la quasi-totalité des moustiques examinés. Par contre, nous avons observé des valeurs faibles d'efficacité de transmission (TE) chez certaines populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* d'Amérique continentale (*i.e.* Etats-Unis, Mexique) (Figures 26 et 27, article 1), ce qui souligne le rôle clé des glandes salivaires pour moduler la transmission du CHIKV dans ces populations. Afin de préciser le rôle des glandes salivaires, nous avons déterminé ultérieurement le nombre de particules virales infectieuses présentes dans la tête de trois populations d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. albopictus* se distinguant par des valeurs d'efficacité de transmission très contrastées (Annexe 7). Le nombre de particules virales dans la tête a été similaire chez ces populations de moustiques suggérant qu'aucune corrélation ne peut être établie entre la charge virale détectée dans la tête du moustique et la présence de virus dans la salive.

Le rôle des glandes salivaires dans la modulation de la transmission vectorielle des arbovirus a été suggéré dans de nombreux travaux, soit en mettant en exergue les écarts entre les efficacités de dissémination et de transmission, (DUBRULLE *et al.* 2009; OLIVEIRA *et al.* 2013; VAZEILLE *et al.* 2008; VEGA-RUA *et al.* 2013; ZOUACHE *et al.* 2014), soit par la mise en évidence de goulots d'étranglements diminuant la diversité virale après passage par les glandes sali-

vaires conduisant à la sélection de variants à potentiel épidémique élevé (CIOTA *et al.* 2012; STAPLEFORD *et al.* 2014). C'est ainsi que nous avons utilisé l'approche « deep sequencing » pour déterminer la diversité génétique de la population virale de la salive des moustiques des Amériques dans l'article 2 de cette thèse. Nos résultats ont montré un plus grand nombre de mutations synonymes dans les salives d'*Ae. aegypti* de Saint-Martin, suggérant une pression de sélection moins forte au niveau des barrières internes de ce moustique, ce qui pourrait signifier que CHIKV_{SM} est naturellement « bien adapté » à ce vecteur.

Le passage du virus de l'hémocèle à la salive *via* les glandes salivaires comprend plusieurs étapes : (i) franchissement de la lame basale de la glande salivaire, (ii) réplication dans les cellules épithéliales de la glande salivaire, (iii) stockage dans la cavité apicale de chaque cellule contenant la salive, et enfin (iv) la sortie des particules virales avec la salive délivrée lors de la piqûre. Cependant, très peu d'études portent sur l'examen des glandes salivaires. En effet, à ce jour, des aspects essentiels comme la réplication de certains arbovirus tels que le DENV et le CHIKV dans les glandes salivaires des moustiques n'ont toujours pas été démontrés. Par ailleurs, la seule étude de microscopie électronique effectuée sur la réplication du CHIKV dans les glandes salivaires d'*Ae. albopictus* date de 1986 (SOEKIMAN *et al.* 1986). Ainsi, connaître l'étape qui limite en premier lieu la transmission d'un arbovirus à l'hôte par le moustique, constitue une piste intéressante pour le blocage de la transmission vectorielle. L'utilisation d'une approche combinant la microscopie électronique corrélative, la génétique inverse, et des approches permettant d'évaluer et de quantifier la réplication virale dans ce compartiment semble indispensable.

Le génotype du moustique joue également un rôle déterminant dans la compétence vectorielle. En effet, dans les chapitres 4 et 5 du mémoire expérimental, nous avons mis en évidence de différences d'efficacité de transmission (TE) importantes entre les populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* d'Amérique continentale vis-à-vis du CHIKV (Figures 26 et 27, article 1 ; Figures 31 et 32, article 2). Dans ces études, nous avons soumis les moustiques à un environnement contrôlé, privilégiant ainsi l'évaluation des interactions G x G indépendamment des conditions environnementales. Afin d'évaluer plus précisément l'effet du génotype de ces moustiques sur la compétence vectorielle, nous avons procédé à la caractérisation de la variabilité génétique de populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique, à l'aide des marqueurs microsatellites. Nous avons trouvé une différenciation importante entre les populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique utilisées, ainsi que la présence de deux clusters génétiques bien définis : le pre-

mier regroupant les populations d'Amérique du Nord et d'Amérique Centrale, le deuxième regroupant les populations du Brésil et d'Argentine. Cette structuration des populations est vraisemblablement liée à l'origine différente des populations d'Amérique du Nord et d'Amérique du Sud, ainsi qu'à leur différenciation ultérieure. En effet, de précédentes études génétiques ont révélé que les populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique du Nord étaient étroitement liées aux populations tempérées du Japon (KAMBHAMPATI *et al.* 1991 ; URBANELLI *et al.* 2000), alors que les populations d'Amérique du Sud et notamment du Brésil, étaient plus proches des populations tropicales provenant d'Asie du Sud-Est (BIRUNGI & MUNSTERMANN 2002 ; MOUSSON *et al.* 2005). Les clusters obtenus sont en accord avec la littérature. Par exemple, en Argentine *Ae. albopictus* a été trouvé pour la première fois près de la frontière avec le Brésil, et la distribution actuelle de l'espèce en Argentine suggère fortement l'importation du moustique à partir de ce pays (VEZZANI & CARBAJO 2008). Le regroupement de populations des États-Unis, du Mexique, et du Panama semble également plausible, étant donné l'expansion d'*Ae. albopictus* des États-Unis vers le Mexique (CDC 1989). Par ailleurs, au cours de cette expansion, plusieurs introductions du moustique dans la Caraïbe et en Amérique Centrale (CARVALHO *et al.* 2014 ; CUÉLLAR-JIMÉNEZ *et al.* 2007) ont été rapportées. C'est ainsi qu'*Ae. albopictus* arrive Panama et à Chiapas en 2002 (CASAS-MARTÍNEZ & TORRES-ESTRADA 2003 ; MILLER & LOAIZA 2015). Néanmoins, en dehors des exemples précédemment mentionnés, nous n'avons pas pu mettre en évidence de liens génétiques précis pour le reste de populations. Ceci est probablement dû au polymorphisme et sensibilité élevés de nos marqueurs microsatellites qui semblent plus adaptés pour des études à une échelle géographique plus faible (*i.e.* pays). Ainsi, l'utilisation d'autres marqueurs génétiques moins polymorphes (*i.e.* ADNmt) et d'autres populations d'*Ae. albopictus* est envisagée pour compléter cette étude.

Nous avons également comparé l'efficacité de transmission des populations d'*Ae. albopictus* en tenant compte du cluster génétique auquel elles appartiennent, vis-à-vis de deux souches de CHIKV de génotype ECSA qui diffèrent uniquement par un acide aminé présent (alanine ou valine) à la position E1-226 (Figure 37). Cette comparaison a révélé une réceptivité significativement inférieure chez les populations appartenant au cluster 1 par rapport aux populations du cluster 2 et ceci, pour les deux souches virales. Ce résultat démontre que les différences entre les génotypes des *Ae. albopictus* d'Amérique sont à l'origine des compétences vectorielles contrastées que nous avons observées chez ces moustiques, ce qui peut avoir des implications importantes en termes d'émergence et de diffusion des génotypes de CHIKV sur

le continent. Il serait alors très intéressant d'explorer les populations d'*Ae. albopictus* appartenant à ce cluster 1 dont la compétence vectorielle est faible vis-à-vis du CHIKV, en raison de la barrière des glandes salivaires. Des études plus approfondies portant sur le passage du virus par les glandes salivaires chez ces populations peu compétentes, ainsi que la caractérisation des groupes de gènes à effets majeurs sur la transmission virale par ces moustiques devraient être effectuées. Pour ce dernier aspect, la publication du génome annoté d'*Ae. albopictus* sera déterminante.

Par ailleurs, nous avons analysé uniquement la variabilité génétique de populations d'*Ae. albopictus* d'Amérique, mais il serait nécessaire d'étendre cette étude aux moustiques *Ae. aegypti*, étant donné son rôle prépondérant comme vecteur dans les épidémies de CHIKV sur le continent. De plus, les différences de compétence vectorielle observées entre les populations d'*Ae. aegypti* peuvent avoir une influence importante sur la distribution et l'épidémiologie du CHIKV dans les Amériques. Par exemple, malgré les nombreux cas d'importations de souches de CHIKV de génotype asiatique rapportés dans la localité Feira de Santana au Brésil, les souches de CHIKV qui ont émergé en 2014 appartenaient au génotype ECSA, ce qui peut être dû, entre autres facteurs, à une réceptivité accrue des *Ae. aegypti* de cette localité vis-à-vis des souches ECSA par rapport aux souches asiatiques. En revanche, dans d'autres régions brésiliennes infestées par *Ae. aegypti* comme Oiapoque (Amapá), les souches virales isolées à partir des cas locaux appartenaient au génotype asiatique (TEIXEIRA *et al.* 2015). Ces observations soulignent une compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* compatible avec une émergence épidémique quel que soit le génotype viral (ECSA ou asiatique).

En conclusion, les analyses de risque épidémique effectuées dans cette thèse ont été essentielles pour l'identification des localités ayant besoin d'un renforcement de la surveillance épidémiologique notamment en Amérique. Nous avons démontré que la compétence vectorielle de la majorité des populations d'*Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* en Amérique est élevée vis-à-vis de différentes souches de CHIKV, ainsi que le rôle potentiel d'*Ae. albopictus* dans la propagation du CHIKV vers d'autres régions du continent et également, en Europe. Les différences de compétence vectorielle d'une population de moustique vis-à-vis de différentes souches de CHIKV mises en évidence dans cette thèse, reflètent l'importance de suivre en temps réel la circulation des souches de CHIKV lors des épidémies en Amérique. Ceci permettrait l'identification de tout événement micro-évolutif affectant le CHIKV pouvant entraîner des effets sur la pathogénèse du virus ou sur la compétence vectorielle chez *Ae. aegypti* ou *Ae. albopictus*. De plus,

nous avons constaté des différences de compétence vectorielle dépendant de la température chez *Ae. albopictus* de France, ce qui reflète la nécessité de tenir compte des interactions G x G x E (génotype x génotype x environnement), ainsi que d'étudier le rôle de paramètres tels que la température, le microbiote ou l'alimentation du moustique sur la compétence vectorielle. Nous avons également mis en évidence le rôle des glandes salivaires comme barrière physiologique à la transmission virale, ce qui appelle à développer des études sur les mécanismes impliqués dans le passage des arbovirus par les glandes salivaires. Enfin, nous avons montré l'effet du génotype des *Ae. albopictus* d'Amérique sur la compétence vectorielle vis-à-vis du CHIKV, grâce à l'identification d'un cluster génétique des populations d'*Ae. albopictus* se caractérisant par une compétence vectorielle faible vis-à-vis du CHIKV. Des études plus approfondies sur ces populations « peu compétentes » seraient importantes pour la compréhension des bases génétiques de la compétence vectorielle. L'émergence et la propagation rapide du CHIKV en Amérique témoigne des grandes difficultés que rencontrent aujourd'hui les autorités sanitaires pour contrôler ce virus notamment en termes de diagnostic, contrôle/isolement des cas d'importation, et le contrôle des vecteurs. Pour cette raison, la création de réseaux régionaux de suivi et surveillance, ainsi que la réalisation d'études de recherche fondamentale portant sur les perspectives préalablement exposées, s'avèrent indispensables pour prévenir et lutter contre de futures émergences.

Références bibliographiques

- AbuBakar, S., Sam, I. C., Wong, P. F., MatRahim, N., Hooi, P. S. & Roslan, N. (2007). Reemergence of endemic Chikungunya, Malaysia. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 147–149.
- Adhami, J & Reiter, P (1998). Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* skuse (*Diptera: Culicidae*) in Albania. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14, 340–343.
- Aitken, T. H. G (1977). An *in vitro* feeding technique for artificially demonstrating virus transmission by mosquitoes. *Mosquito news*, 130–133.
- Akahata, W., Yang, Z. Y., Andersen, H., Sun, S., Holdaway, H. A., Kong, W. P., *et al.* (2010). A virus-like particle vaccine for epidemic Chikungunya virus protects nonhuman primates against infection, 16.
- Alibert, A., Pfannstiel, A. & Grangeon, J.-P. (2011). Chikungunya outbreak in New Caledonia in 2011 Status report as at 22 August 2011. *Surveillance et réponse*, 3–9.
- Aranda, C., Eritja, R. & Roiz, D. (2006). First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Medical and Veterinary Entomology*, 20, 150–152.
- Arias-Goeta, C., Mousson, L., Rougeon, F. & Failloux, A. B. (2013). Dissemination and Transmission of the E1-226V Variant of Chikungunya Virus in *Aedes albopictus* are Controlled at the Midgut Barrier Level. *PLoS ONE*, 8.
- Armstrong, P. M. & Rico-Hesse, R (2001). Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 1, 159–168.
- Avise, J. C. (2004). *Molecular Markers, Natural History, and Evolution*. 1, p. 511.
- Berntsen, B. T., James, A. A. & Christensen, B. M. (2000). Genetics of mosquito vector competence. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 64, 115–137.
- Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A. & Lounibos, L. P. (2007). Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 7, 76–85.
- Bettadapura, J., Herrero, L. J., Taylor, A. & Mahalingam, S. (2013). Approaches to the treatment of disease induced by chikungunya virus. *The Indian journal of medical research*, 138, 762–765.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., *et al.* (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, 496, 504–507.
- Birungi, J. & Munstermann, L. E. (2002). Genetic structure of *Aedes albopictus* (*Diptera: Culicidae*) Populations Based on Mitochondrial ND5 Sequences: Evidence for an Independent Invasion into Brazil and United States. *Annals of the Entomological Society of America*, 95, 125–132.
- Blancou, J & Meslin, F. X. (2000). Brefs rappels sur l’histoire des zoonoses. *OIE Revue Scientifique et Technique*, 12, 15–22.
- Bliss, R. J. & May Gill, J. (1933). The effects of freezing on the larvae of *Aedes aegypti*, 583–588.
- Bonilauri, P., Bellini, R., Calzolari, M., Angelini, R., Venturi, L., Fallacara, F., *et al.* (2008). Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 852–854.

- Bosio, C. F., Fulton, R. E., Salasek, M. L., Beaty, B. J. & Black IV, W. C. (2000). Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, 156, 687–698.
- Bottieau, E., Van Esbroeck, M., Cnops, L., Clerinx, J. & Van Gompel, A. (2009). Chikungunya infection confirmed in a Belgian traveller returning from Phuket (Thailand). *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 14.
- Bowers, D. F., Abell, B. A. & Brown, D. T. (1995). Replication and tissue tropism of the alphavirus Sindbis in the mosquito *Aedes albopictus*. *Virology*, 212, 1–12.
- Bracco, J. E., Bracco, J. E., Capurro, M. L., Capurro, M. L. & oliveira, R. Lourenço-de (2007). Genetic variability of *Aedes aegypti* in the Americas using a mitochondrial gene: evidence of multiple introductions, 102, 573–580.
- Braks, M. A. H., Honório, N. A., Lounibos, L. P., Lourenço-De-Oliveira, R. & Juliano, S. A. (2004). Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. *Annals of the Entomological Society of America*, 97, 130–139.
- Brathwaite Dick, O., San Martín, J. L., Montoya, R. H., Del Diego, J., Zambrano, B. & Dayan, G. H. (2012). Review: The history of dengue outbreaks in the Americas. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 87, 584–593.
- Brault, A. C., Powers, A. M., Ortiz, D., Estrada-Franco, J. G., Navarro-Lopez, R. & Weaver, S. C. (2004). Venezuelan equine encephalitis emergence: enhanced vector infection from a single amino acid substitution in the envelope glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 11344–11349.
- Broche, R. G. & Borja, E. M. (1999). *Aedes albopictus* in Cuba. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15, 569–570.
- Brown, J. E., Evans, B. R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., *et al.* (2013). Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. *Evolution*, 514–525.
- Brubaker, J. F. & Turell, M. J. (1998). Effect of environmental temperature on the susceptibility of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to Rift Valley fever virus. *J Med Entomol*, 35, 918–921.
- Bryant, J. E., Holmes, E. C. & Barrett, A. D. T. (2007). Out of Africa: A molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathogens*, 3, 0668–0673.
- Callen, D. F., Thompson, a. D., Shen, Y, Phillips, H. a., Richards, R. I., Mulley, J. C. & Sutherland, G. R. (1993). Incidence and origin of “null” alleles in the (AC)_n microsatellite markers. *American journal of human genetics*, 52, 922–927.
- Campbell, C. L., Keene, K. M., Brackney, D. E., Olson, K. E., Blair, C. D., Wilusz, J. & Foy, B. D. (2008). *Aedes aegypti* uses RNA interference in defense against Sindbis virus infection. *BMC microbiology*, 8, 47.
- Carey, D. E., Myers, R. M., DeRanitz, C. M., Jadhav, M & Reuben, R (1969). The 1964 chikungunya epidemic at Vellore, South India, including observations on concurrent dengue. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 63, 434–445.

- Carvalho, R. G., Oliveira, R. Lourenço-de & Braga, I. A. (2014). Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 109, 787–796.
- Casas-Martínez, M. & Torres-Estrada, J. L. (2003). First evidence of *Aedes albopictus* (Skuse) in southern Chiapas, Mexico. *Emerging Infectious Diseases*, 9, 606–607.
- Cassadou, S., Boucau, S., Petit-Sinturel, M., Huc, P., Leparç-Goffart, I. & Ledrans, M. (2014). Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin island, October to December 2013. *Eurosurveillance*, 19, 1–4.
- CDC (1989). *Update: Aedes albopictus Infestation – United States, Mexico*. Tech. rep. CDC, Morb Mort Week Rpt 38(25);440,445–446.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2015). *Countries and territories where chikungunya cases have been reported (as for March 10, 2015)*.
- Chevillon, C. & Failloux, A. B. (2003). Questions on viral population biology to complete dengue puzzle. *Trends in Microbiology*, 11, 415–421.
- Chevillon, C., Briant, L., Renaud, F. & Devaux, C. (2008). The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends in Microbiology*, 16, 80–88.
- Christophers, S. R. (1960). *Aedes Aegypti* (L.) the yellow fever mosquito: Its life history, bionomics and structure. *Cambridge At The Universit Press*, 721.
- Ciota, A. T. & Kramer, L. D. (2013). Vector-virus interactions and transmission dynamics of West Nile virus. *Viruses*, 5, 3021–3047.
- Ciota, A. T., Ehrbar, D. J., Van Slyke, G. a., Payne, A. F., Willsey, G. G., Viscio, R. E. & Kramer, L. D. (2012). Quantification of intrahost bottlenecks of West Nile virus in *Culex pipiens* mosquitoes using an artificial mutant swarm. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 557–564.
- Coffey, L., Failloux, A.-B. & Weaver, S. (2014). Chikungunya Virus–Vector Interactions. *Viruses*, 6, 4628–4663.
- Coffey, L. L., Forrester, N., Tsetsarkin, K., Vasilakis, N. & Weaver, S. C. (2013). Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiology*, 155–176.
- Cologna, R., Armstrong, P. M. & Rico-Hesse, R. (2005). Selection for virulent dengue viruses occurs in humans and mosquitoes. *Journal of virology*, 79, 853–859.
- Colton, L., Biggerstaff, B. J., Johnson, A. & Nasci, R. S. (2005). Quantification of West Nile virus in vector mosquito saliva. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21, 49–53.
- Cook, S., Bennett, S. N., Holmes, E. C., De Chesse, R., Moureau, G. & Lamballerie, X. de (2006). Isolation of a new strain of the flavivirus cell fusing agent virus in a natural mosquito population from Puerto Rico. *Journal of General Virology*, 87, 735–748.
- Cuéllar-jiménez, M. E., Velásquez-escobar, O. L. & González-obando, R. (2007). Detección de *Aedes albopictus* (Skuse) (*Diptera* : *Culicidae*) en la ciudad de Cali , Valle del Cauca , Colombia. *Biomédica*, 273–279.
- da Costa-da-Silva, A. L., Capurro, M. L. & Bracco, J. E. (2005). Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (*Diptera: Culicidae*) from Peru. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 100.

- Dalla Pozza, G & Majori, G (1992). First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 8, 318–320.
- Degallier, N, Hervé, J.-P. & Travassos da Rosa, A. P. A (1988). *Aedes aegypti* (L.): importance de sa bioécologie dans la transmission de la dengue et des autres arbovirus. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique*, 601, 97–110.
- Delatte, H., Desvars, A., Bouétard, A., Bord, S., Gimonneau, G., Vourc'h, G. & Fontenille, D. (2010). Blood-Feeding behavior of *Aedes albopictus*, a Vector of Chikungunya on La Réunion. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 10, 249–258.
- Delaunay, P, Jeannin, C, Schaffner, F & Marty, P (2009). News on the presence of the tiger mosquito *Aedes albopictus* in metropolitan France. *Archives of pediatrics*, 16 Suppl 2, S66–S71.
- Delisle, E, Rousseau, C, Broche, B, Ambert, G. L., Cochet, A, Prat, C & Foulongne, V (2015). Chikungunya outbreak in Montpellier , France , September to October 2014. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 20, 1–6.
- DeTulleo, L. & Kirchhausen, T. (1998). The clathrin endocytic pathway in viral infection. *EMBO Journal*, 17, 4585–4593.
- Diallo, M., Thonnon, J., Traore-Lamizana, M. & Fontenille, D. (1999). Vectors of Chikungunya virus in Senegal: Current data and transmission cycles. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 60, 281–286.
- Dieringer, D. & Schlötterer, C. (2003). microsatellite analyser (MSA): a platform independent analysis tool for large microsatellite data sets. *Molecular Ecology Notes*, 3, 167–169.
- do Socorro Souza, T., Pellini, A. C. G., Mascheretti, M., Jahnel, M. T., Ribeiro, A. F., Rodrigues, S. G., et al. (2012). Travelers as sentinels for chikungunya fever, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, 18, 529–530.
- Dohm, D. J. & Turell, M. J. (2001). Effect of Incubation at Overwintering Temperatures on the Replication of West Nile Virus in New York *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology*, 38, 462–464.
- Domingo, E (1992). Genetic variation and quasi-species. *Current opinion in genetics & development*, 2, 61–63.
- Dubrulle, M., Mousson, L., Moutailier, S., Vazeille, M. & Failloux, A. B. (2009). Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: Saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS ONE*, 4.
- Dueñas, J. C. R., Llinás, G. A., Panzetta-Dutari, G. M. & Gardenal, C. N. (2009). Two different routes of colonization of *Aedes aegypti* in Argentina from neighboring countries. *Journal of medical entomology*, 46, 1344–1354.
- Dupont-Rouzeyrol, M., Caro, V., Guillaumot, L., Vazeille, M., D'Ortenzio, E., Thiberge, J.-M., et al. (2012). Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 12, 1036–41.
- Elliot, S. L., Blanford, S. & Thomas, M. B. (2002). Host-pathogen interactions in a varying environment: temperature, behavioural fever and fitness. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 269, 1599–1607.

- Ernould, S., Walters, H., Alessandri, J.-L., Llanas, B., Jaffar, M.-C., Robin, S., *et al.* (2008). Aspects pédiatriques de l'épidémie de Chikungunya à l'île de la Réunion. *Archives de Pédiatrie*, 15, 253–262.
- Failloux, a, Mousson, L & Rodhain, F (1999). C ontrôle génétique de la compétence vectorielle des moustiques du genre *Aedes* . *Journée SPE Institut Pasteur*, 33.
- Failloux, a. B., Fouque, F., Vazeille, M. & Rodhain, F. (2002). Isoenzyme differentiation of *Aedes aegypti* populations in French Guiana. *Medical and Veterinary Entomology*, 16, 456–460.
- Fansiri, T., Fontaine, A., Diancourt, L., Caro, V., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., *et al.* (2013). Genetic Mapping of Specific Interactions between *Aedes aegypti* Mosquitoes and Dengue Viruses. *PLoS Genetics*, 9.
- Felsenstein, J (1989). Phylip: phylogeny inference package (version 3.2). *Cladistics*, 5, 164–166.
- Forattini, O. P. (1986). Identificação de *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) no Brasil. *Revista de Saúde Pública*, 20.
- Fusco, F. M., Puro, V., Di Caro, A., Nicastrì, E., Carannante, N., Faella, F. S., *et al.* (2006). Cases of Chikungunya fever in Italy in travellers returning from the Indian Ocean and risk of introduction of the disease to Italy. *Le infezioni in medicina : rivista periodica di eziologia, epidemiologia, diagnostica, clinica e terapia delle patologie infettive*, 14, 238–245.
- Garrett-Jones, C. & Grab, B. (1964). The Assessment of Insecticidal Impact on the Malaria Mosquito's Vectorial Capacity, From Data on the Proportion of Parous Females. *Bulletin of the World Health Organization*, 31, 71–86.
- Gates, B. *The deadliest animal in the world.* www.gatesnotes.com/Health/Most-LethalAnimal-Mosquito-Week.
- Gérardin, P., Barau, G., Michault, A., Bintner, M., Randrianaivo, H., Choker, G., *et al.* (2008). Multidisciplinary prospective study of mother-to-child chikungunya virus infections on the island of La Réunion. *PLoS Medicine*, 5, 0413–0423.
- Gibney, K. B., Fischer, M., Prince, H. E., Kramer, L. D., George, K. S., Kosoy, O. L., *et al.* (2011). Chikungunya fever in the United States: A fifteen year review of cases. *Clinical Infectious Diseases*, 52, 121–126.
- Girard, Y. A., Klingler, K. A. & Higgs, S. (2004). West Nile virus dissemination and tissue tropisms in orally infected *Culex pipiens quinquefasciatus*. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 4, 109–122.
- Girod, R., Gaborit, P., Marrama, L., Etienne, M., Ramdini, C., Rakotoarivony, I., *et al.* (2011). Viewpoint: High susceptibility to Chikungunya virus of *Aedes aegypti* from the French West Indies and French Guiana. *Tropical Medicine and International Health*, 16, 134–139.
- Gjenero-Margan, I., Aleraj, B., Krajcar, D., Lesnikar, V., Klobučar, a., Pem-Novosel, I., *et al.* (2011). Autochthonous dengue fever in Croatia, August-September 2010. *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 16.
- Glomb-Reinmund, S & Kielian, M (1998). The role of low pH and disulfide shuffling in the entry and fusion of Semliki Forest virus and Sindbis virus. *Virology*, 248, 372–381.
- Gorrochotegui-Escalante, N., Gomez-Machorro, C., Lozano-Fuentes, S., Fernandez-Salas, I., Munoz, M. D. L., Farfan-Ale, J. A., *et al.* (2002). Breeding structure of *Aedes aegypti* pop-

- ulations in Mexico varies by region. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 66, 213–222.
- Goudet, J. (1995). FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485–486.
- Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S., Thiberge, J.M., Souarès, Y., Failloux, A.B., *et al.* (2011). Chikungunya virus, Southeastern France. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 910–913.
- Gratz, N.G. (2004). Critical review of *Aedes albopictus*. *Medical and Veterinary Entomology*, 18, 215–227.
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, 11, 480–496.
- Gubler, D. J. & Rosen, L. (1976). A simple technique for demonstrating transmission of dengue virus by mosquitoes without the use of vertebrate hosts. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 25, 146–150.
- Gubler, D. J. (2002). The Global Emergence / Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Archives of Medical Research*, 33, 330–342.
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., *et al.* (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology*, 8, S7–S16.
- Halstead, S. B. (2015). Reappearance of Chikungunya, Formerly Called Dengue, in the Americas. *Emerging Infectious Diseases*, 21, 557–561.
- Hammar, L., Markarian, S., Haag, L., Lankinen, H., Salmi, A. & Holland Cheng, R. (2003). Pre-fusion rearrangements resulting in fusion peptide exposure in Semliki Forest virus. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 7189–7198.
- Hancock, J. M. (1995). The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *Journal of molecular evolution*, 41, 1038–1047.
- Hanson, S.M. & Craig, G.B. (1994). Cold acclimation, diapause, and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera : Culicidae). *Journal of medical entomology*, 31, 192–201.
- Hardy, J.L., Houk, E. J., Kramer, L.D. & Reeves, W.C. (1983). Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual review of entomology*, 28, 229–262.
- Harrington, L. C., Fleisher, A., Ruiz-Moreno, D., Vermeylen, F., Wa, C. V., Poulson, R. L., *et al.* (2014). Heterogeneous Feeding Patterns of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*, on Individual Human Hosts in Rural Thailand. *PLoS neglected tropical diseases*, 8, e3048.
- Hawley, W.A. (1988). The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement*, 1, 1–39.
- Hawley, W. a., Reiter, P., Copeland, R. S., Pumpuni, C.B. & Craig, G.B. (1987). *Aedes albopictus* in North America: probable introduction in used tires from northern Asia. *Science (New York, N.Y.)*, 236, 1114–1116.
- Henry, J.-P. & Gouyon, P.-H. (1998). *Précis de génétique des populations*. Masson Paris. Paris, p. 186.
- Herrera, F., Urdaneta, L., Rivero, J., Zoghbi, N., Ruiz, J., Carrasquel, G., *et al.* (2006). Population genetic structure of the dengue mosquito *Aedes aegypti* in Venezuela. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*, 101, 625–633.

- Hess, A. M., Prasad, A. N., Ptitsyn, A., Ebel, G. D., Olson, K. E., Barbacioru, C., *et al.* (2011). Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense. *BMC microbiology*, 11, 45.
- Hillyer, J. F. (2010). Mosquito immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 708, 218–238.
- Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics*, 6, 65–70.
- Hurlbut, H. S. (1966). Mosquito salivation and virus transmission. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 15, 989–993.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: A cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801–1806.
- James, A. A. (1994). Molecular and biochemical analysis of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bull Inst Pasteur*, 92, 133–150.
- Jupp, P. G. & McIntosh, B. M. (1990). *Aedes furcifer* and other mosquitoes as vectors of chikungunya virus at mica, northeastern transvaal south Africa, 5–10.
- Kambhampati, S, Black, W. C. & Rai, K. S. (1991). Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. *Heredity*, 67, 85–93.
- Kamerow, D. (2014). The world’s deadliest animal. *Bmj*, 348, g3258–g3258.
- Kamimura, K., Matsuse, I. T., Takahashi, H., Komukai, J., Fukuda, T. & Suzuki Kayo, M. (2002). Effect of temperature on the development of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Medical entomology and zoology*, 53, 53–58.
- Kawashima, K. D., Suarez, L.-A. C., Labayo, H. K. M., Liles, V. R., Salvoza, N. C., Klinzing, D. C., *et al.* (2014). Complete genome sequence of chikungunya virus isolated in the Philippines. *Genome announcements*, 2, 2–3.
- Kay, B. H., Ives, W. A., Whelan, P. I., Barker-Hudson, P., Fanning, I. D. & Marks, E. N. (1990). Is *Aedes albopictus* in Australia? *Medical Journal of Australia*, 153, 31–34.
- Kelvin, A. a. (2011). Outbreak of Chikungunya in the Republic of Congo and the global picture. *Journal of Infection in Developing Countries*, 5, 441–444.
- King, A. M., Adams, M. J., Carstens, E. B. & Lefkowitz, E. J. (2012). *Virus taxonomy : classification and nomenclature of viruses : ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Ed. by Waltham, M. A. P. London, p. 1327.
- Klimstra, W. B., Nangle, E. M., Smith, M. S., Yurochko, A. D. & Ryman, K. D. (2003). DC-SIGN and L-SIGN can act as attachment receptors for alphaviruses and distinguish between mosquito cell- and mammalian cell-derived viruses. *Journal of virology*, 77, 12022–12032.
- Klobucar, A., Merdić, E., Benić, N., Baklaić, Z. & Krcmar, S. (2006). First record of *Aedes albopictus* in Croatia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 22, 147–148.
- Kumar, N. P., Joseph, R., Kamaraj, T. & Jambulingam, P. (2008). A226V mutation in virus during the 2007 chikungunya outbreak in Kerala, India. *Journal of General Virology*, 89, 1945–1948.
- Kumar, N. P., Suresh, A., Vanamail, P., Sabesan, S., Krishnamoorthy, K. G., Mathew, J., *et al.* (2011). Chikungunya virus outbreak in Kerala, India, 2007: A seroprevalence study. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 106, 912–916.

- La Linn, M, Gardner, J, Warrilow, D, Darnell, G. A., McMahon, C. R., Field, I, *et al.* (2001). Arbovirus of marine mammals: a new alphavirus isolated from the elephant seal louse, *Lepidophthirus macrorhini*. *Journal of virology*, 75, 4103–4109.
- Labadie, K., Larcher, T., Joubert, C., Mannioui, A., Delache, B., Brochard, P., *et al.* (2010). Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. *Journal of Clinical Investigation*, 120, 894–906.
- Lambrechts, L. (2011). Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: Towards a new paradigm? *Trends in Parasitology*, 27, 111–114.
- Lambrechts, L., Halbert, J., Durand, P., Gouagna, L. C. & Koella, J. C. (2005). Host genotype by parasite genotype interactions underlying the resistance of anopheline mosquitoes to *Plasmodium falciparum*. *Malaria journal*, 4, 3.
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R. G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., Jarman, R. G. & Scott, T. W. (2009). Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC evolutionary biology*, 9, 160.
- Lefèvre, T., Vantaux, A., Dabiré, K. R., Mouline, K. & Cohuet, A. (2013). Non-Genetic Determinants of Mosquito Competence for Malaria Parasites. *PLoS Pathogens*, 9.
- Lehmann, T., Hawley, W. a. & Collins, F. H. (1996). An evaluation of evolutionary constraints on microsatellite loci using null alleles. *Genetics*, 144, 1155–1163.
- Lemant, J., Boisson, V., Winer, A., Thibault, L., Andre, H., Tixier, F., *et al.* (2008). Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006. *Critical care medicine*, 36, 2536–2541.
- Leparc-Goffart, I., Nougairede, A., Cassadou, S., Prat, C. & De Lamballerie, X. (2014). Chikungunya in the Americas. *The Lancet*, 383, 514.
- Lequime, S. & Lambrechts, L. (2014). Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: A historical perspective. *Infection, Genetics and Evolution*,
- Leroy, E. M., Nkoghe, D., Ollomo, B., Nze-Nkogue, C., Becquart, P., Grard, G., *et al.* (2009). Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerging Infectious Diseases*, 15, 591–593.
- Levinson, G & Gutman, G. A. (1987). Slipped-strand mispairing: a major mechanism for DNA sequence evolution. *Molecular biology and evolution*, 4, 203–221.
- Levitt, N. H., Ramsburg, H. H., Hasty, S. E., Repik, P. M., Cole, F. E. & Lupton, H. W. (1986). Development of an attenuated strain of chikungunya virus for use in vaccine production. *Vaccine*, 4, 157–162.
- Lounibos, L. P. (2002). Invasions by Insect Vectors of Human Disease. *Annual review of entomology*, 47, 233–266.
- Lounibos, L., Escher, R. & Oliveira, R Lourenço-de (2003). Asymmetric Evolution of Photoperiodic Diapause in Temperate and Tropical Invasive Populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Ecology and Population Ecology*, 96, 512–518.
- Lugo, E. D. C., Moreno, G., Zachariah, M. A., López, M. M., López, J. D., Delgado, M. A., *et al.* (2005). Identification of *Aedes albopictus* in urban Nicaragua. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 21, 325–327.
- Maia, R. T., Scarpassa, V. M., Maciel-Litaiff, L. H. & Tadei, W. P. (2009). Reduced levels of genetic variation in *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazonas State,

- Brazil, based on analysis of the mitochondrial DNA ND5 gene. *Genetics and molecular research : GMR*, 8, 998–1007.
- Manni, M., Gomulski, L., Aketarawong, N., Tait, G., Scolari, F., Somboon, P., *et al.* (2015). Molecular markers for analyses of intraspecific genetic diversity in the Asian Tiger mosquito, *Aedes albopictus*. *Parasites & vectors*, In press.
- Marquetti Fernández, M. D. C., Saint Jean, Y., Callaba, C. A. F. & Somarriba López, L. (2012). The first report of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Haiti. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 107, 279–281.
- Mas-Coma, S. & Bargues, M. D. (2009). Populations, hybrids and the systematic concepts of species and subspecies in Chagas disease triatomine vectors inferred from nuclear ribosomal and mitochondrial DNA. *Acta Tropica*, 110, 112–136.
- Matschiner, M. & Salzburger, W. (2009). TANDEM: Integrating automated allele binning into genetics and genomics workflows. *Bioinformatics*, 25, 1982–1983.
- McCrae, A. W., Henderson, B. E., Kirya, B. G. & Sempala, S. D. (1971). Chikungunya virus in the Entebbe area of Uganda: isolations and epidemiology. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 65, 152–168.
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W. C., Sidhu, M., Wang, Y.-F. & O’Neill, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science (New York, N.Y.)*, 323, 141–144.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Versteirt, V, Cull, B, Kampen, H, Fontenille, D, *et al.* (2015). An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bulletin of Entomological Research*, 1–27.
- Mellor, P. S. (2000). Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of comparative pathology*, 123, 231–47.
- Miller, M. J. & Loaiza, J. R. (2015). Geographic Expansion of the Invasive Mosquito *Aedes albopictus* across Panama — Implications for Control of Dengue and Chikungunya Viruses, 1–7.
- Moore, D. L., Causey, O. R., Carey, D. E., Reddy, S, Cooke, A. R., Akinkugbe, F. M., *et al.* (1975). Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964-1970. *Annals of tropical medicine and parasitology*, 69, 49–64.
- Morazzani, E. M., Wiley, M. R., Murreddu, M. G., Adelman, Z. N. & Myles, K. M. (2012). Production of virus-derived ping-pong-dependent piRNA-like small RNAs in the mosquito soma. *PLoS Pathogens*, 8.
- Moreira, L. a., Iturbe-Ormaetxe, I. n., Jeffery, J. a., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., *et al.* (2009). A *Wolbachia* Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell*, 139, 1268–1278.
- Mori, A. & Oda, T. (1981). Studies on the Egg Diapause and Overwintering of *Aedes albopictus* in Nagasaki. *Tropical medicine*, 23, 79–90.
- Morrison, T. E. (2014). Re-emergence of chikungunya virus. *Journal of virology*, 88, 11644–11647.
- Mourya, D. T., Yadav, P & Mishra, a. C. (2004). Effect of temperature stress on immature stages and susceptibility of *Aedes aegypti* mosquitoes to chikungunya virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 70, 346–50.

- Mousson, L., Martin, E., Zouache, K., Madec, Y., Mavingui, P. & Failloux, A. B. (2010). *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. *Molecular Ecology*, 19, 1953–1964.
- Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T., Schaffner, F., Vazeille, M. & Failloux, A.-B. (2005). Phylogeography of *Aedes (Stegomyia) aegypti* (L.) and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genetical research*, 86, 1–11.
- Moutailler, S., Barré, H., Vazeille, M. & Failloux, A. B. (2009). Recently introduced *Aedes albopictus* in Corsica is competent to Chikungunya virus and in a lesser extent to dengue virus. *Tropical Medicine and International Health*, 14, 1105–1109.
- Muthumani, K., Lankaraman, K. M., Laddy, D. J., Sundaram, S. G., Chung, C. W., Sako, E., *et al.* (2008). Immunogenicity of novel consensus-based DNA vaccines against Chikungunya virus. *Vaccine*, 26, 5128–5134.
- Navarro, J.-C., Quintero, L., Zorrilla, A. & Gonzalez, R. (2013). Molecular Tracing with Mitochondrial ND5 of the Invasive Mosquito *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse) in Northern South America. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 1, 1(4): 32–39.
- Ogata, K & Lopez Samayoa, A (1996). Discovery of *Aedes albopictus* in Guatemala. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 12, 503–506.
- Oliveira, R. Lourenço-de, Rua, A. V., Vezzani, D., Willat, G., Vazeille, M., Mousson, L. & Failloux, A. B. (2013). *Aedes aegypti* from temperate regions of South America are highly competent to transmit dengue virus. *BMC infectious diseases*, 13, 1–8.
- Paaijmans, K. P., Blanford, S., Bell, A. S., Blanford, J. I., Read, A. F. & Thomas, M. B. (2010). Influence of climate on malaria transmission depends on daily temperature variation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107, 15135–15139.
- Pan American Health Organization (PAHO) (2007). Health in the Americas, II-countries, 1–747.
- Pan American Health Organization (PAHO) (2013). Epidemiological Alerts and Updates Annual Report 2013, 1–61.
- Pan American Health Organization (PAHO) (2015). Number of Reported Cases of Chikungunya Fever in the Americas, by Country or Territory (2013-2015), p. 1.
- Pastorino, B., Muyembe-Tamfum, J. J., Bessaud, M., Tock, F., Tolou, H., Durand, J. P. & Peyrefitte, C. N. (2004). Epidemic resurgence of Chikungunya virus in Democratic Republic of the Congo: Identification of a new central African strain. *Journal of Medical Virology*, 74, 277–282.
- Paty, M. C., Six, C., Charlet, F., Heuzé, G., Cochet, a., Wiegandt, a., *et al.* (2014). Large number of imported chikungunya cases in Mainland France, 2014: A challenge for surveillance and response. *Eurosurveillance*, 19, 1–5.
- Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V. & Fontenille, D. (2009). *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*, 11, 1177–1185.
- Paupy, C., Brengues, C., Ndiath, O., Toty, C., Hervé, J. P. & Simard, F. (2010). Morphological and genetic variability within textit*Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infection, Genetics and Evolution*, 10, 473–480.

- Paupy, C., Le Goff, G., Brengues, C., Guerra, M., Revollo, J., Barja Simon, Z., *et al.* (2012). Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*, 12, 1260–1269.
- Peakall, R. & Smouse, P. E. (2012). GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*, 28, 2537–2539.
- Pena, C. J., Gonzalvez, G. & Chadee, D. D. (2003). Seasonal prevalence and container preferences of *Aedes albopictus* in Santo Domingo City, Dominican Republic. *Journal of vector ecology : journal of the Society for Vector Ecology*, 28, 208–212.
- Peyrefitte, C. N., Rousset, D., Pastorino, B. A. M., Pouillot, R., Bessaud, M., Tock, F., *et al.* (2007). Chikungunya virus, Cameroon, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 13, 768–771.
- Pfeffer, M., Kinney, R. M. & Kaaden, O. R. (1998). The alphavirus 3'-nontranslated region: size heterogeneity and arrangement of repeated sequence elements. *Virology*, 240, 100–108.
- Pourrut, X., Nkoghé, D., Souris, M., Paupy, C., Paweska, J., Padilla, C., *et al.* (2010). Rift valley fever virus seroprevalence in human rural populations of Gabon. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 4, 2006–2007.
- Powell, J. R. & Tabachnick, W. J. (2013). History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - a review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 108, 11–17.
- Powers, A. M. & Logue, C. H. (2007). Changing patterns of chikunya virus: Re-emergence of a zoonotic arbovirus. *Journal of General Virology*, 88, 2363–2377.
- Pritchard, J. K., Stephens, M & Donnelly, P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Pritchard, J. K. (2010). Documentation for structure software : Version 2 . 3. *In Practice*, 6, 321–326.
- Rai, K.S. (1991). *Aedes albopictus* in the Americas. *Annual review of entomology*, 36, 459–484.
- Rambaut, A (2009). FigTree v1.3.1. 2006-2009. Accessed on November 29, 2012, Program package available at <http://tree.bio.ed.ac>.
- Ratsitorahina, M., Harisoa, J., Ratovonjato, J., Biacabe, S., Reynes, J. M., Zeller, H., *et al.* (2008). Outbreak of dengue and chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1135–1137.
- Receveur, M., Ezzedine, K., Pistone, T. & Malvy, D. (2010). Chikungunya infection in a French traveller returning from the Maldives, October, 2009. *Eurosurveillance*, 15, 1–2.
- Reiskind, M. H., Pesko, K., Westbrook, C. J. & Mores, C. N. (2008). Susceptibility of Florida Mosquitoes to Infection with Chikungunya Virus, 78, 422–425.
- Reiter, P (1998). *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988-1995: the shape of things to come? *Journal of the American Mosquito Control Association*, 14, 83–94.
- Reiter, P & Darsie, R (1984). *Aedes albopictus* in Memphis, Tennessee (USA): an achievement of modern transportation? *Mosquito News*, 44, 396–399.
- Renault, P., Solet, J. L., Sissoko, D., Balleydier, E., Larrieu, S., Filleul, L., *et al.* (2007). A major epidemic of chikungunya virus infection on Réunion Island, France, 2005-2006. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 77, 727–731.
- Renault, P., Jossieran, L. & Pierre, V. (2008). Chikungunya-related fatality rates, Mauritius, India, and Reunion Island. *Emerging Infectious Diseases*, 14, 1327.

- Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A., Panning, M., *et al.* (2007). Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet*, 370, 1840–1846.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution*, 43, 223–225.
- Richards, S. L., Anderson, S. L. & Smartt, C. T. (2010). Vector competence of Florida mosquitoes for chikungunya virus. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*, 35, 439–443.
- Rico-Hesse, R., Harrison, L. M., Salas, R. A., Tovar, D., Nisalak, A., Ramos, C, *et al.* (1997). Origins of dengue type 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*, 230, 244–251.
- Robinson, M. C. (1955). An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. I. Clinical features. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 49, 28–32.
- Roderick, G. K. (1996). Geographic structure of insect populations: gene flow, phylogeography, and their uses. *Annual review of entomology*, 41, 325–352.
- Rodhain, F. & Perez, C (1985). *Précis dentomologie médicale et vétérinaire*. Ed. by Maloine S. A. Paris, p. 458.
- Romoser, W. S., Faran, M. E., Bailey, C. L. & Lerdthusnee, K (1992). An immunocytochemical study of the distribution of Rift Valley fever virus in the mosquito *Culex pipiens*. *Am J Trop Med Hyg*, 46, 489–501.
- Rosenberg, N. A. (2004). DISTRUCT: A program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137–138.
- Rousset, F. (2008). GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*, 8, 103–106.
- Russell, B. M., Kay, B. H. & Shipton, W (2001). Survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) eggs in surface and subterranean breeding sites during the northern Queensland dry season. *Journal of medical entomology*, 38, 441–445.
- Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E. & Beaty, B. J. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC microbiology*, 7, 1–13.
- Saluzzo, J.-F. (2009). *A la conquête des virus*. Editions B. Paris. Editions B, p. 255.
- Saluzzo, J. F. & Dodet, B. (1997). Facteurs d'émergence des maladies à arbovirus. *Médecine/Sciences*, 13, 1018–1024.
- Salvatella Agrello, R. (1997). *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae). Notificación de su presencia en Uruguay / *Aedes aegypti* (Diptera, culicidae). Report of finding in Uruguay. *Revista médica del Uruguay*, 13, 118–121.
- San Martín, J. L., Brathwaite, O., Zambrano, B., Solórzano, J. O., Bouckenooghe, A., Dayan, G. H. & Guzmán, M. G. (2010). The epidemiology of dengue in the Americas over the last three decades: A worrisome reality. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 82, 128–135.
- Sanders, H. R., Foy, B. D., Evans, A. M., Ross, L. S., Beaty, B. J., Olson, K. E. & Gill, S. S. (2005). Sindbis virus induces transport processes and alters expression of innate immunity pathway genes in the midgut of the disease vector, *Aedes aegypti*. *Insect biochemistry and molecular biology*, 35, 1293–307.

- Santhosh, S. R., Dash, P. K., Parida, M., Khan, M. & Rao, P. V. L. (2009). Appearance of E1: A226V mutant Chikungunya virus in Coastal Karnataka, India during 2008 outbreak. *Virology journal*, 6, 1–6.
- Sarkar, J. K., Chatterjee, S. N., Chakravarti, S. K. & Mitra, A. C. (1965). Chikungunya virus infection with haemorrhagic manifestations. eng. *The Indian journal of medical research*, 53, 921–925.
- Savage, H. M., Ezike, V. I., Nwankwo, A. C., Spiegel, R & Miller, B. R. (1992). First record of breeding populations of *Aedes albopictus* in continental Africa: implications for arboviral transmission. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 8, 101–103.
- Saxena, S. K., Singh, M, Mishra, N & Lakshmi, V (2006). Resurgence of chikungunya virus in India: an emerging threat. eng. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 11, E060810.2.
- Schaffner, F. & Karch, S. (2000). Première observation d'*Aedes albopictus* (Skuse , 1894) en France métropolitaine, 323, 373–375.
- Schaffner, F., Van Bortel, W. & Coosemans, M. (2004). First record of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in Belgium. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 20, 201–203.
- Schatzmayr, H. G. (2000). Dengue Situation in Brazil by Year 2000. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 95, 179–181.
- Scholte, E. J., Dijkstra, E., Blok, H., De Vries, A., Takken, W., Hofhuis, A., *et al.* (2008). Accidental importation of the mosquito *Aedes albopictus* into the Netherlands: A survey of mosquito distribution and the presence of dengue virus. *Medical and Veterinary Entomology*, 22, 352–358.
- Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M. C., *et al.* (2006). Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Medicine*, 3, 1058–1070.
- Schwartz, O. & Albert, M. L. (2010). Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature reviews. Microbiology*, 8, 491–500.
- Schweigmann, N., Vezzani, D., Orellano, P., Kuruc, J. & Boffi, R. (2004). *Aedes albopictus* in an area of Misiones, Argentina. *Revista de Saude Publica*, 38, 136–138.
- Scott, T. W., Chow, E, Strickman, D, Kittayapong, P, Wirtz, R. A., Lorenz, L. H. & Edman, J. D. (1993). Blood-feeding patterns of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) collected in a rural Thai village. *Journal of medical entomology*, 30, 922–927.
- Scott, T. W. & Morrison, A. C. FRONTIS, Wageningen, The Netherlands, pp. 187–206.
- Sergon, K., Njuguna, C., Kalani, R., Ofula, V., Onyango, C., Konongoi, L. S., *et al.* (2008). Seroprevalence of Chikungunya virus (CHIKV) infection on Lamu Island, Kenya, October 2004. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 78, 333–337.
- Sissoko, D., Malvy, D., Giry, C., Delmas, G., Paquet, C., Gabrie, P., *et al.* (2008). Outbreak of Chikungunya fever in Mayotte, Comoros archipelago, 2005-2006. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 102, 780–786.
- Slatkin, M. & Takahata, N. The average frequency of private alleles in a partially isolated population. *Theoretical Population Biology*, 28, 314–331.
- Slosek, J (1986). *Aedes aegypti* mosquitoes in the Americas: a review of their interactions with the human population. *Social science & medicine*, 23, 249–257.

- Smith, C. E. G. (1956). The history of dengue in tropical Asia and its probable relationship to the mosquito *Aedes aegypti*. eng. *The Journal of tropical medicine and hygiene*, 59, 243–251.
- Smith, D. R., Carrara, A. S., Aguilar, P. V. & Weaver, S. C. (2005). Evaluation of methods to assess transmission potential of Venezuelan equine encephalitis virus by mosquitoes and estimation of mosquito saliva titers. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 73, 33–39.
- Smith, G. P. (1976). Evolution of repeated DNA sequences by unequal crossover. *Science (New York, N.Y.)*, 191, 528–535.
- Soekiman, S., Matsumura, T. & Yamanishi, H. (1986). Multiplication of Chikungunya virus in salivary glands of *Aedes albopictus* (Oahu strain) mosquitoes: an electron microscopic study. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.*, 39, 207–211.
- Solignat, M., Gay, B., Higgs, S., Briant, L. & Devaux, C. (2009). Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. *Virology*, 393, 183–197.
- Soper, F. L. (1963). The elimination of urban yellow fever in the Americas through the eradication of *Aedes aegypti*. *American journal of public health*, 53, 7–16.
- Spence, L. P. & Thomas, L (1959). Application of haemagglutination and complement fixation techniques to the identification and serological classification of arthropod-borne viruses; studies on Chikungunya and Makonde viruses. eng. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 53, 248–255.
- Sprenger, D & Wuithiranyagool, T (1986). The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. eng. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 2, 217–219.
- Stapleford, K. a., Coffey, L. L., Lay, S., Bordería, A. V., Duong, V., Isakov, O., *et al.* (2014). Emergence and transmission of arbovirus evolutionary intermediates with epidemic potential. *Cell Host and Microbe*, 15, 706–716.
- Staples, J. E., Breiman, R. F. & Powers, A. M. (2009). Chikungunya fever: an epidemiological review of a re-emerging infectious disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 49, 942–948.
- StaSoft Inc (2013). *Statistica Data analysis software system, version 8*.
- Strauss, J. H. & Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological reviews*, 58, 491–562.
- Suhrbier, A., Jaffar-Bandjee, M.-C. & Gasque, P. (2012). Arthritogenic alphaviruses—an overview. *Nature Reviews Rheumatology*, 8, 420–429.
- Tabachnick, W. J. (1991). The evolutionary relationships among arboviruses and the evolutionary relationships of their vectors provides a method for understanding vector-host interactions. *Journal of medical entomology*, 28, 297–298.
- Tabachnick, W. J. & Powell, J. R. (1979). A world-wide survey of genetic variation in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Genetical research*, 34, 215–229.
- Tabachnick, W. J., Wallis, G. P., Aitken, T. H., Miller, B. R., Amato, G. D., Lorenz, L, *et al.* (1985). Oral infection of *Aedes aegypti* with yellow fever virus: geographic variation and genetic considerations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 34, 1219–1224.

- Talbalaghi, a., Moutailler, S., Vazeille, M. & Failloux, a.B. (2010). Are *Aedes albopictus* or other mosquito species from northern Italy competent to sustain new arboviral outbreaks? *Medical and Veterinary Entomology*, 24, 83–87.
- Tautz, D. & Renz, M. (1984). Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, 12, 4127–4138.
- Teixeira, M., Andrade, A., da Conceição N Costa, M, Castro, J. S. M., Oliveira, F. L. S., Goes, C, *et al.* (2015). East / Central / South African Genotype Chikungunya Virus, Brazil, 2014. *Emerging Infectious Diseases*, 21, 906–907.
- Tesh, R. B., Gubler, D. J. & Rosen, L (1976). Variation among geographic strains of *Aedes albopictus* in susceptibility to infection with chikungunya virus. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 25, 326–335.
- Tesh, R. B., Watts, D. M., Russell, K. L., Damodaran, C, Calampa, C, Cabezas, C, *et al.* (1999). Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 28, 67–73.
- Thaung, U, Ming, C. K., Swe, T & Thein, S (1975). Epidemiological features of dengue and chikungunya infections in Burma. eng. *The Southeast Asian journal of tropical medicine and public health*, 6, 276–283.
- Tilston, N., Skelly, C. & Weinstein, P. (2009). Pan-European Chikungunya surveillance: designing risk stratified surveillance zones. *International journal of health geographics*, 8, 1–11.
- Tsetsarkin, K. a., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E. & Higgs, S. (2007). A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens*, 3, 1895–1906.
- Tsetsarkin, K. a., Chen, R., Sherman, M. B. & Weaver, S. C. (2011). Chikungunya virus: Evolution and genetic determinants of emergence. *Current Opinion in Virology*, 1, 310–317.
- Tsetsarkin, K. a., Chen, R., Yun, R., Rossi, S. L., Plante, K. S., Guerbois, M., *et al.* (2014). Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nature communications*, 5, 1–14.
- Tyagi, B. K. & Hiriyan, J. (2004). Breeding of dengue vector *Aedes aegypti* (Linnaeus) in rural Thar desert, north-western Rajasthan, India. *Dengue Bulletin*, 28, 220–222.
- Urbanelli, S., Bellini, R., Carrieri, M., Sallicandro, P. & Celli, G. (2000). Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): The mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity*, 84, 331–337.
- Urbanski, J. M., Aruda, A. & Armbruster, P. (2010). A transcriptional element of the diapause program in the Asian tiger mosquito, *Aedes albopictus*, identified by suppressive subtractive hybridization. *Journal of Insect Physiology*, 56, 1147–1154.
- Urdaneta-Marquez, L. & Failloux, A.-B. (2011). Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases*, 11, 253–61.
- Van Bortel, W., Dorleans, F., Rosine, J., Blateau, a., Rousseau, D., Matheus, S., *et al.* (2014). Chikungunya outbreak in the Caribbean region, December 2013 to March 2014, and the significance for Europe. *Eurosurveillance*, 19, 1–11.

- Vanlandingham, D. L., Hong, C., Klingler, K., Tsetsarkin, K., McElroy, K. L., Powers, A. M., *et al.* (2005). Differential infectivities of O'nyong-nyong and chikungunya virus isolates in *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 72, 616–621.
- Vanlandingham, D. L., Tsetsarkin, K., Klingler, K. A., Hong, C., McElroy, K. L., Lehane, M. J. & Higgs, S. (2006). Determinants of vector specificity of o'nyong nyong and chikungunya viruses in *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 74, 663–669.
- Vasilakis, N., Cardoso, J., Hanley, K. a., Holmes, E. C. & Weaver, S. C. (2011). Fever from the forest: prospects for the continued emergence of sylvatic dengue virus and its impact on public health. *Nature reviews. Microbiology*, 9, 532–541.
- Vazeille, M., Rosen, L., Mousson, L. & Failloux, A. B. (2003). Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 68, 203–208.
- Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., *et al.* (2007). Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*, 2.
- Vazeille, M., Jeannin, C., Martin, E., Schaffner, F. & Failloux, A. B. (2008). Chikungunya: A risk for Mediterranean countries? *Acta Tropica*, 105, 200–202.
- Vega-Rua, A., Zouache, K., Caro, V., Diancourt, L., Delaunay, P., Grandadam, M. & Failloux, A. B. (2013). High Efficiency of Temperate *Aedes albopictus* to Transmit Chikungunya and Dengue Viruses in the Southeast of France. *PLoS ONE*, 8, 1–8.
- Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B. & Oliveira, R. Lourenço-de (2014). High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *Journal of virology*, 88, 6294–6306.
- Vezzani, D. & Carbajo, A. E. (2008). *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and dengue in Argentina: current knowledge and future directions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 103, 66–74.
- Vodovar, N., Bronkhorst, A. W., Cleef, K. W. R. van, Miesen, P., Blanc, H., Rij, R. P. van & Saleh, M. C. (2012). Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells. *PLoS ONE*, 7.
- Volk, S. M., Chen, R., Tsetsarkin, K. a., Adams, a. P., Garcia, T. I., Sall, A. a., *et al.* (2010). Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *Journal of virology*, 84, 6497–6504.
- Wallace, B (1968). *Topics in Population Genetics*. Bruce Wallace. Norton, New York.
- Wallis, G. P., Tabachnick, W. J. & Powell, J. R. (1984). Genetic heterogeneity among Caribbean populations of *Aedes aegypti*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 33, 492–498.
- Wang, E., Volkova, E., Adams, A. P., Forrester, N., Xiao, S.-Y., Frolov, I. & Weaver, S. C. (2008). Chimeric alphavirus vaccine candidates for chikungunya. *Vaccine*, 26, 5030–5039.
- Wang, K. S., Kuhn, R. J., Strauss, E. G., Ou, S & Strauss, J. H. (1992). High-affinity laminin receptor is a receptor for Sindbis virus in mammalian cells. *Journal of virology*, 66, 4992–5001.

- Watts, D. M. & Eldridge, B. F. (1975). Transovarial transmission of arboviruses by mosquitoes: a review. *Medical biology*, 53, 271–278.
- Watts, D. M., Burke, D. S., Harrison, B. A., Whitmire, R. E. & Nisalak, A. (1987). Effect of temperature on the vector efficiency of *Aedes aegypti* for dengue 2 virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 36, 143–52.
- Weaver, S. C. (2014). Arrival of Chikungunya Virus in the New World: Prospects for Spread and Impact on Public Health. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8, 6–9.
- Weaver, S. C. & Barrett, A. D. T. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature reviews. Microbiology*, 2, 789–801.
- Weaver, S. C. & Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, 85, 328–345.
- Weaver, S. C., Winegar, R., Manger, I. D. & Forrester, N. L. (2012). Alphaviruses: Population genetics and determinants of emergence. *Antiviral Research*, 94, 242–257.
- Weir, B. S. (1996). Genetic data analysis II: Methods for discrete population genetic data. *Sinauer Associates, Sunderland, MA*, p. 376.
- Weir, B. S. & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358–1370.
- Woodall J. (1995). *Aedes albopictus* – Honduras., Disponible en: http://www.promedmail.org/pls/promed/f?p=2400:CHECK_DISPLAY,F2400_P1202_PUB_MAIL_ID:X,12033.
- Wright, S. (1965). The Interpretation of Population Structure by F-Statistics with Special Regard to Systems of Mating. *Evolution*, 19, 395–420.
- Wymann, M. N., Flacio, E., Radczuweit, S., Patocchi, N. & Luthy, P. (2008). Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) - a threat for Switzerland? *Euro surveillance : bulletin européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, 13, 8–9.
- Xi, Z., Dean, J. L., Khoo, C. & Dobson, S. L. (2005). Generation of a novel *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* (Asian tiger mosquito) via embryonic microinjection. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 35, 903–910.
- Xi, Z., Ramirez, J. L. & Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathogens*, 4.
- Xiao, F.-Z., Zhang, Y., Deng, Y.-Q., He, S., Xie, H.-G., Zhou, X.-N. & Yan, Y.-S. (2014). The effect of temperature on the extrinsic incubation period and infection rate of dengue virus serotype 2 infection in *Aedes albopictus*. *Archives of virology*, 3053–3057.
- Yergolkar, P. N., Tandale, B. V., Arankalle, V. A., Sathe, P. S., Sudeep, A. B., Gandhe, S. S., *et al.* (2006). Chikungunya outbreaks caused by African genotype, India. *Emerging Infectious Diseases*, 12, 1580–1583.
- Zouache, K., Fontaine, a, Vega-Rua, a, Mousson, L, Thiberge, J, Lourenco-De-Oliveira, R, *et al.* (2014). Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society*, 281, 20141078–.
- Zouache, K., Michelland, R. J., Failloux, A. B., Grundmann, G. L. & Mavingui, P. (2012). Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Molecular Ecology*, 21, 2297–2309.

Annexes

Annexe 1

High Efficiency of Temperate *Aedes albopictus* to Transmit Chikungunya and Dengue Viruses in the Southeast of France

Anubis Vega-Rua¹, Karima Zouache¹, Valerie Caro², Laure Diancourt², Pascal Delaunay³, Marc Grandadam⁴✉, Anna-Bella Failloux^{1*}

1 Department of Virology, Institut Pasteur, Arboviruses and Insect Vectors, Paris, France, **2** Department of Infection and Epidemiology, Institut Pasteur, Genotyping of Pathogens and Public Health, Paris, France, **3** Hôpital de l'Archet, Centre Hospitalier Universitaire de Nice, and Inserm U1065/Université de Nice-Sophia Antipolis, Laboratoire de Parasitologie–Mycologie, Nice, France, **4** Department of Virology, Institut Pasteur, Molecular Interactions Flavivirus-Hosts, National Reference Center for Arboviruses, Paris, France

Abstract

Background: Since 2005, cases of chikungunya (CHIK) were caused by an unusual vector, *Aedes albopictus*. This mosquito, present in Europe since 1979, has gained importance since its involvement in the first CHIK outbreak in Italy in 2007. The species is capable of transmitting experimentally 26 arboviruses. However, the vectorial status of its temperate populations has remained little investigated. In 2010, autochthonous cases of CHIK and dengue (DEN) were reported in southeastern France. We evaluated the potential of a French population of *Ae. albopictus* in the transmission of both viruses.

Methodology and Principal Findings: We used two strains of each virus, CHIK and DEN: one strain was isolated from an imported case, and one from an autochthonous case. We used as controls *Aedes aegypti* from India and Martinique, the source of the imported cases of CHIK and DEN, respectively. We showed that *Ae. albopictus* from Cagnes-sur-Mer (AL-CSM) was as efficient as the typical tropical vector *Ae. aegypti* from India to experimentally transmit both CHIK strains isolated from patients in Fréjus, with around 35–67% of mosquitoes delivering up to 14 viral particles at day 3 post-infection (pi). The unexpected finding came from the high efficiency of AL-CSM to transmit both strains of DENV-1 isolated from patients in Nice. Almost 67% of *Ae. albopictus* AL-CSM which have ensured viral dissemination were able to transmit at day 9 pi when less than 21% of the typical DEN vector *Ae. aegypti* from Martinique could achieve transmission.

Conclusions/Significance: Temperate *Ae. albopictus* behaves differently compared to its counterpart from tropical regions, where recurrent epidemic outbreaks occur. Its potential responsibility for outbreaks in Europe should not be minimized.

Citation: Vega-Rua A, Zouache K, Caro V, Diancourt L, Delaunay P, et al. (2013) High Efficiency of Temperate *Aedes albopictus* to Transmit Chikungunya and Dengue Viruses in the Southeast of France. PLoS ONE 8(3): e59716. doi:10.1371/journal.pone.0059716

Editor: Luciano A. Moreira, Centro de Pesquisas René Rachou, Brazil

Received: November 28, 2012; **Accepted:** February 17, 2013; **Published:** March 18, 2013

Copyright: © 2013 Vega-Rua et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: AVR was supported by the European Commission Framework Program Seven Award "InfraVec" (project number 228421). The research leading to these results has received funding from the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007–2013) under the project "VECTORIE", EC grant agreement number 261466. This study has also received funding from the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant number ANR-10-LABX-62-IBEID). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

* E-mail: anna-bella.failloux@pasteur.fr

✉ Current address: Arboviruses and Emerging Viral Diseases Laboratory, Institut Pasteur of Lao PDR, Vientiane, Laos

Introduction

In September 2010, a few cases of dengue (DEN) and chikungunya (CHIK) were reported in the southeast of France [1,2]. Patients did not move outside France during the preceding weeks, suggesting an autochthonous transmission of both viruses by the mosquito *Aedes albopictus*. This species, native to Southeast Asia, has expanded all over the world during the past decades, including to the south of Europe (reviewed in [3]). Since its first report in Albania in 1979 [4], *Ae. albopictus* has been found in 20 European countries including France [5]. This mosquito was first detected in 2004 in the city of Menton near the Italian border, and has gained ground each year. It is now established in seven French departments [6].

Ae. albopictus is able to transmit a large number of arboviruses (reviewed in [7]). Laboratory viral challenges gave evidence of the high efficiency of *Ae. albopictus* from Europe (Corsica and Italy) to ensure dissemination of CHIK virus (CHIKV) and to a lesser extent, DEN virus (DENV) [8,9]. However, its vectorial status in temperate regions has been debatable for a long time until the first European epidemic of CHIK in 2007 in Italy [10]. Its implication as vector has been corroborated in 2010 with the detection of CHIK and DEN cases in France and Croatia [1,2,11–13]. These unexpected cases illustrate the risk for European countries of arboviral outbreaks, supported by increasing numbers of viraemic travelers returning from endemic tropical regions [14].

In September 2010, two autochthonous cases of DENV-serotype 1 (DENV-1) were reported in Nice (southeastern France).

Molecular genotyping revealed that DENV-1 strains were similar to strains circulating in Martinique in 2010 [1]. At the same time, 50 km west of Nice, in Fréjus, two autochthonous cases of CHIKV were detected [11]. Viral genome sequences were identical to that isolated from a traveler returning from India (Rajasthan) [2]. A local transmission of both viruses has then been suspected as it coincided with the occurrence of high densities of *Ae. albopictus* [3,5]. The main aim of our study is to assess whether the temperate counterpart of *Ae. albopictus* collected in southeastern France shows a high ability to transmit CHIKV and DENV when compared to *Ae. aegypti*, the typical vector of both viruses in tropical endemic regions.

Materials and Methods

Ethics Statement

The Institut Pasteur animal facility has received accreditation from the French Ministry of Agriculture to perform experiments on live mice [see permit numbers at http://webcampus.pasteur.fr/jcms/c_97619/agrements-des-animaleries] in appliance of the French and European regulations on care and protection of the Laboratory Animals. This study was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) at the Institut Pasteur. No specific permits were required for the described field studies in locations which are not protected in any way and did not involve endangered or protected species.

Mosquitoes

Three colonies of *Aedes* mosquitoes were used: (i) *Ae. albopictus* collected in 2007 in the city of Cagnes-sur-Mer (AL-CSM) in southeast France; (ii) *Ae. aegypti* collected in 2010 in the district “Le Robert” in the French overseas department of Martinique (AA-Martinique); and (iii) *Ae. aegypti* from New-Delhi in India (AA-India). All colonies were derived from field-collected eggs. After hatching, larvae were split by 200 individuals per pan, fed with 1 yeast tablet dissolved in 1 liter of tap water. Emerging adults were maintained in cages at $28^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ with a light:dark cycle of 16 h:8 h, 80% relative humidity, and were supplied with a 10% sucrose solution. The F13 and F2 generations were respectively used for AL-CSM and AA-Martinique. AA-India has been maintained in laboratory since 1985.

Viral Strains

Four viral strains isolated from patients in Southeastern France were used: CHIKV (2010–1630 and 2010–1909) and DENV-1 (2010–1806 and 2010–2025). CHIKV 2010–1630 and DENV 2010–2025 were isolated from imported cases returning respectively from India and Martinique, whereas CHIKV 2010–1909 and DENV 2010–1806 were obtained from autochthonous cases who have not traveled during the preceding months. Viral strains were produced on African green monkey kidney Vero cells. The 2nd passage was used for experimental infections of mosquitoes. Serial dilutions were used to determine the titer of viral stocks that was expressed in plaque-forming units (PFU)/mL for CHIKV and focus-forming units (FFU)/mL for DENV.

Viral Genome Sequencing and Phylogenetic Analyses

Viral genomic RNA was extracted from CHIKV grown once on mosquito C6/36 cells. RT-PCR was performed using SuperScript One-Step RT-PCR with platinum Taq (Invitrogen) using primers targeting the complete genome [15]. Amplicons sequencing reactions were performed by using Big Dye Terminator v1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) and sequencing was performed in ABI3730XL sequence analyzer (Applied

Biosystems). For sequence analysis, contig assembly and sequence alignments were performed using program BioNumerics version 6.5 (Applied-Maths, Sint-Martens-Latem, Belgium). For phylogenetic analysis, maximum-likelihood tree was constructed using MEGA version 5 (www.megasoftware.net), based on the Tamura-Nei model. Reliability of nodes was assessed by bootstrap resampling with 1,000 replicates.

Mosquito Oral Infections

One-week-old females were fed on an infectious blood-meal containing 2 mL of washed rabbit erythrocytes, 1 mL of viral suspension supplemented with a phagostimulant (ATP) at a final concentration of 5 mM. The titer of the blood-meal was determined at $10^{7.3}$ PFU/mL for CHIKV and $10^{5.3}$ FFU/mL for DENV. Fully engorged females were transferred in cardboard containers and maintained with 10% sucrose at $28\pm 1^{\circ}\text{C}$.

Dissemination and Transmission Analysis

Batches of mosquitoes were analyzed at days 3, 6, 9 and 14 post-infection (pi) for CHIKV [15] and at days 9 and 14 pi for DENV [16].

To estimate the dissemination rate, heads were removed from mosquitoes and ground in 500 μL of Leibovitz L15 medium supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Obtained homogenates were then filtered with a Millipore[®] membrane (0.22 μm) for further titration. To estimate transmission, saliva was collected from individual mosquitoes as described in [17]. For each mosquito, wings and legs were removed and the proboscis was inserted into a 20 μL tip containing 5 μL of FBS. After 45 min, FBS containing saliva was expelled in 45 μL of Leibovitz L15 medium (Invitrogen) for titration.

Disseminated infection rate corresponds to the proportion of mosquitoes with infected head among tested ones. Transmission rate represents the proportion of mosquitoes with infectious saliva among mosquitoes able to disseminate the virus beyond the midgut barrier. Ultimately, transmission efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with virus in saliva among tested ones (i.e., surviving females including females unable to disseminate the virus and those able to disseminate).

Viral Titration of Mosquitoes

The number of infectious particles per saliva and per head homogenates was estimated by focus fluorescent assay on C6/36 *Ae. albopictus* cells. Samples were serially diluted and inoculated into C6/36 cells in 96-well plates. After incubation at 28°C for 3 days (CHIKV) or 5 days (DENV), plates were stained using hyper-immune ascetic fluid specific to CHIKV or DENV-1 as primary antibody. A Fluorescein-conjugated goat anti-mouse was used as the second antibody (Biorad).

Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with Stata software (StataCorp LP, Texas, and USA). The numbers of infectious particles in saliva and/or head homogenates were compared using Kruskal-Wallis test. Chi square test was used to compare disseminated infection rate, transmission rate and vector competence for each mosquito/virus pairing.

Results

Ae. albopictus from France is Susceptible to CHIKV

To compare the susceptibility of *Ae. albopictus* from France (AL-CSM) to CHIKV, *Ae. aegypti* from India (AA-India), where the imported case was originated, was also orally infected with two

viral strains: (i) CHIKV 2010–1630 strain that circulated in India in 2010 and (ii) CHIKV 2010–1909 strain isolated from a CHIK autochthonous case from Fréjus. These two viral strains, whose complete genome has been defined, differed only by one single-nucleotide, and showed a 100% identity at the amino acid level. As previously found [2], phylogenetic analysis based on complete genomes confirmed that the two CHIKV strains belong to the ECSA clade, in close relation with strains from India (Figure S1).

To measure the ability of mosquitoes to allow virus to overcome the midgut barrier, disseminated infection rate (DIR) was assessed at days 3, 6, 9 and 14 after the infectious blood-meal. DIR was calculated for each pairing mosquito/virus. After infection with CHIKV, DIR increased along with day pi to reach 100% at day 6 pi (Table 1), illustrating a high susceptibility of both mosquito species to the two CHIKV strains. Slight decreases of DIR were observed from day 6–9 pi to day 14 pi. When examining DIR according to day pi, a significant difference was only found for AA-India infected with CHIKV 2010-1909 (Chi square test: $p < 0.05$). No difference was found according to viral strains and mosquito species (Chi square test: $p > 0.05$).

The intensity of viral dissemination beyond the midgut barrier can be evaluated by estimating the number of viral particles in head homogenates (Figure 1). For *Ae. albopictus* AL-CSM, the maximum number of CHIKV particles was reached at day 6 pi with $5.7 \pm 0.7 \log_{10}$ particles for CHIKV 2010-1630 (Figure 1A) and at day 9 pi with $5.0 \pm 1.0 \log_{10}$ particles for CHIKV 2010-1909 (Figure 1B). For *Ae. aegypti* AA-India, the maximum viral load was detected at day 9 pi with $6.1 \pm 0.4 \log_{10}$ viral particles for CHIKV 2010-1630 (Figure 1A) and at day 14 pi with $6.0 \pm 0.3 \log_{10}$ viral particles for CHIKV 2010-1909 (Figure 1B). When considering each viral strain, AA-India had a slightly higher number of viral particles than AL-CSM at late days pi (Kruskal-Wallis test: $p < 0.05$). When considering each mosquito species, both viral strains were disseminated with similar efficiencies (Kruskal-Wallis test: $p > 0.05$).

To describe the ability of mosquitoes to allow virus to reach the salivary glands after replicating in different mosquito organs and to be transmitted with the saliva delivered by females during blood-feeding, transmission rate (TR) was assessed at days 3, 6, 9 and 14 after the infectious blood-meal. Viral detection in saliva revealed that TR reached a maximum (around 70–80%) at day 6 pi whatever the pairing mosquito/virus, and then declined gradually until day 14 pi (Table 1). When examining mosquito species, a slightly higher proportion of *Ae. aegypti* AA-India was able to

transmit CHIKV strains compared to *Ae. albopictus* AL-CSM. No difference was found between the two viral strains (Chi square test: $p > 0.05$) except at day 9 for *Ae. albopictus* AL-CSM (Chi square test: $p < 0.05$). When examining TR according to day pi, no significant difference was found except for *Ae. albopictus* AL-CSM infected with both CHIKV strains (Chi square test: $p < 0.05$).

The intensity of viral transmission can be calculated by estimating the viral load in saliva collected from mosquitoes. As expected, the number of CHIKV particles in saliva was lower than particles estimated in head homogenates (Figure 2). Virus in saliva was detected from day 3 pi and the number of viral particles did not fluctuate significantly along with day pi (Kruskal-Wallis test: $p > 0.05$). For *Ae. albopictus* AL-CSM, the maximum number of CHIKV particles in saliva was reached at day 6 pi with $1.6 \pm 0.8 \log_{10}$ particles for CHIKV 2010-1630 (Figure 2A) and $1.6 \pm 0.5 \log_{10}$ particles for CHIKV 2010-1909 (Figure 2B). For *Ae. aegypti* AA-India, the maximum viral load in saliva was detected at day 9 pi with $1.5 \pm 0.8 \log_{10}$ viral particles for CHIKV 2010-1630 (Figure 2A) and as soon as day 3 pi with $1.1 \pm 0.5 \log_{10}$ viral particles for CHIKV 2010-1909 (Figure 2B). Roughly, AL-CSM delivered more viral particles than AA-India for both CHIKV strains (Kruskal-Wallis test: $p < 0.05$).

Ultimately, transmission efficiency (TE) was also defined by estimating the proportion of mosquitoes with virus in saliva among tested ones. When comparing TE between the two viral strains for each mosquito species at a given day pi, no difference was found (Chi square test: $p > 0.05$) except at day 9 pi for *Ae. albopictus* AL-CSM. When examining TE according to day pi for each pairing mosquito/virus, significant difference was found (Chi square test: $p < 0.05$) except for *Ae. aegypti* AA-India infected with the imported CHIKV strain (2010-1630).

These results suggest that a higher proportion of *Ae. aegypti* AA-India was able to transmit both strains of CHIKV but with a lower number of virus in saliva than for *Ae. albopictus* AL-CSM. The imported CHIKV strain (2010–1630) as well as the autochthonous CHIKV strain (2010–1909) behave similarly.

Ae. albopictus from France is Unexpectedly Highly Susceptible to DENV

It is known that *Ae. albopictus* is an unusual vector of DENV compared to the typical vector, *Ae. aegypti*. Therefore, to measure the potential to transmit DENV of *Ae. albopictus* from France (AL-CSM) compared to *Ae. aegypti* from Martinique (AA-Martinique) where the imported case spent some times, mosquitoes were

Table 1. Disseminated infection rate, transmission rate and transmission efficiency to CHIKV strains of *Ae. albopictus* from France (AL-CSM) and *Ae. aegypti* from India (AA-INDIA) at different days post-infection.

Day pi	AA-India			AL-CSM			AA-India			AL-CSM		
	CHIKV-1909 [†]			CHIKV-1630 [‡]			CHIKV-1909 [†]			CHIKV-1630 [‡]		
	DIR	TR	TE	DIR	TR	TE	DIR	TR	TE	DIR	TR	TE
3	66.7 (15)	50 (10)	33.3 (15)	94.7 (19)	66.7 (18)	63.2 (19)	82.4 (17)	35.7 (14)	29.4 (17)	94.1 (17)	37.5 (16)	35.3 (17)
6	100 (23)	78.3 (23)	78.3 (23)	100 (19)	73.7 (19)	73.7 (19)	100 (19)	84.2 (19)	84.2 (19)	100 (18)	72.2 (18)	72.2 (18)
9	100 (20)	40 (20)	40 (20)	100 (20)	45 (20)	45 (20)	95 (20)	26.3 (19)	25 (20)	94.7 (19)	77.8 (18)	73.7 (19)
14	100 (22)	31.8 (22)	31.8 (22)	85 (20)	47.1 (17)	35 (20)	95.5 (22)	14.3 (21)	13.6 (22)	89.5 (19)	11.8 (17)	10.5 (19)

DIR: Disseminated infection rate corresponding to the proportion of mosquitoes with infected head among tested ones; TR: Transmission rate corresponding to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among mosquitoes able to disseminate the virus beyond the midgut barrier; TE: Transmission efficiency corresponding to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among tested ones; In parenthesis for DIR, number of mosquitoes analyzed; In parenthesis for TR, number of mosquitoes able to disseminate the virus beyond the midgut; In parenthesis for TE, number of mosquitoes analyzed; [†] Strain isolated from a French autochthonous case; [‡] Strain isolated from a French imported case.
doi:10.1371/journal.pone.0059716.t001

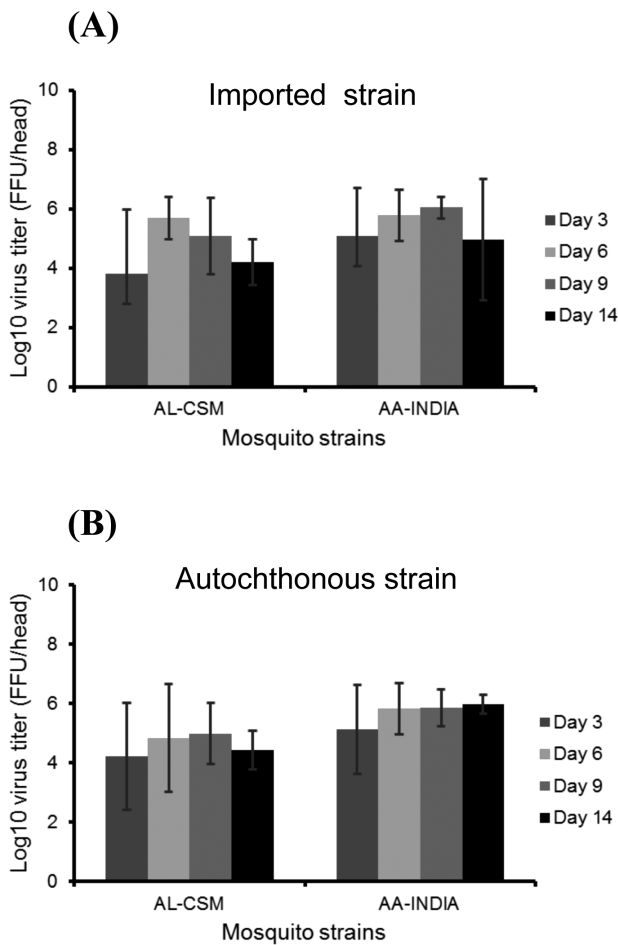


Figure 1. Dissemination of CHIKV in *Ae. albopictus* from France (AL-CSM) and *Ae. aegypti* from India (AA-India). At days 3, 6, 9, and 14 after infection with an infectious blood-meal, mosquitoes were sacrificed and heads were removed for viral titration. The number of infectious particles per head homogenate was estimated by focus fluorescent assay on C6/36 *Ae. albopictus* cells. Two viral strains were tested: (A) CHIKV-1630 strain that circulated in India in 2010 and (B) CHIKV-1909 strain isolated from a CHIKV autochthonous case from Fréjus. Error bars refer to the standard error between different mosquitoes. doi:10.1371/journal.pone.0059716.g001

infected with two viral strains: (i) DENV-2025 strain that circulated in Martinique in 2010 and (ii) DENV-1806 strain isolated from a DEN autochthonous case from Nice in 2010. Molecular analysis demonstrated that these two strains belonged to the serotype 1, presenting similarities with strains circulating at the same period in the French West Indies [1]. Complete genome sequence of both DENV strains will be available in a near future (Caro V, personal communication).

Disseminated infection rate (DIR), transmission rate (TR) and transmission efficiency (TE) were assessed at days 9 and 14 after the infectious blood-meal.

Dissemination of DENV in AA-Martinique after ingestion of the infectious blood-meal was characterized by high values of DIR from day 9 pi (~ >70%) whereas in AL-CSM, DIR fluctuated from 11.5 to 44.8% (Table 2). No difference was detected according to the day pi (Chi square test: $p > 0.05$) except for *Ae. albopictus* AL-CSM infected with the imported DENV strain

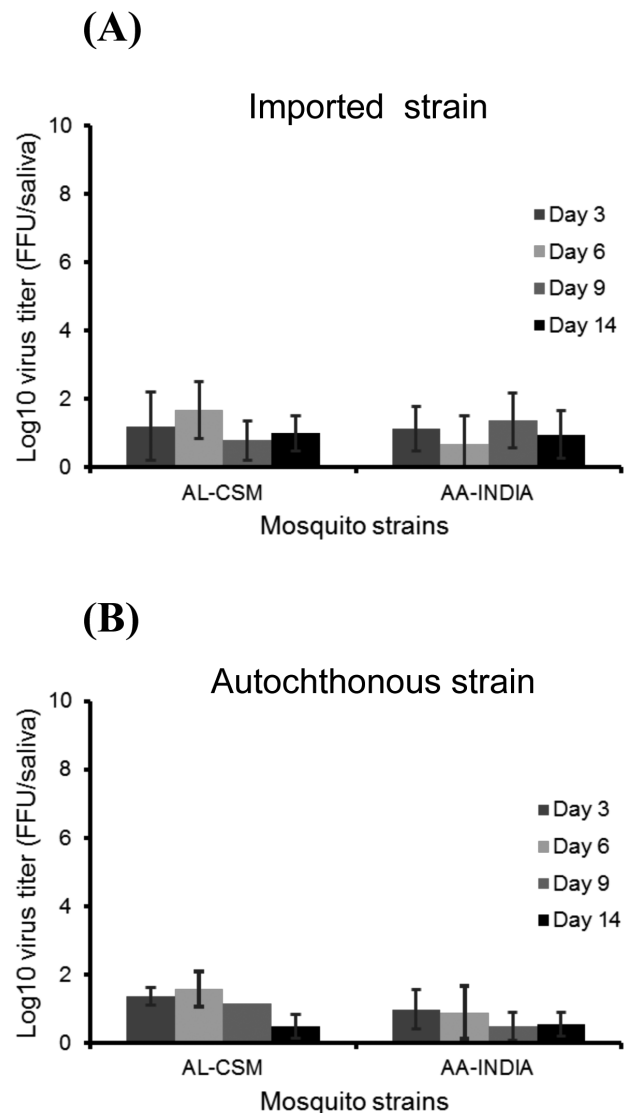


Figure 2. Transmission of CHIKV in saliva of *Ae. albopictus* from France (AL-CSM) and *Ae. aegypti* from India (AA-India). At days 3, 6, 9, and 14 after infection with an infectious blood-meal, mosquitoes were sacrificed and saliva was collected from individual mosquitoes and titrated by focus fluorescent assay on C6/36 *Ae. albopictus* cells. Two viral strains were tested: (A) CHIKV-1630 strain that circulated in India in 2010 and (B) CHIKV-1909 strain isolated from a CHIKV autochthonous case from Fréjus. Error bars refer to the standard error between different mosquitoes. doi:10.1371/journal.pone.0059716.g002

(2010–2025). Whatever the DENV strain, *Ae. aegypti* AA-Martinique showed higher values of DIR than *Ae. albopictus* AL-CSM (Chi square test: $p < 0.05$) (Table 2). Each mosquito population disseminated equally the two DENV strains (Chi square test: $p > 0.05$).

In order to compare the intensity of viral dissemination, the number of viral particles in head homogenates was estimated. The maximum number of DENV particles was reached at day 14 pi for each pairing mosquito/virus (Figure 3). *Ae. aegypti* AA-Martinique disseminated more DENV particles than *Ae. albopictus* AL-CSM (Kruskal-Wallis test: $p < 0.05$). When comparing the two

Table 2. Disseminated infection rate, transmission rate and transmission efficiency to DENV strains of *Ae. albopictus* from France (AL-CSM) and *Ae. aegypti* from Martinique (AA-Martinique) at two days post-infection.

Day pi	AA-Martinique						AL-CSM					
	DENV-1806 [†]			DENV-2025 [‡]			DENV-1806 [†]			DENV-2025 [‡]		
	DIR	TR	TE	DIR	TR	TE	DIR	TR	TE	DIR	TR	TE
9	86.4 (22)	21.1 (19)	18.2 (22)	68.4 (19)	15.4 (13)	10.5 (19)	12.5 (48)	66.7 (6)	8.3 (48)	11.5 (52)	66.7 (6)	7.7 (52)
14	96.2 (26)	4 (25)	3.8 (26)	84.2 (19)	12.5 (16)	10.5 (19)	28.1 (32)	55.6 (9)	15.6 (32)	44.8 (29)	61.5 (13)	27.6 (29)

DIR: Disseminated infection rate corresponding to the proportion of mosquitoes with infected head among tested ones; TR: Transmission rate corresponding to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among mosquitoes able to disseminate the virus beyond the midgut barrier; TE: Transmission efficiency corresponding to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among tested ones; In parenthesis for DIR, number of mosquitoes analyzed; In parenthesis for TR, number of mosquitoes able to disseminate the virus beyond the midgut; In parenthesis for TE, number of mosquitoes analyzed;
[†]Strain isolated from a French autochthonous case;
[‡]Strain isolated from a French imported case.
 doi:10.1371/journal.pone.0059716.t002

DENV strains for each mosquito strain, the number of viral particles was roughly similar (Kruskal-Wallis test: $p > 0.05$).

Viral transmission was examined by estimating TR for each pairing mosquito/virus. TRs varied from 4% to 21.4% for *Ae. aegypti* AA-Martinique and from 55.6% to 66.7% for *Ae. albopictus* AL-CSM, with a decrease from day 9 to day 14 pi (Table 2). Higher TRs were obtained for AL-CSM with both DENV strains (Chi square test: $p < 0.05$). No significant differences were found between the two DENV strains for a given mosquito species (Chi square test: $p > 0.05$).

As observed with CHIKV, the number of DENV particles in saliva was lower to that obtained in head homogenates (Figure 4). For *Ae. albopictus* AL-CSM, the maximum of DENV particles was reached at day 9 pi with $0.5 \pm 0.4 \log_{10}$ particles for DENV 2010-1806 (Figure 4A) and $0.4 \pm 0.4 \log_{10}$ particles for DENV 2010-2025 (Figure 4B). For *Ae. aegypti* AA-Martinique, viral loads were also low: $0.1 \log_{10}$ particles for DENV 2010-1806 (Figure 4A) and $0.6 \pm 0.9 \log_{10}$ particles for DENV 2010-2025 (Figure 4B) at day 9 pi. AL-CSM and AA-Martinique delivered a number of DENV particles comparable between DENV 2010-1806 and DENV 2010-2025 (Kruskal-Wallis test: $p > 0.05$).

Finally, transmission efficiency (TE) was also defined for each pairing mosquito/virus at different days pi. When examining TE between the two viral strains for each mosquito species at a given day pi, no difference was found (Chi square test: $p > 0.05$). When analyzing TE according to day pi for each pairing mosquito/virus, no significant difference was found (Chi square test: $p > 0.05$) except for *Ae. albopictus* AL-CSM infected with the imported DENV strain (2010-2025) at day 14 pi.

These results suggest that *Ae. albopictus* AL-CSM ensured a low dissemination of DENV even if transmission rate was unexpectedly high. Its TR was high at day 14 pi when infected with the imported DENV strain (2010-2025). Moreover, the typical vector *Ae. aegypti* AA-Martinique achieved a high dissemination of both DENV strains without being correlated with a high transmission. AL-CSM presents the same features for dissemination and transmission of the imported (DENV 2010-2025) as well as the autochthonous (DENV 2010-1806) DENV strains.

Discussion

Taking advantage of intercontinental trading, *Ae. albopictus*, native to southeast Asia, has extended its geographical range and has brought into light the fear of emerging mosquito borne-diseases. In France, the scare became reality in September 2010,

when autochthonous cases of CHIK and DEN were detected in southeast of France, where *Ae. albopictus* has been established since 2004 [18]. Our results show that *Ae. albopictus* from Cagnes-sur-Mer (AL-CSM) was as efficient as the typical tropical vector *Ae. aegypti* to transmit both CHIKV and DENV.

Populations of *Ae. albopictus* are currently established on the eastern Mediterranean coastline of France. Its capacity to lay cold-resistant eggs has facilitated the colonization of new geographic areas in northern latitudes (reviewed in [3]; [19]). In addition, its preference for small artificial containers as breeding sites in domestic environments has increased potential close contacts with humans (reviewed in [7]). *Ae. albopictus* can reach high densities in August-September as climatic conditions are favorable [18]. In addition, travelers infected with CHIKV and DENV returning from countries where these arboviruses are endemic or where epidemics are taking place have been frequently reported in Europe, including France [1,20]. These conditions together are essential for the transmission of imported arboviruses to take place. Our laboratory viral challenges were implemented in conditions allowing optimal viral replication in tropical mosquito species: an incubation temperature of 28°C and an incubation period (day 3 to day 14 for CHIKV and day 9 to day 14 pi for DENV) suitable for CHIKV [17] and DENV infecting *Ae. aegypti* [21]. Experimental infections were performed with blood-meals providing viral titers compatible with viremia levels recorded in patients [22,23]. Temperate populations such as AL-CSM are expected to be disadvantaged in such conditions, but our results were not consistent with these expectations. Several environmental factors such as temperature may affect vector capacity by modifying notably vector dynamics [24] and vector competence [25]. For example, recent studies have shown that the incubation temperature of immature stages alters susceptibility of *Ae. albopictus* for CHIKV [26]. Although *Ae. albopictus* was already shown to be susceptible to both viruses in the laboratory, its high vector competence in optimal conditions compared to the typical vector was quite surprising.

The analyzed CHIKV strain isolated in Fréjus from an imported human case belongs to the ECSA clade and harbors an alanine at the position E1-226. Based on our laboratory viral challenges, we found that both CHIKV strains (autochthonous and imported) were efficiently transmitted by *Ae. albopictus* AL-CSM and *Ae. aegypti* AA-India with around 35-67% of mosquitoes able to ensure viral dissemination delivering up to 14 viral particles at day 3 pi. Using a similar titer of blood-meal (i.e., $10^{7.5}$ PFU/mL), we showed in a previous work that *Ae. albopictus* from La

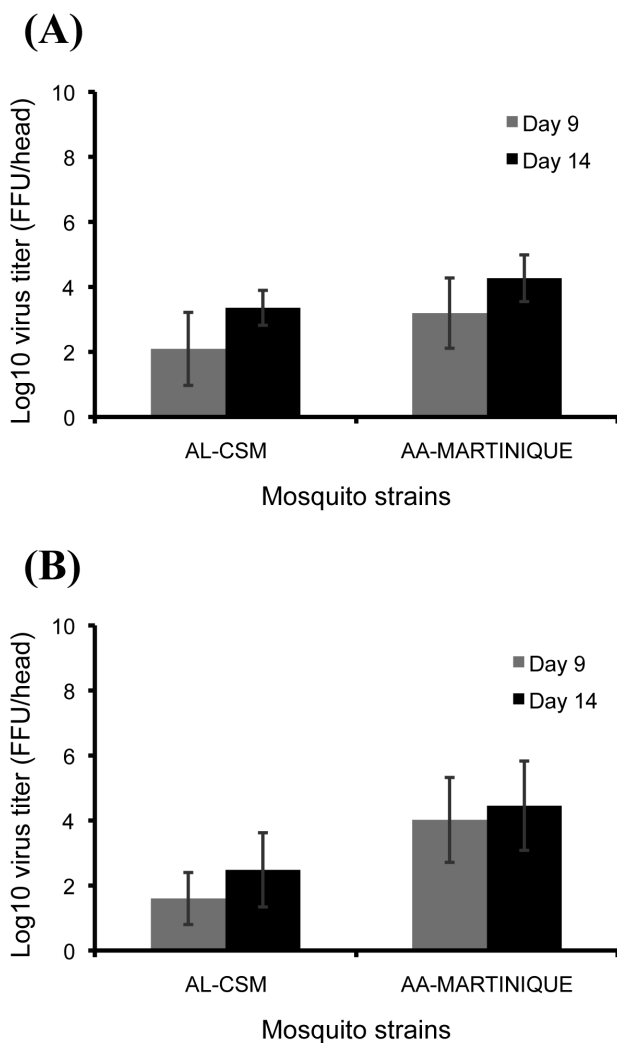


Figure 3. Dissemination of DENV in *Ae. albopictus* from France (AL-CSM) and *Ae. aegypti* from Martinique (AA-Martini-que). At days 9 and 14 after infection with an infectious blood-meal, mosquitoes were sacrificed and heads were removed for viral titration. The number of infectious particles per head homogenate was estimated by focus fluorescent assay on C6/36 *Ae. albopictus* cells. Two viral strains were tested: (A) DENV-2025 strain that circulated in Martinique in 2010 and (B) DENV-1806 strain isolated from a DENV-1 autochthonous case from Nice. Error bars refer to the standard error between different mosquitoes. doi:10.1371/journal.pone.0059716.g003

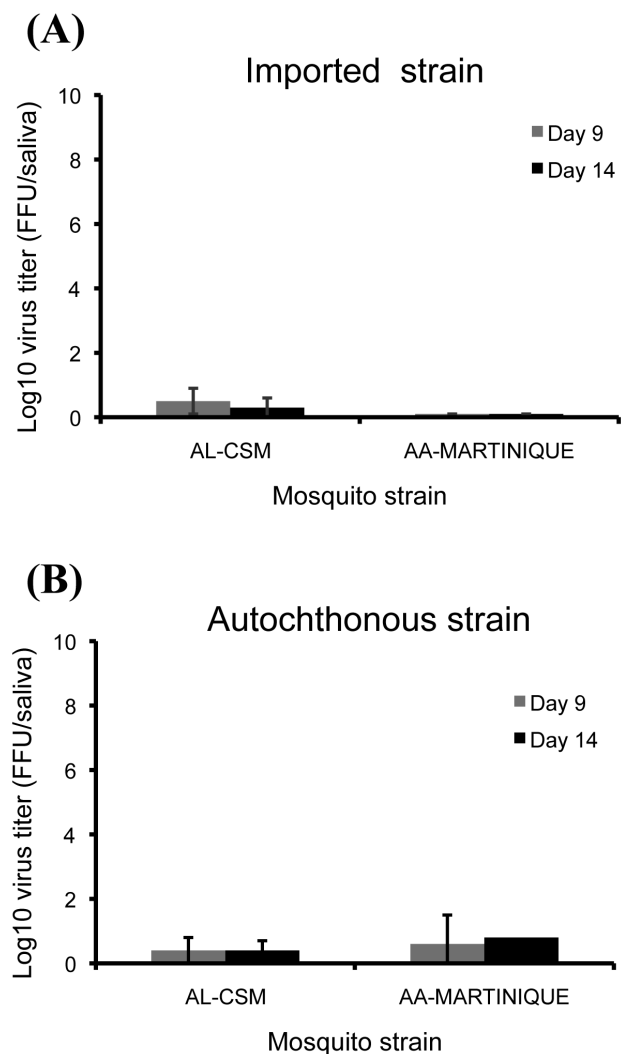


Figure 4. Transmission of DENV in saliva of *Ae. albopictus* from France (AL-CSM) and *Ae. aegypti* from Martinique (AA-Martini-que). At days 9 and 14 after infection with an infectious blood-meal provided, mosquitoes were sacrificed and saliva was collected from individual mosquitoes and titrated by focus fluorescent assay on C6/36 *Ae. albopictus* cells. Two viral strains were tested: (A) DENV-2025 strain that circulated in Martinique in 2010 and (B) DENV-1806 strain isolated from a DENV autochthonous case from Nice. Error bars refer to the standard error between different mosquitoes. doi:10.1371/journal.pone.0059716.g004

Reunion Island was very efficient to transmit CHIKV E1-226V delivering around 11 viral particles at day 3 pi [17]. The substitution E1-226A by E1-226V has been demonstrated to be responsible of the improved transmission in *Ae. albopictus* [27,28]. Nevertheless, the pairing *Ae. albopictus* AL-CSM and CHIKV E1-226A was found to be unexpectedly efficient. *Ae. albopictus* AL-CSM is a temperate species experiencing low temperatures which can express a higher competence to vector arboviruses [26]. Another substitution at position E2-211 with a threonine instead of an isoleucine may increase the potential of CHIKV transmission in *Ae. albopictus* when E1-226V is also present. The mutation E2-I211T significantly increases infectivity of CHIKV for *Ae. albopictus* when expressed together with the E1-226V mutation [29]. It was suggested that this region of the E2 protein constitutes a cell-

receptor binding domain. Mutations might affect interactions of the virus with putative receptor(s) present on midgut cells [30]. The detection of E2-211T in CHIKV isolates from France can favor the E1-226V genotype to reach fixation after several rounds of autochthonous transmission cycles involving *Ae. albopictus*. The continuous circulation of CHIKV since its emergence in 2005 has led to the selection of other mutations enhancing the effect of E1-226V for transmission in *Ae. albopictus* [31]. In India, circulating CHIKV genotypes belong to the newly introduced ECSA lineage [2]. Two specific mutations, E1-K211E and E2-V264A, were detected in CHIKV strains isolated from New-Delhi revealing the emergence of a new signature in this clade [32]. Thus, other positions in the CHIKV genome exert strong epistatic effects on the E1-A226V substitution responsible for a significant increase in

CHIKV transmission by *Ae. albopictus*. These effects are lineage-specific [29,31].

The Dengue 1 strain, isolated from a patient in Nice, originated from Martinique in the French West Indies where an on-going epidemic took place in 2010. The mosquito *Ae. aegypti* is the main vector involved in most urban dengue outbreaks worldwide [33]. However, *Ae. albopictus* may act as a secondary vector [34] although in a recent past, it was implicated in outbreaks in Hawaii in 2001–2002 [35] and La Réunion Island in 2004 [36]. *Ae. aegypti* populations from Martinique are highly competent to DENV [37]. Nevertheless, *Ae. albopictus* from Cagnes-sur-Mer was found to be efficient in transmitting both strains of DENV-1 (autochthonous and imported) isolated from patients in Nice. Almost 67% of *Ae. albopictus* AL-CSM which have ensured viral dissemination were able to transmit DENV at day 9 after the ingestion of the infectious blood-meal. On the other side, only 21% of *Ae. aegypti* AA-Martinique were able to deliver DENV. The high efficiency of *Ae. albopictus* from Cagnes-sur-Mer to transmit DENV-1 is really unusual and contrasts with its counterpart *Ae. albopictus* from another Mediterranean country, Lebanon; it was capable to transmit only at day 21 pi with 38% of mosquitoes delivering 174 ± 455 viral particles [38].

For both viruses, viral dissemination from the midgut to colonize organs bathed in the hemolymph was more efficient for the typical vector, *Ae. aegypti*. Later, release of viral particles from the salivary glands through saliva expectorated by the mosquito was favored in *Ae. albopictus*. We hypothesized that viral replication in midgut cells is essential to acquire enough infectivity for the virus to be transmitted in an optimal way. A direct competition of assays *in vivo* between the E1-226V and E1-226A variants highlighted the selective role of the midgut barrier. Indeed, when intrathoracically inoculated into the mosquito hemocele, CHIKV bypasses the midgut cells and infect directly secondary organs such as the salivary glands without any selection operating; the transmission of the E1-226V variant by *Ae. albopictus* is no longer favored (Arias-Goeta et al., unpublished data). Thus, this mutation mainly occurs before the virus is released from midgut cells into hemocele. The midgut plays a key role in enhanced transmission of E1-226V in *Ae. albopictus* as suggested by previous findings [27,28]. The E1-226A seems to adopt the same features in *Ae. albopictus* AL-CSM. Similar studies should be initiated with DENV. In addition, for each virus, genomes of both strains (autochthonous and imported) are quite similar, suggesting that more autochthonous transmission cycles involving native *Ae. albopictus* would be

necessary to generate more adapted viruses for an enhanced transmission by this vector. Moreover, mosquitoes are persistently infected and the mosquito innate immune responses play a key role in controlling infection [39]. This would contribute to explain decrease in dissemination and transmission efficiencies at late days post-infection.

Autochthonous transmission of CHIK and DEN in continental Europe is thus possible. While occurrence of CHIK outbreaks has been proven possible in the past [40], the establishment of DEN transmission in southeastern France or further spread in Europe seems to be unexpected. Nevertheless, the high efficiency of *Ae. albopictus* from Cagnes-sur-Mer to transmit both viruses in the laboratory leads us to avoid underestimating *Ae. albopictus* from temperate regions to sustain epidemic outbreaks. Environmental conditions prevailing in the southeast of France are suitable enough to sustain outbreaks during favorable seasons, as evidenced by the Italian outbreak of CHIKV occurring in the province of Ravenna at the same latitude than the French cities, Nice and Fréjus.

Supporting Information

Figure S1 Phylogenetic relationships among several CHIKV and ones from French cases (Genbank accession number pending) based on complete genome (11,237 nucleotides) analysis. Bootstrap support values (1,000 replicates) are indicated at major nodes. Gray shading indicates the two French CHIKV isolates. Scale bar indicates number of base substitutions per site. ECSA, East/Central/South Africa. (PDF)

Acknowledgments

We thank Marie Vazeille, Camilo Arias-Goeta and Laurence Mousson for their technical advices. We are grateful to André Yébakima from the “Centre de Démoustication de la Martinique”, Paban Dash and Nata Gopalan from the Defence Research and Development Establishment in Gwalior (India), for providing mosquito strains. We are also grateful to Peter Sahlins for revision of our manuscript.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MG ABF. Performed the experiments: AVR KZ LD. Analyzed the data: AVR VC ABF. Contributed reagents/materials/analysis tools: KZ LD PD. Wrote the paper: AVR KZ ABF.

References

- La Roche G, Souares Y, Armengaud A, Peloux-Petiot F, Delaunay P, et al. (2010) First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. *Euro Surveill* 15: 19676.
- Grandadam M, Caro V, Plumet S, Thiberge JM, Souares Y, et al. (2011) Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg Infect Dis* 17: 910–913.
- Medlock JM, Hansford KM, Schaffner F, Versteirt V, Hendrickx G, et al. (2012) A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis* 12: 435–447.
- Adhami J, Reiter P (1998) Introduction and establishment of *Aedes (Stegomyia) albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J Am Mosq Control Assoc* 14(3): 340–343.
- Delaunay P, Jeannin C, Schaffner F, Marty P (2009) News on the presence of the tiger mosquito *Aedes albopictus* in metropolitan France. *Arch Pediatr* 16 Suppl 2: S66–71.
- Scholtz EJ, Schaffner F (2007) Waiting for the tiger: establishment and spread of the Asian tiger mosquito in Europe. In: Takken W, Knols B, eds. *Emerging pests and vector-borne diseases in Europe*, Wageningen Academic Publishers, Wageningen, The Netherlands. 241–260.
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D (2009) *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect* 11: 1177–1185.
- Moutailler S, Barre H, Vazeille M, Failloux AB (2009) Recently introduced *Aedes albopictus* in Corsica is competent to Chikungunya virus and in a lesser extent to dengue virus. *Trop Med Int Health* 14: 1105–1109.
- Talbalaghi A, Moutailler S, Vazeille M, Failloux AB (2010) Are *Aedes albopictus* or other mosquito species from northern Italy competent to sustain new arboviral outbreaks? *Med Vet Entomol* 24: 83–87.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, Romi R, Finarelli AC, et al. (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* 370: 1840–1846.
- Gould EA, Gallian P, De Lamballerie X, Charrel RN (2010) First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality! *Clin Microbiol Infect* 16: 1702–1704.
- Schmidt-Chanasit J, Haditsch M, Schoneberg I, Gunther S, Stark K, et al. (2010) Dengue virus infection in a traveler returning from Croatia to Germany. *Euro Surveill* 15.
- Gjenero-Margan I, Aleraj B, Krajcar D, Lesnikar V, Klobucar A, et al. (2011) Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. *Euro Surveill* 16.
- Receveur M, Ezzedine K, Pistone T, Malvy D (2010) Chikungunya infection in a French traveller returning from the Maldives, October, 2009. *Euro Surveill* 15: 19494.
- Schuffenecker I, Iteman I, Michault A, Murri S, Frangeul L, et al. (2006) Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med* 3: e263.

16. Mousson L, Zouache K, Arias-Goeta C, Raquin V, Mavingui P, et al. (2012) The native Wolbachia symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* 6: e1989.
17. Dubrulle M, Mousson L, Moutailler S, Vazeille M, Failloux AB (2009) Chikungunya virus and *Aedes* mosquitoes: saliva is infectious as soon as two days after oral infection. *PLoS One* 4: e5895.
18. Delaunay P, Mathieu B, Marty P, Fauran P, Schaffner F (2007) Chronology of the development of *Aedes albopictus* in the Alpes-Maritimes Department of France, from 2002 to 2005. *Med Trop* 67: 310–311.
19. Thomas SM, Obermayr U, Fischer D, Kreyling J, Beierkuhnlein C (2012) Low-temperature threshold for egg survival of a post-diapause and non-diapause European aedine strain, *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *Parasit Vectors* 5: 100.
20. Odolini S, Parola P, Gkrania-Klotsa E, Caumes E, Schlegelhauf P, et al. (2012) Travel-related imported infections in Europe, EuroTravNet 2009. *Clin Microbiol Infect* 18: 468–474.
21. Salazar MI, Richardson JH, Sanchez-Vargas I, Olson KE, Beaty BJ (2007) Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected *Aedes aegypti* mosquitoes. *BMC Microbiol* 7: 9.
22. Parola P, de Lamballerie X, Jourdan J, Rovey C, Vaillant V, et al. (2006) Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerg Infect Dis* 12: 1493–1499.
23. Wang WK, Chen HL, Yang CF, Hsieh SC, Juan CC, et al. (2006) Slower rates of clearance of viral load and virus-containing immune complexes in patients with dengue hemorrhagic fever. *Clin Infect Dis* 43: 1023–1030.
24. Alto BW, Juliano SA (2001) Temperature effects on the dynamics of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations in the laboratory. *J Med Entomol* 38: 548–556.
25. Muturi EJ, Alto BW (2011) Larval environmental temperature and insecticide exposure alter *Aedes aegypti* competence for arboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis* 11: 1157–1163.
26. Westbrook CJ, Reiskind MH, Pesko KN, Greene KE, Lounibos LP (2010) Larval Environmental Temperature and the Susceptibility of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) to Chikungunya Virus. *Vector Borne Zoonotic Dis* 10: 241–247.
27. Vazeille M, Moutailler S, Coudrier D, Rousseaux C, Khun H, et al. (2007) Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One* 2: e1168.
28. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S (2007) A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog* 3: e201.
29. Tsetsarkin KA, McGee CE, Volk SM, Vanlandingham DL, Weaver SC, et al. (2009) Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaptation of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *PLoS One* 4: e6835.
30. Myles KM, Pierro DJ, Olson KE (2003) Deletions in the putative cell receptor-binding domain of Sindbis virus strain MRE16 E2 glycoprotein reduce midgut infectivity in *Aedes aegypti*. *J Virol* 77: 8872–8881.
31. Tsetsarkin KA, Chen R, Leal G, Forrester N, Higgs S, et al. (2011) Chikungunya virus emergence is constrained in Asia by lineage-specific adaptive landscapes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 7872–7877.
32. Shrinet J, Jain S, Sharma A, Singh SS, Mathur K, et al. (2012) Genetic characterization of Chikungunya virus from New Delhi reveals emergence of a new molecular signature in Indian isolates. *Virol J* 9: 100.
33. Jansen CC, Beebe NW (2010) The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect* 12: 272–279.
34. Lambrechts L, Scott TW, Gubler DJ (2010) Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e646.
35. Effler PV, Pang L, Kitsutani P, Vorndam V, Nakata M, et al. (2005) Dengue fever, Hawaii, 2001–2002. *Emerg Infect Dis* 11: 742–749.
36. Pierre V, Thiria J, Rachou E, Sissoko D, Lassale C, et al. (2005) Epidémie de dengue 1 à la Réunion en 2004. *Journées INVS, 2005*. Available: http://www.invs.sante.fr/publications/2005/jvs_2005/poster_13.pdf.
37. Yebakima A, Charles C, Mousson L, Vazeille M, Yp-Tcha MM, et al. (2004) Genetic heterogeneity of the dengue vector *Aedes aegypti* in Martinique. *Trop Med Int Health* 9: 582–587.
38. Haddad N, Mousson L, Vazeille M, Chamat S, Tayeh J, et al. (2012) *Aedes albopictus* in Lebanon, a potential risk of arboviruses outbreak. *BMC Infect Dis* 12: 300.
39. Fragkoudis R, Attarzadeh-Yazdi G, Nash AA, Fazakerley JK, Kohl A (2009) Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *J Gen Virol* 90: 2061–2072.
40. Rezza G (2008) Re-emergence of Chikungunya and other scourges: the role of globalization and climate change. *Ann Ist Super Sanita* 44: 315–318.

Annexe 2

Table A1. Principaux alphavirus, flavivirus et bunyavirus pouvant être transmis par *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*

Virus	<i>Aedes albopictus</i>			<i>Aedes aegypti</i>		
	<u>Isolement</u>	<u>Compétence vectorielle</u>		<u>Isolement</u>	<u>Compétence vectorielle</u>	
		Infection	Transmission		Infection	Transmission
<i>Togaviridae</i>						
<i>Alphavirus</i>						
Chikungunya	+	+	+	+	+	+
O'nyong nyong	-	ND	ND	-	+	ND
Encéphalite équine vénézuélienne	-	+	+	-	+	+
Encéphalite équine de l'est	+	+	+	-	+	+
Encéphalite équine de l'ouest	-	+	+	-	+	ND
Ross River	-	+	+	-	+	+
Sindbis	-	+	+	-	+	+
Mayaro	-	+	+	-	+	+
<i>Flaviviridae</i>						
<i>Flavivirus</i>						
Dengue 1, 2, 3, 4	+	+	+	+	+	+
Fièvre jaune	-	+	+	+	+	+
Encéphalite japonaise	+	+	+	-	+	+
Encéphalite de Saint-Louis	-	+	+	-	+	+
West-Nile	+	+	+	+	+	+
Zika	ND	+	+	+	+	+
<i>Bunyaviridae</i>						
<i>Bunyavirus</i>						
La Crosse	+	+	+	ND	+	+
<i>Phlebovirus</i>						
Fièvre de la vallée du Rift	ND	+	+	ND	+	-

ND: non déterminé

Annexe 3

Information Supplémentaire Article 1

Table A2. Transmission efficiency of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* populations from the Americas at day 7 and 10 days after challenge with the three CHIKV isolates.

Country	Mosquito population	Species	Viral isolate	Day 7	Day 10
USA	TYS	AL	CHIKV_0621	56.7% (30)	40% (30)
			CHIKV_115	50% (30)	27.3% (11)
	VRB	AE	CHIKV_0621	26.7% (30)	33.3% (30)
			CHIKV_115	11.1% (18)	ND
		AL	CHIKV_0621	26.7% (30)	14.3% (7)
			CHIKV_115	26.7% (30)	16.7% (30)
Mexico	MXC	AE	CHIKV_0621	13.3% (30)	6.7% (30)
			CHIKV_115	33.3% (30)	10% (30)
	AL	CHIKV_0621	16.7% (30)	20% (30)	
		CHIKV_115	23.3% (30)	23.3% (30)	
Panama	PAN	AE	CHIKV_0621	33.3% (30)	20% (30)
			CHIKV_115	40% (30)	13.3% (30)
		AL	CHIKV_NC	83.3% (30)	43.3% (30)
			CHIKV_0621	83.3% (30)	73.3% (30)
		AL	CHIKV_115	33.3% (30)	76.7% (30)
			CHIKV_NC	73.3% (30)	46.7% (30)
Venezuela	DEL	AE	CHIKV_0621	78.3% (23)	70% (10)
			CHIKV_115	82.1% (28)	40% (15)
Peru	PUM	AE	CHIKV_0621	64.7% (17)	20.7% (29)
			CHIKV_115	52.6% (19)	23.3% (30)
	TUM	AE	CHIKV_0621	39.1% (23)	36.7% (30)
Brazil	MAN	AE	CHIKV_0621	53.3% (30)	16.7% (30)
			CHIKV_NC	46.7% (30)	40% (30)
		AL	CHIKV_0621	73.3% (30)	69.4% (36)
			CHIKV_115	35.5% (31)	52.9% (34)
		AL	CHIKV_NC	43.3% (30)	53.3% (30)
			AE	CHIKV_0621	46.7% (30)
	STR	AL	CHIKV_0621	56.7% (30)	55% (20)
			CHIKV_115	53.8% (26)	ND
	PNM	AE	CHIKV_0621	56.7% (30)	40% (30)
			CHIKV_0621	66.7% (30)	66.7% (30)
	CAB	AE	CHIKV_0621	56.6% (30)	23.3% (30)
	CPG	AE	CHIKV_0621	53.3% (30)	36.7% (30)
			CHIKV_115	46.6% (30)	27.6% (29)
	JRB	AE	CHIKV_0621	37.9% (29)	20% (30)
			CHIKV_115	40% (30)	40% (30)
		AL	CHIKV_0621	96.7% (30)	76.7% (30)
			CHIKV_0621	46.7% (30)	46.7% (30)
		AE	CHIKV_115	36.7% (30)	33.3% (30)
AL			CHIKV_0621	50% (30)	73.3% (30)
AL		CHIKV_115	79.3% (29)	ND	
		AE	CHIKV_0621	20% (30)	43.3% (30)
VAZ		AL	CHIKV_0621	39.1% (23)	37.5% (32)
			AE	CHIKV_0621	30% (30)
BEL	AL	CHIKV_0621	72.7% (22)	85.2% (27)	
		AE	CHIKV_0621	20% (30)	10.34% (29)
SAN	AL	CHIKV_0621	43.3% (30)	50% (30)	
		CHIKV_115	62.5% (8)	ND	
Bolivia	BMA	AE	CHIKV_0621	60% (30)	36.7% (30)
			CHIKV_115	63.3% (30)	60% (30)
Paraguay	SDG	AE	CHIKV_0621	46.7% (30)	43.3% (30)
			CHIKV_0621	60% (30)	46.7% (30)
ASU	AE	CHIKV_115	73.3% (30)	30% (30)	
		CHIKV_0621	83.3% (30)	46.7% (30)	
Uruguay	SAL	AE	CHIKV_115	70% (30)	43.3% (30)
			CHIKV_0621	43.3% (30)	60% (30)
Argentina	MIA	AL	CHIKV_115	76.7% (30)	40% (30)
			CHIKV_NC	30% (9/30)	46.7% (14/30)
			CHIKV_0621	33.3% (10/30)	16.7% (5/30)
	ACO	AE	CHIKV_115	46.7% (14/30)	10% (3/30)
			CHIKV_0621	23.3% (7/30)	36.7% (11/30)
	BUE	AE	CHIKV_115	48.3% (14/29)	10% (3/30)
CHIKV_NC			63.6% (21/33)	26.7% (8/30)	

Transmission efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among the tested ones. Numbers of analyzed mosquitoes are shown in parenthesis. **AE:** *Aedes aegypti*; **AL:** *Aedes albopictus*. Viral strains: CHIKV_0621 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226V and E1-98A substitutions), CHIKV_115 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226A and E1-98A substitutions) and CHIKV_NC isolated from New Caledonia (Asian genotype, E1-226A and E1-98T substitutions). Mosquito populations (from North to South): **TYS** Tyson (United States), **VRB** Vero Beach (United States), **MXC** Chiapas (Mexico), **PAN** Panamá (Panama), **DEL** Delta Amacuro (Venezuela), **TUM** Tumbes (Peru), **PUM** Punchana (Peru), **MAN** Manaus (Brazil), **STR** Santarém (Brazil), **PNM** Parnamirim (Brazil), **CAB** Campos Belos (Brazil), **CPG** Campo Grande (Brazil), **JRB** Jurujuba (Brazil), **PAQ** Paquetá (Brazil), **VAZ** Vaz Lobo (Brazil), **BEL** Belford Roxo (Brazil), **SAN** Santos (Brazil), **BMA** Monteagudo (Bolivia), **SDG** Salto del Guairá (Paraguay), **ASU** Asuncion (Paraguay), **SAL** Salto (Uruguay), **MIA** Misiones (Argentina), **ACO** Corrientes (Argentina), **BUE** Buenos Aires (Argentina). ND: Not determined.

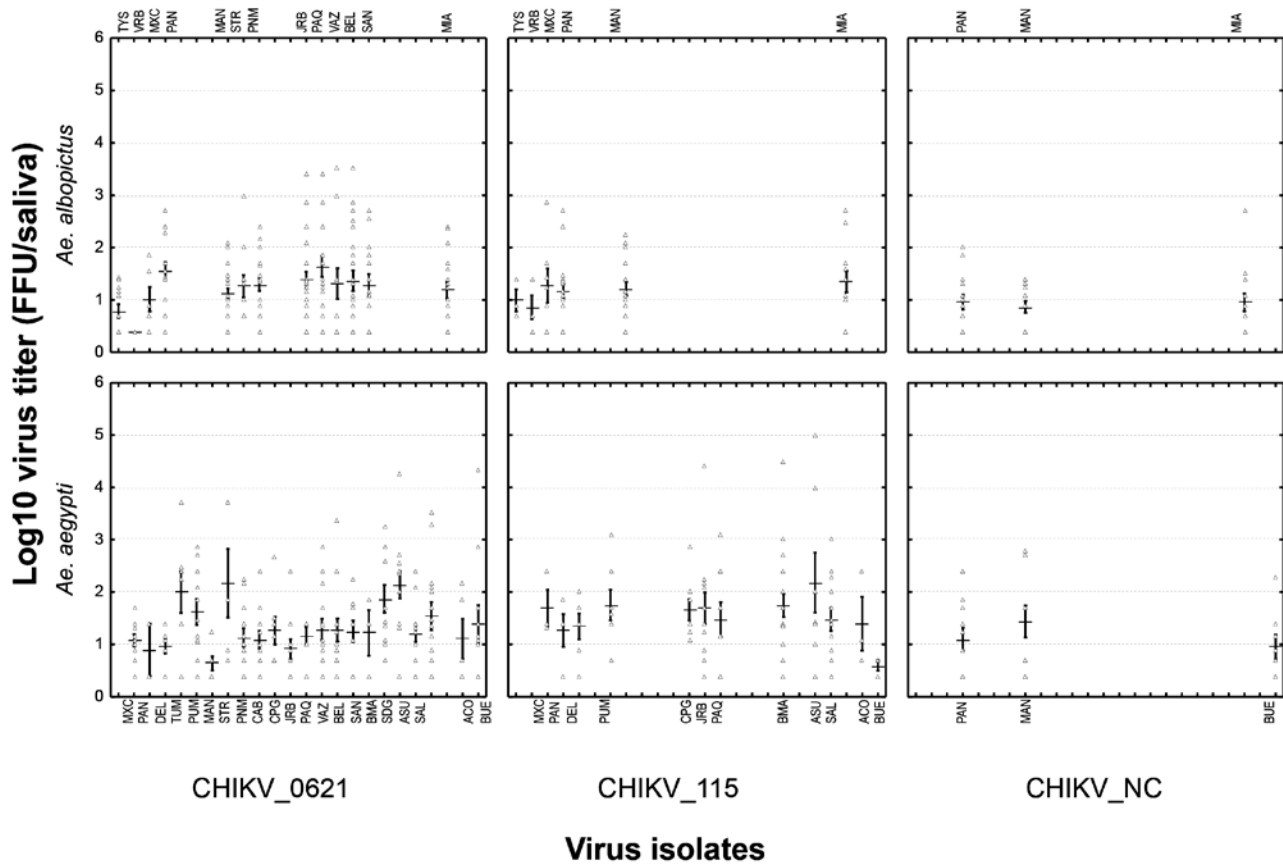


Figure A1. Viral loads of three CHIKV isolates in saliva of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes from 35 populations from the Americas at day 10 post-infection. At day 10 after an infectious blood-meal, mosquitoes were sacrificed and saliva was collected from individual mosquitoes and titrated by focus fluorescent assay on C6/36 *Ae. albopictus* cells. Viral strains: CHIKV_0621 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226V and E1-98A substitution), CHIKV_115 isolated from La Réunion (ECSA genotype, E1-226A and E1-98A substitution) and CHIKV_NC isolated from New Caledonia (Asian genotype, E1-226A and E1-98T substitution). Mosquito populations (from North to South): **TYS** Tyson (United States), **VRB** Vero Beach (United States), **MXC** Chiapas (Mexico), **PAN** Panamá (Panama), **DEL** Delta Amacuro (Venezuela), **TUM** Tumbes (Peru), **PUM** Punchana (Peru), **MAN** Manaus (Brazil), **STR** Santarém (Brazil), **PNM** Parnamirim (Brazil), **CAB** Campos Belos (Brazil), **CPG** Campo Grande (Brazil), **JRB** Jurujuba (Brazil), **PAQ** Paquetá (Brazil), **VAZ** Vaz Lobo (Brazil), **BEL** Belford Roxo (Brazil), **SAN** Santos (Brazil), **BMA** Monteagudo (Bolivia), **SDG** Salto del Guairá (Paraguay), **ASU** Asuncion (Paraguay), **SAL** Salto (Uruguay), **MIA** Misiones (Argentina), **ACO** Corrientes (Argentina), **BUE** Buenos Aires (Argentina). Error bars refer to the standard error of mean titer for each pairing mosquito population-virus strain.

Annexe 4

Information Supplémentaire Article 2

Table A3. Set of primers used for the amplification and sequencing of CHIKV strains.

Sequence (5' to 3')	Forward/Reverse	nt position
ATGGCTGCGTGAGACACAC	Forward 1	1 - 19
TGGGACCACTGCCTATCATTTA	Reverse 1	3162 - 3183
GACCTTTGACACGTTCCAAA	Forward 2	3079 - 3098
GAACCTATCCATTGGTACATC	Reverse 2	6491 - 6511
ACACACTACAGAATGTACTGGCA	Forward 3	6243 - 6265
CGTACATGAGTGACTRATCTTCCT	Reverse 3	8893 - 8916
CAGCACCGTGCACGATTACTGG	Forward 4	8792804 - 8813
GCCTGCTAAACGACACGCAT	Reverse 4	11277 - 11296

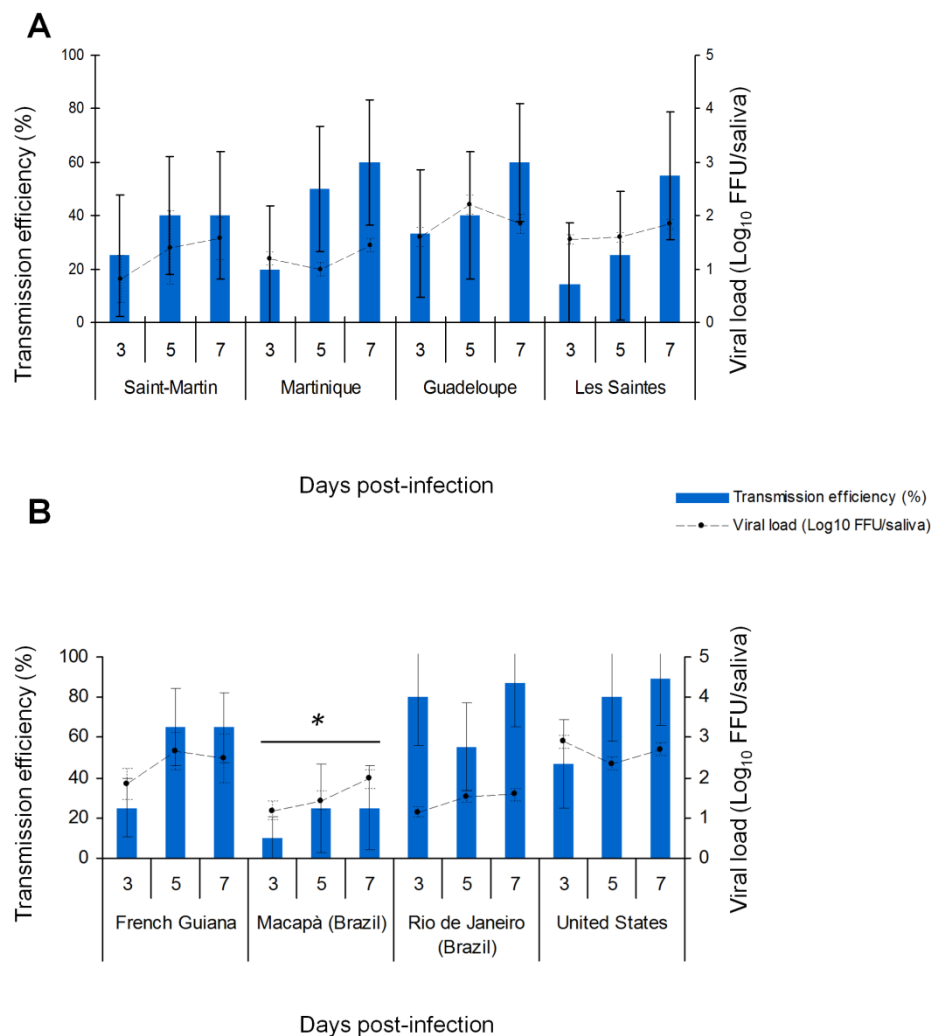


Figure A2. Transmission efficiencies (A) and viral loads (B) of CHIKV_{La Réunion} in saliva of *Ae. aegypti* collected in the Caribbean (A) and the continental America (B). At days 3, 5 and 7 after an infectious blood-meal, 20 mosquitoes were sacrificed for saliva collection and saliva was titrated on C6/36 *Ae. albopictus* cells. Transmission efficiency corresponds to the proportion of mosquitoes with infectious saliva among the tested ones. Error bars represent the confidence interval (95%) for transmission efficiencies, and the standard deviation for viral loads.

Annexe 5

Table A4. Fréquences alléliques de 11 loci microsatellites utilisés pour le génotypage d'*Ae. albopictus*.

Locus	Allèle	MIA	JRB	MAN	TYS	PNA	VRB	SAN	PNM	STR	BL	CAL	CONG	MXA	ALPROV	
Aealbmic1	102	0.117	0.083	0.000	0.000	0.083	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	
	106	0.650	0.600	0.983	0.567	0.517	0.867	0.900	0.931	0.783	0.867	0.450	0.690	0.883	0.983	
	108	0.233	0.100	0.000	0.433	0.400	0.133	0.050	0.034	0.183	0.133	0.050	0.138	0.117	0.017	
	110	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.172	0.000	0.000	
	114	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500	0.000	0.000	
	116	0.000	0.217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.034	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Aealbmic2	181	1.000	0.467	0.550	0.567	0.817	0.667	0.883	0.850	0.850	0.450	0.433	0.367	0.450	0.433	
	184	0.000	0.050	0.433	0.250	0.100	0.183	0.033	0.000	0.050	0.383	0.550	0.633	0.550	0.567	
	187	0.000	0.483	0.017	0.183	0.083	0.150	0.083	0.150	0.100	0.167	0.017	0.000	0.000	0.000	
Aealbmic3	191	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	
	194	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	
	197	0.417	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.067	0.017	0.000	0.183	
	200	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.017	0.017	0.050	0.033	0.000	0.017	
	203	0.367	0.533	0.367	0.167	0.467	0.117	0.533	0.250	0.267	0.083	0.200	0.417	0.100	0.067	
	206	0.033	0.200	0.317	0.200	0.000	0.100	0.117	0.233	0.000	0.117	0.683	0.233	0.200	0.083	
	209	0.183	0.133	0.183	0.433	0.533	0.517	0.283	0.267	0.233	0.433	0.000	0.000	0.700	0.267	
	212	0.000	0.000	0.000	0.167	0.000	0.183	0.000	0.133	0.283	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	
	215	0.000	0.083	0.017	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.167	0.033	0.000	0.000	0.000	0.050	
	221	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.117	0.000	0.067	0.000	0.000	0.067	
	224	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.133	0.000	0.000	0.167	
	230	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	
	233	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.083	
	236	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.133	0.000	0.000
	251	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000

	254	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000
Aealbm5	135	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.133	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	138	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	141	0.000	0.000	0.050	0.583	0.167	0.133	0.000	0.000	0.033	0.033	0.617	0.050	0.000	0.000	0.000
	159	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
	171	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000
	174	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	177	0.000	0.217	0.083	0.000	0.000	0.000	0.017	0.100	0.000	0.000	0.000	0.117	0.000	0.034	0.000
	180	0.167	0.117	0.117	0.000	0.000	0.167	0.233	0.000	0.250	0.383	0.217	0.033	0.117	0.345	0.000
	183	0.833	0.667	0.633	0.283	0.467	0.500	0.600	0.567	0.667	0.400	0.167	0.717	0.117	0.241	0.000
	186	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.033	0.000	0.000	0.033	0.276	0.000
	189	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.033	0.103	0.000
	192	0.000	0.000	0.000	0.117	0.133	0.000	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
	195	0.000	0.000	0.033	0.000	0.233	0.117	0.000	0.283	0.000	0.000	0.000	0.050	0.383	0.000	0.000
	198	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000
204	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	
213	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.033	0.150	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.150	0.000	0.000	
Aealbm6	238	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	241	0.000	0.033	0.017	0.000	0.083	0.133	0.183	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
	244	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.033	0.067	0.183	0.150	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	247	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	250	0.000	0.000	0.100	0.133	0.150	0.067	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.250	0.183	0.056	0.000
	253	0.850	0.550	0.583	0.867	0.433	0.583	0.050	0.450	0.317	0.783	0.431	0.600	0.383	0.537	0.000
	256	0.000	0.100	0.167	0.000	0.333	0.083	0.117	0.367	0.250	0.050	0.207	0.150	0.400	0.167	0.000
	259	0.150	0.300	0.133	0.000	0.000	0.083	0.583	0.000	0.283	0.067	0.362	0.000	0.000	0.241	0.000

Aealbm9	121	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.200	0.000	0.000	0.000
	123	0.000	0.033	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
	125	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.050	0.000	0.217	0.000	0.067	0.000	0.083	0.017	0.103
	127	0.783	0.817	0.333	0.500	0.550	0.550	0.667	0.517	0.450	0.400	0.583	0.133	0.583	0.448
	129	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.017	0.133	0.000	0.034
	131	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.017	0.150	0.133	0.000	0.190
	133	0.000	0.017	0.350	0.500	0.450	0.367	0.200	0.117	0.000	0.400	0.050	0.183	0.400	0.224
	135	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	137	0.100	0.067	0.133	0.000	0.000	0.000	0.017	0.050	0.000	0.083	0.000	0.067	0.000	0.000
	139	0.117	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.117	0.050	0.550	0.000	0.000	0.233	0.000	0.000
Aealbm11	195	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000
	198	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000
	204	0.000	0.200	0.150	0.067	0.000	0.017	0.117	0.083	0.000	0.017	0.000	0.200	0.317	0.000
	207	0.200	0.233	0.200	0.217	0.200	0.500	0.117	0.467	0.283	0.533	0.467	0.033	0.317	0.207
	210	0.017	0.000	0.367	0.167	0.800	0.283	0.000	0.200	0.000	0.133	0.017	0.533	0.317	0.207
	213	0.783	0.567	0.233	0.133	0.000	0.200	0.417	0.250	0.717	0.117	0.183	0.017	0.017	0.345
	216	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.200	0.117	0.000	0.000
	225	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.133	0.000	0.000	0.052
	228	0.000	0.000	0.033	0.417	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.133	0.000	0.100	0.000	0.172
	231	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.350	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017
Aealbm14	142	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.117	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	148	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	150	0.733	0.700	0.867	0.967	0.850	0.817	0.567	0.500	0.100	0.250	0.967	0.933	1.000	0.815
	152	0.267	0.300	0.133	0.017	0.133	0.017	0.433	0.400	0.900	0.483	0.033	0.067	0.000	0.111
	154	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.019
	156	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.100	0.000	0.117	0.000	0.000	0.000	0.019

	158	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.037
	160	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.083	0.000	0.000	0.000	0.000
Aealbm15	225	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	228	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	231	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000
	234	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	0.967	0.950	1.000	1.000	0.983	1.000	1.000	1.000
	237	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Aealbm16	211	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.017	0.000	0.000	0.050
	217	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000
	220	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000
	223	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	226	0.000	0.317	0.317	0.333	0.000	0.367	0.067	0.100	0.017	0.033	0.000	0.417	0.100	0.050
	229	0.000	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.100	0.000	0.000
	232	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000
	235	0.000	0.233	0.100	0.183	0.000	0.117	0.117	0.000	0.067	0.217	0.317	0.050	0.450	0.067
	238	0.317	0.350	0.350	0.200	0.900	0.417	0.683	0.850	0.850	0.367	0.283	0.217	0.200	0.450
	241	0.000	0.000	0.033	0.200	0.100	0.067	0.000	0.050	0.000	0.150	0.050	0.017	0.117	0.033
	244	0.467	0.033	0.100	0.000	0.000	0.017	0.083	0.000	0.000	0.000	0.267	0.067	0.000	0.317
	247	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000	0.000	0.000	0.217	0.000	0.050	0.000	0.000
	250	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.050	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.133	0.000
	253	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	259	0.217	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.033
Aealbm17	139	0.000	0.000	0.000	0.033	0.100	0.033	0.000	0.033	0.000	0.000	0.000	0.000	0.259	0.033
	142	1.000	1.000	1.000	0.933	0.900	0.900	1.000	0.967	1.000	1.000	1.000	1.000	0.603	0.967
	145	0.000	0.000	0.000	0.033	0.000	0.067	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.017	0.000

148 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.000 0.121 0.000

Trente individus ont été analysés par population. MIA (Misiones, Argentine), JRB (Jurujuba, Rio de Janeiro, Brésil), MAN (Manaus, Brésil), TYS (Tyson, Etats Unis), PNA (Panama), VRB (Vero Beach, Floride, États Unis), SAN (Santos, Brésil), PNM (Parnamirim, Brésil), STR (Santarém, Brésil), BL (Bar sur Loup, France), CAL (Calcutta, Inde), CONG (Congo), MXA (Chiapas, Mexique), ALPROV (Providence, La Réunion).

Annexe 6

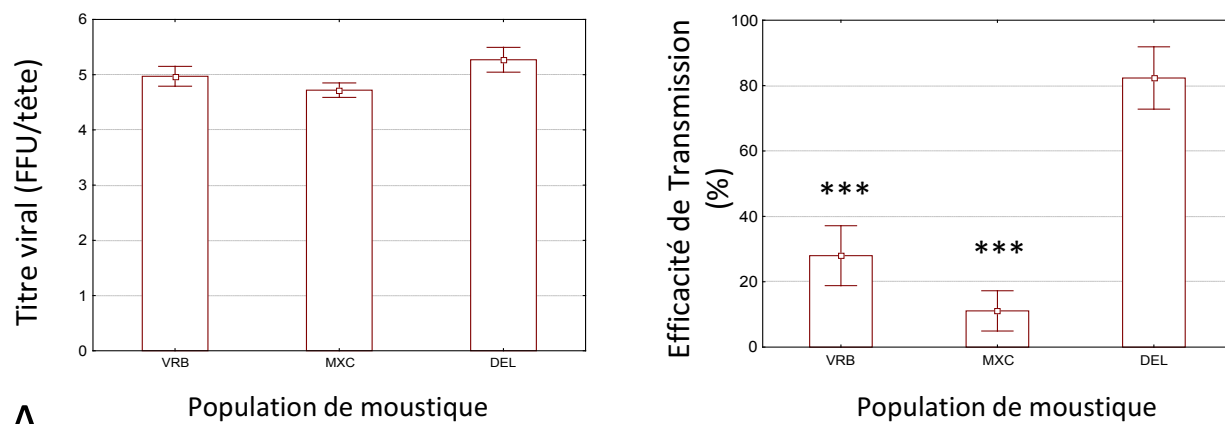
Table A5. Valeurs des indices Fst entre paires de populations d'*Ae. albopictus*

Population	MIA	JRB	MAN	TYS	PNA	VRB	SAN	PNM	STR	BL	CAL	CONG	MXA	ALPROV
MIA	0,000													
JRB	0,139	0,000												
MAN	0,181	0,109	0,000											
TYS	0,253	0,181	0,121	0,000										
PNA	0,282	0,225	0,150	0,178	0,000									
VRB	0,184	0,117	0,049	0,081	0,116	0,000								
SAN	0,193	0,115	0,144	0,261	0,208	0,149	0,000							
PNM	0,195	0,131	0,105	0,210	0,133	0,085	0,116	0,000						
STR	0,232	0,191	0,244	0,334	0,293	0,232	0,133	0,132	0,000					
BL	0,225	0,155	0,104	0,146	0,202	0,084	0,183	0,118	0,191	0,000				
CAL	0,289	0,199	0,163	0,179	0,281	0,180	0,251	0,240	0,341	0,207	0,000			
CONG	0,265	0,175	0,042	0,155	0,193	0,131	0,242	0,197	0,313	0,175	0,202	0,000		
MXA	0,322	0,224	0,124	0,156	0,181	0,100	0,247	0,196	0,350	0,163	0,206	0,176	0,000	
ALPROV	0,189	0,153	0,058	0,150	0,193	0,081	0,159	0,139	0,237	0,091	0,150	0,127	0,125	0,000

Trente individus ont été analysés par population. MIA (Misiones, Argentine), JRB (Jurujuba, Rio de Janeiro, Brésil), MAN (Manaus, Brésil), TYS (Tyson, Etats Unis), PNA (Panama), VRB (Vero Beach, Floride, États Unis), SAN (Santos, Brésil), PNM (Parnamirim, Brésil), STR (Santarém, Brésil), BL (Bar sur Loup, France), CAL (Calcutta, Inde), CONG (Congo), MXA (Chiapas, Mexique), ALPROV (Providence, La Réunion). Tous les valeurs sont statistiquement significatives pour $P < 0.05$.

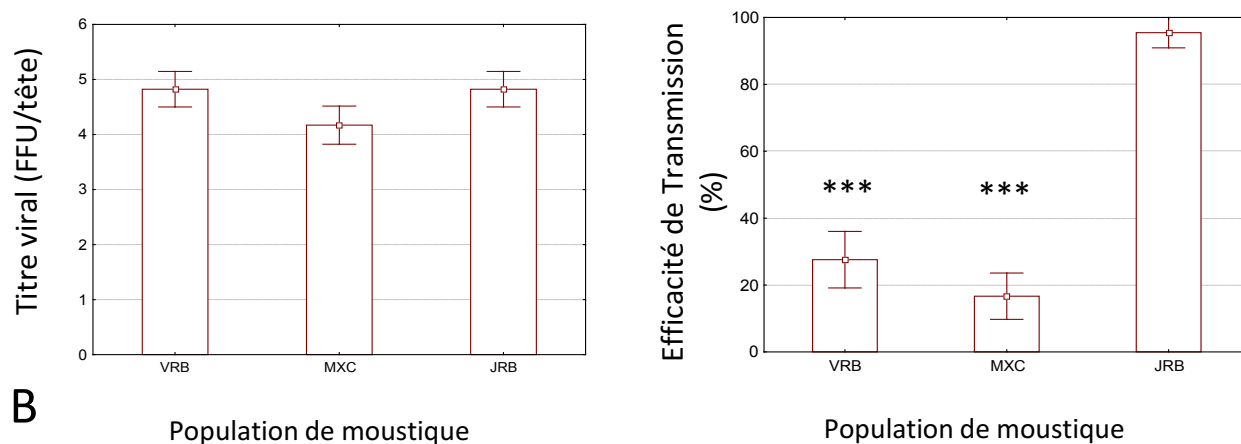
Annexe 7

Ae. aegypti



A

Ae. albopictus



B

Figure A3. Moyenne \pm écart-type de l'efficacité de transmission (% des salives positives) et du nombre de particules virales trouvées dans la tête des *Ae. aegypti* (A) et *Ae. albopictus* (B) infectés oralement avec le CHIKV_21 (ECSA). VRB : Vero Beach (États-Unis) ; MXC : Chiapas (Mexique) ; DEL : Delta Amacuro (Venezuela) ; JRB: Rio de Janeiro (Brésil). * Différences significatives (Test de Kruskal Wallis: $P < 0.001$)**

Annexe 8

Autres publications :

Jupille H, **Vega-Rua A**, Rougeon F, Failloux A. Arboviruses : variations on an ancient theme. *Future Virol.* 2014;9:733-751.

Zouache K, Fontaine A, **Vega-Rua A**, et al. Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc Biol Sci.* 2014;281:20141078 - . doi:10.1098/rspb.2014.1078

Dieme C, Yssouf A, **Vega-Rúa A**, et al. Accurate identification of Culicidae at aquatic developmental stages by MALDI-TOF MS profiling. *Parasit Vectors.* 2014:1-14. doi:10.1186/s13071-014-0544-0.

Lourenço-de-Oliveira R, **Rua AV**, Vezzani D, et al. Aedes aegypti from temperate regions of South America are highly competent to transmit dengue virus. *BMC Infect Dis.* 2013;13:610. doi:10.1186/1471-2334-13-610.