

Interactions multipartites entre le virus du chikungunya, les endosymbiotes et les moustiques. Impact sur la transmission virale et la dynamique des populations vectorielles

Patrick Mavingui¹, Karima Zouache¹, Denis Voronin¹, Fara N. Raharimalala^{1,2}, Laurence Mousson³, Pablo Tortosa⁴, Maxime Solignat⁵, Vincent Raquin¹, Van Tran-Van¹, Geneviève Grundmann¹, Lala H.R. Raveloson², Pierre Ravelonandro⁶, Laurence Briant⁵, Mylène Weill⁴, Anna-Bella Failloux³.

¹CNRS, UMR5557, Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, France; ²Département d'Entomologie de la Faculté des Sciences d'Antananarivo, Madagascar; ³Unité de Génétique Moléculaire des Bunyavirus, Institut Pasteur, Paris; ⁴CNRS, UMR5554, ISEM, Montpellier; ⁵CNRS, UMR5236, CPBS, Montpellier; ⁶Centre National de Recherche sur l'Environnement, Madagascar. Mel : patrick.mavingui@univ-lyon1.fr

A. RÉSUMÉ

De nombreuses maladies infectieuses transmises par les arthropodes ont émergé et réémergé dans différentes régions du monde. Les arboviroses vectorisées par les moustiques, tiques, et phlébotomes sont pour cela exemplaires. Depuis 2004, plusieurs millions de cas de fièvre de chikungunya, causée par le virus Chikungunya (CHIKV), ont été recensés en Afrique, Asie, Inde, Océan Indien, et plus récemment en Europe. Pour la seule île de la Réunion plus de 250 milles personnes, soit près de 60% de la population, ont été victimes de chikungunya ; et les îles avoisinantes comme Madagascar, Mayotte, les Seychelles n'ont pas été épargnées. Avant ces épidémies de grande envergure, peu d'information était disponible pour expliquer la dynamique locale de transmission. Comme la dengue, le virus chikungunya est transmis par le moustique tigre du genre *Aedes*, notamment par les espèces *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*. Outre les pathogènes qu'ils vectorisent, les moustiques hébergent d'autres communautés microbiennes avec lesquelles ils établissent des relations symbiotiques qui s'inscrivent dans un continuum du parasitisme au mutualisme. Ces symbioses pourraient jouer un rôle majeur dans l'adaptation (invasion) des moustiques dans différents environnements, voire dans la vection de pathogènes comme démontré pour certains virus transmis par des insectes phytophages.

L'objectif de ChikvEndoM est de déterminer l'impact des interactions entre le virus CHIKV, les moustiques *Aedes* et leurs communautés bactériennes endosymbiotiques sur la dynamique virale, puis à explorer les moyens de lutte biologique anti-vectorielle comme complément à la lutte chimique et génétique. Il s'agit donc de développer un système modèle qui permet d'analyser l'importance du compartiment microbien sur la circulation des virus dans les populations animales et humaines, qui permettront de proposer des solutions totalement nouvelles pour lutter contre la maladie.

La diversité et la composition de la communauté bactérienne ont été caractérisées dans les populations naturelles et des lignées de laboratoires des 2 espèces vectrices majeures, *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*. Certains genres bactériens ont été localisés par hybridation *in situ* dans les organes (intestin, glandes salivaires, ovaires) essentiels à réplication des arbovirus. Les expérimentations d'infection d'individus et de lignée cellulaire de moustique par les virus CHIKV, en présence ou en absence de bactérie symbiotique, ont permis de mettre en évidence des phénomènes d'interférence entre les différents microbes. Les résultats démontrent l'importance de la prise en compte des différents acteurs et de leur interaction pour mieux appréhender les facteurs intrinsèques de la dissémination virale chez le moustique vecteur, ils ouvrent la voie à la fois aux études ciblées des déterminants génétiques et moléculaires de ces interactions et à des applications potentielles.

B. ENJEUX ET PROBLEMATIQUE, ETAT DE L'ART

Différentes régions tropicales du monde sont exposées à des arboviroses causées par des arbovirus (pour Arthropod Borne Viruses). La plupart de ces virus vectorisés par des arthropodes appartiennent aux familles de *Bunyaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae*, *Rhabdoviridae* et *Togaviridae*. Il existe plus de 600 espèces d'arbovirus répertoriées dont une centaine seraient impliquées dans les pathologies humaines comme les virus du Chikungunya et de la dengue (Catalogue International). Hôte accidentel, l'homme est en général infecté par piqûre d'arthropode vecteur en lieu et place des hôtes vertébrés naturels. Les réservoirs principaux des arbovirus d'importance en santé publique sont les oiseaux, les amphibiens, les reptiles et les mammifères selvatiques (Castillo 1980 ; Wolfe et al. 2001, de Thoisy et al. 2009). Sur la Figure 1 ci-après est schématisé en terme général le cycle biologique d'un arbovirus.

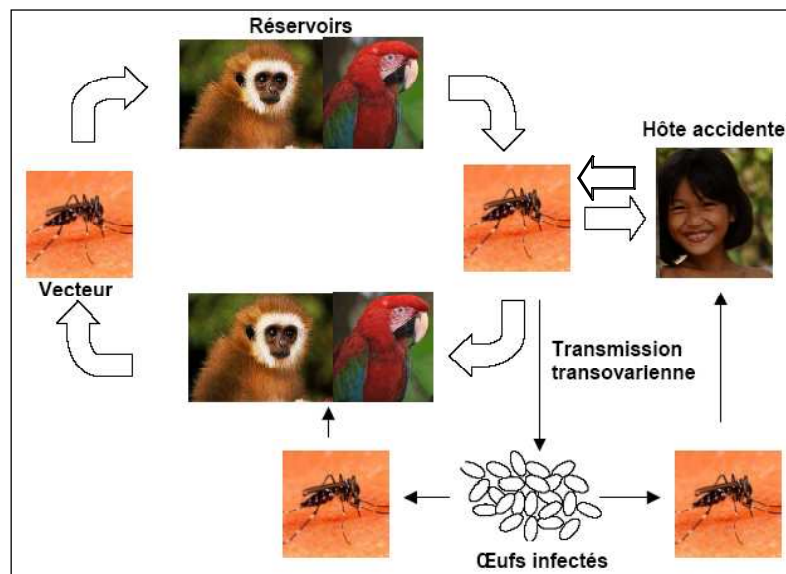


Figure 1. Cycle biologique général de transmission des arbovirus montrant une transmission enzotique (à gauche) et urbaine (à droite). La transmission verticale de vecteurs femelles aux descendants réalimentent le cycle de certains arbovirus (en bas).

Ces dernières années, on assiste à une explosion épidémique d'arboviroses tant dans les zones endémiques des vecteurs que l'on croyait sous contrôle que dans les régions géographiques nouvelles, jusque-là épargnées. L'exemple le plus récent qui fera l'objet de notre étude est l'épidémie de chikungunya qui affecte l'île de la Réunion et les territoires avoisinants. Apparue pour la première fois en Tanzanie en 1953 (Ross 1956), l'épidémie due au virus CHIK n'a cessé de progresser dans les régions d'Afrique sub-saharienne et d'Asie du Sud-est. Des épisodes épidémiques de CHIK ont également sévi en Inde, au Sri Lanka et aux Philippines. Détectée en janvier 2005 à l'île de la Réunion, l'épidémie du CHIK s'est propagée très rapidement dans la population, puisque l'Institut de Veille Sanitaire (InVS, www.invs.sante.fr) estimait à 248000 le nombre de personnes infectées au 23 avril 2006. À cette même date, l'InVS signale l'extension de l'épidémie du CHIK à d'autres îles de l'Océan Indien : Comores (plus de 5000 cas), Maurice (6000 cas suspectés, 1200 confirmés), Mayotte (6025 cas), Seychelles (1255 cas). Quelques cas de CHIK ont également été détectés à Madagascar, en particulier dans la zone de basse-terre. L'Institut Pasteur avait alors publié des diagnostics des cas de CHIKV, chez des personnes provenant de régions infectées, en Guyane Française et en Métropole (160 cas).

La recrudescence d'arboviroses est sans doute facilitée par divers facteurs comme l'augmentation de la démographie et de la mobilité humaine, l'anthropisation de nouveaux écosystèmes y compris selvatiques, les changements climatiques et l'absence ou l'arrêt des programmes de contrôle des vecteurs. Ainsi certains moustiques vecteurs envahissent et s'installent de façon durable dans les régions du nord qui sont maintenant concernées par les arboviroses comme l'illustre l'épidémie de chikungunya en Italie en 2007 (Angellini et al. 2008). Plus récemment, des cas autochtones de dengue et de chikungunya ont été rapportés en France métropolitaine (Gould et al. 2010). Ces émergences ou ré-émergences d'arboviroses soulèvent des problèmes majeurs de santé publique. L'un des enjeux en santé publique actuelle et dans la prochaine décennie est de trouver des moyens de lutter contre l'apparition de nouvelles pathologies sans engendrer des aléas écologiques. Face à l'ampleur des épidémies, les risques écologiques de l'utilisation massive des insecticides sont largement ignorés. On sait que les vecteurs développent de plus en plus des résistances vis-à-vis des produits utilisés (Raimond et al. 1991), et le développement de nouvelles molécules est souvent freiné par le coût financier prohibitif. Dans ce contexte, l'exploitation des communautés microbiennes comme biopesticides pour la lutte anti-vectorielle, en complément des agents chimiques et génétiques, est une stratégie encouragée au niveau mondial (OMS, 1975).

Il est connu par ailleurs que la plupart des arthropodes hébergent des populations microbiennes variées avec lesquelles ils établissent des relations diverses qui s'inscrivent dans un continuum allant du parasitisme au mutualisme. Si différents microorganismes sont antagonistes d'arthropodes et produisent des pesticides, comme la toxine de *Bacillus thuringiensis*, qui sont utilisés dans la lutte contre les insectes nuisibles (Rishikesh & Quelennec 1983), d'autres partenaires microbiens contribuent au succès écologique et reproducteur des hôtes. Par exemple, de nombreux insectes ravageurs de cultures ou vecteurs de pathogènes pour l'homme doivent leur succès reproducteur et leur capacité d'adaptation à des symbioses bactériennes (8). D'autres symbiotes sont impliqués dans des phénotypes capables de rompre les équilibres écologiques parasites-vecteurs-reservoirs et modifier l'épidémiologie des maladies à transmission vectorielle. Il s'agit par exemple de la spécialisation des hôtes (Tsuchida et al. 2004), la thermotolérance (Montllor et al. 2002), la résistance vis-à-vis des parasitoïdes (Oliver et al. 2005), et les manipulations de la reproduction (Werren et O'Neill 1997). Enfin, des résultats récents montrent que ces communautés bactériennes peuvent interagir directement avec des virus phytopathogènes et favoriser leur transmission. Un exemple bien documenté est l'interaction entre le virus TYLCV (pour Tomato Yellow Leaf Curl Virus) et son vecteur *Bemisia tabaci* où il a été montré l'implication de la protéine chaperon GroEL produite par les symbiotes dans la transmission virale depuis l'insecte vers la tomate (van den Heuvel et al. 1990 ; Morin et al. 1999). Un autre exemple, toujours chez les plantes, concerne une bactérie endosymbiotique qui favorise la circulation du virus (leafroll virus) de pomme de terre (van den Heuvel et al. 1994). Il était donc envisageable que ce type d'interactions multipartites ait lieu dans d'autres patho-systèmes vectoriels. Au cours de ces dernières années, un nombre croissant d'études montre que les symbiotes interfèrent avec les pathogènes vectorisés à la fois au cours du cycle d'infection mais également lors de la transmission. À titre d'exemple, *Wolbachia* protège son hôte *Drosophila* contre une infection par des agents pathogènes (Hedges et al. 2008, Texeira et al. 2008). Plus récemment, en accord avec l'hypothèse de travail du projet **ChikvEndoM**, des travaux ont mis en évidence que le transfert artificiel de *Wolbachia* chez le moustique *Aedes aegypti* (McMeniman et al. 2009) permettait de contrôler la transmission d'agents pathogènes comme les arbovirus Chikungunya et dengue ainsi que les parasites *Brugia pahangi* et *Plasmodium galliceum* (Kambris et al. 2009 ; Turley et al. 2009 ; Moreira et al. 2009 ; Bian et al. 2010).

La compréhension des processus des interactions symbiotiques dans les pathosystèmes vectoriels et l'exploitation des symbiotes sont donc devenues une alternative pour le développement de nouvelles stratégies de contrôle respectueuses de l'environnement. Le projet **ChikvEndoM** a permis de contribuer à ces travaux en réactualisant la biogéographie des moustiques vecteurs de Chikungunya et en intégrant, non pas un seul groupe bactérien, mais l'ensemble du compartiment

symbiotique dans le phénotype étendu de ces associations durables aux conséquences importantes en santé publique.

C. APPROCHE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

Afin d'explorer les interactions multipartites virus Chikungunya-moustiques-endosymbiotes, des campagnes de terrain dans les régions épidémiques et des expérimentations en laboratoire ont été menées. Les enquêtes entomologiques ont permis d'inventorier les deux espèces vectrices majeures, *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, à Madagascar ; la plus grande île de l'Océan Indien sujette aux épidémies récurrentes de chikungunya. Les différentes populations naturelles de moustiques ont été criblées pour le portage de CHIKV et du cortège bactérien par des méthodes moléculaires. Des corrélations possibles entre le compartiment microbien et la bioécologie des moustiques ont été recherchées par des analyses statistiques. Des infections expérimentales des moustiques par le CHIKV, en présence d'assemblages bactériens différents (individus symbiotiques vs aposymbiotiques) ont été conduites pour éclairer le coût de l'infection sur des traits d'histoire de vie (reproduction, survie...), et la dynamique microbienne (réplication, localisation, dissémination...). Les méthodes utilisées comprennent entre autres des cultures cellulaires, des techniques moléculaires telles que les PCRs et RTPCRs classiques et quantitatives, les puces à ADN taxonomique, l'immunolocalisation, l'hybridation in situ à fluorescence, l'imagerie.

D. RESULTATS OBTENUS

D1. Moustiques *Aedes* et communautés microbiennes.

Enquête entomologique. Au début du projet, peu de données étaient disponibles sur l'identité du vecteur impliqué dans les épidémies de chikungunya qui sévissaient dans les îles de l'Océan Indien à partir de 2004. Cependant, *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* étaient connues comme des vecteurs compétents pour le chikungunya en Afrique et en Asie. Les enquêtes entomologiques antérieures signalaient la présence de ces deux espèces dans la région de l'Océan Indien. En concertation avec le porteur (Didier Fontenille) du projet ANR Entomochik qui s'intéressait aux moustiques vecteurs à l'île de La Réunion, le projet **ChikvEndoM** s'est focalisé à inventorier les 2 espèces vectrices potentielles à Madagascar. Nous avons montré que l'espèce *Aedes albopictus* était devenue dominante dans les différentes régions de Madagascar, en milieux urbains et périurbains ; l'aire de distribution de l'espèce *Aedes aegypti* a été réduite à des environnements forestiers peu anthropisés. Ce résultat contraste avec les données des années 80. Une nouvelle carte de distribution des 2 espèces a été produite (Raharimalala et al. en préparation ; Zouache et al. 2009b). Les infections expérimentales indiquent que toutes les populations naturelles d'*Aedes albopictus* capturées sont compétentes vis-à-vis du virus CHIKV (Raharimalala et al. en préparation).

Communautés bactériennes des moustiques. Bien que de nombreuses données rendent compte du rôle majeur des symbioses bactériennes dans différents phénotypes étendus des insectes, le microbiote du moustique demeure peu étudié. Afin d'explorer le rôle potentiel des bactéries symbiotiques dans la biologie des 2 espèces vectrices étudiées, une investigation de la diversité et de la composition des communautés bactériennes qui leur sont associées a été mise en œuvre. Les premiers résultats ont été obtenus de la lignée ALPROV d'*Ae. albopictus* capturée à l'île de La Réunion et maintenue en insectarium. Ils ont permis de détecter et de localiser des bactéries associées à *Ae. albopictus*, à la fois dans l'insecte entier et dans certains organes spécifiques (Zouache et al. 2009b). Les bactéries du genre *Wolbachia*, *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Delftia* et *Pseudomonas* sont présentes chez *Ae. albopictus* mâle et femelle, et elles persistent à travers les générations. L'analyse par PCR et PCR-DGGE sur les organes spécifiques montre que tous les genres bactériens criblés sont présents dans le tube digestif. Seuls les genres *Wolbachia* et *Acinetobacter* ont été détectés et localisés par FISH dans les glandes salivaires et le tube digestif (intestin antérieur et moyen), avec une densité équivalente dans les glandes salivaires, et une densité plus importante

d'*Acinetobacter* dans le tube digestif. Seule la bactérie *Wolbachia* est présente dans les cellules germinales, incluant les ovocytes et les cellules nourricières. Ces résultats illustrent la distribution de la bactérie *Wolbachia* et des bactéries cultivables *Acinetobacter*, *Comamonas*, *Delftia* et *Pseudomonas* dans les tissus reproducteurs et somatiques d'*Ae. albopictus* où peuvent se répliquer les arbovirus (Figure 1). La co-localisation potentielle implique le partage d'une niche écologique entre bactéries et pathogènes, et donc l'existence possible d'interactions directes ou indirectes.

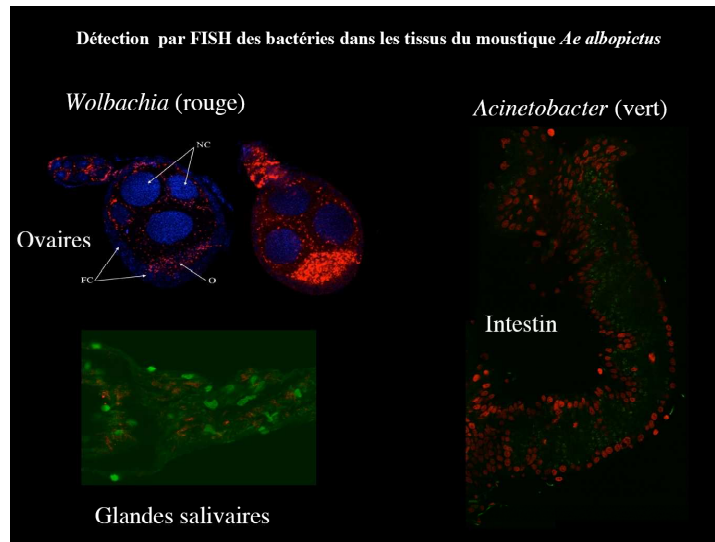


Figure 2. Mise en évidence par FISH des bactéries des genres *Acinetobacter* dans l'intestin et *Wolbachia* dans les ovaires et les glandes salivaires du moustique. La lignée *Ae. Albopictus* étudiée a été capturée lors de l'épidémie de chikungunya à La Réunion (Zouache et al. 2009b).

Des travaux ont montré que les conditions d'élevage en insectarium et l'écologie peuvent modifier la composition des communautés bactériennes des insectes (Rani et al., 2009 ; Zouache et al., 2009a). Une analyse descriptive des communautés bactériennes sur les moustiques *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* capturés dans différentes régions contrastées de Madagascar a été réalisée. L'analyse par PCR-DGGE a permis de détecter la présence des bactéries phylogénétiquement affiliées au Bacteroidetes, aux Firmicutes et dans une proportion plus importante, aux Protéobactéries (Zouache et al., 2010). Les principaux genres mis en évidence incluent : (i) *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Rickettsia* et *Wolbachia* pour les Alphaprotéobactéries ; (ii) *Herbaspirillum* et *Delftia* pour les Betaprotéobactéries ; ainsi que (iii) les membres de la famille des *Enterobacteriaceae* pour les Gammaprotéobactéries. Cette diversité bactérienne semble être influencée par la niche écologique et le sexe du moustique. Les analyses par PCR classique et PCR quantitative de *Wolbachia* chez *Ae. albopictus* montre une prévalence de 98% chez les mâles et de 99% chez les femelles, avec une densité plus importante chez les femelles, ainsi que des cas de mono-infection par wAlbB. Comme pour la plupart des animaux, cette étude confirme l'importance des facteurs environnementaux et des facteurs génétiques sur la diversité bactérienne associée aux insectes hôtes. Des études dédiées au rôle de ces bactéries dans la physiologie et dans la compétence vectorielle de l'hôte sont encore à conduire.

Criblage de CHIKV dans les populations d'*Aedes albopictus*. La compétence vectorielle et la densité des populations avaient établi que l'espèce *Ae. albopictus* était le vecteur principal de CHIKV dans les îles de l'Océan Indien. De plus, il avait été montré dès 2006, qu'une mutation sélective avait conféré à la souche épidémique CHIKV un fort pouvoir répliatif chez le moustique vecteur (Schuffenecker et al. 2006). Afin de mettre en évidence la circulation du virus à bas bruit de fond dans les populations naturelles de moustiques, nous avons recherché CHIKV dans une période épidémique mais dans des zones aux précédentes épidémies avérées. Sur 5000 moustiques femelles adultes criblés, aucun pool

ne s'est révélé positif, témoignant d'une faible persistance du virus chez les vecteurs hors épidémie. Une autre étude réalisée à l'île de La Réunion dans le cadre de l'ANR Entomochik a quant à elle rapporté des individus infectés par CHIK dans des populations naturelles d' *Ae. albopictus* capturées lors de l'épidémie de 2006 dans les foyers de transmission (Delatte et al. 2008).

D2. Multi-infections microbiennes et dynamique vectorielle.

Interférence entre la bactérie *Wolbachia* et le virus CHIKV. Des travaux ont montré une inhibition de la réplication des arbovirus (CHIKV et DENV2) par la bactérie *Wolbachia* transfectée chez *Aedes aegypti*, espèce naturellement dépourvue de cette bactérie (Moreira et al. 2009). Notre effort s'est concentré sur l'espèce vectrice majeure *Ae. albopictus* qui est naturellement infectée par 2 souches de *Wolbachia* (*wAlbA* et *wAlbB*). La lignée de moustique ALPROV d'*Ae. albopictus* maintenue en insectarium a été utilisée. Cette lignée héberge les 2 souches de *Wolbachia* qui sont capables de coloniser différents tissus du moustique, dont l'intestin et les glandes salivaires (Zouache et al. 2009b). Pour les études comparatives, des individus dépourvus de *Wolbachia* par traitement antibiotique ont été générés. De façon surprenante, aucun effet antiviral n'a été observé entre les individus symbiotiques et aposymbiotiques; la densité virale augmente dès le 2^{ème} après infection pour atteindre un maximum au 5^{ème} jour. Au contraire, l'augmentation de la densité de CHIKV semble induire une diminution de la densité de *Wolbachia* (Tortosa et al. 2008 ; Mousson et al. 2010). Le potentiel antiviral de *Wolbachia* serait donc différent entre une symbiose récente (*Wolbachia-Aedes aegypti*) et ancienne (*Wolbachia-Aedes albopictus*), suggérant des phénomènes d'adaptation et de co-évolution des systèmes étudiés. Les mécanismes moléculaires impliqués méritent d'être explorés. La variation de l'expression des gènes du système immunitaire inné de l'insecte pourrait être impliquée dans ces interférences différentielles (Moreira et al. 2009 ; Bian et al. 2010).

Effet de l'infection virale sur la communauté bactérienne totale. Le constat de la diminution la densité de *Wolbachia* suite à l'infection par le CHIKV, nous a conduit à analyser cet effet sur la communauté des bactéries totales associées au moustique. Aucune étude n'existe sur l'effet de l'infection sur les communautés bactériennes totales présentes chez le vecteur. La phylopuce à ADN, développée dans notre unité, a permis d'explorer différents niveaux taxonomiques (phylum, famille, genre, espèces). Les groupes bactériens détectés réagissent de manière différente à l'infection virale. Les analyses ont révélé l'existence d'interaction entre communautés bactériennes totales et le virus chikungunya chez *Aedes albopictus*. L'analyse par puce taxonomique et PCR quantitative a montré une modification de la dynamique des bactéries appartenant aux Alpha, Beta- et Gammaprotéobactéries, ainsi qu'aux Bacteroidetes, consécutive à l'infection par le virus chikungunya. L'intensité relative des sondes ciblant les bactéries du genre *Methylibium* et des bactéries membres de la famille *Enterobacteriaceae* augmente de façon significative en présence du virus, tandis que celle des sondes ciblant les endocytobiontes du genre *Wolbachia* (Alphaprotéobactérie) et *Blattabacterium* (Bacteroidetes) diminue fortement suite à l'infection. Une compétition pour les ressources pourrait expliquer ces modifications. Une autre hypothèse est l'activation de la réponse immunitaire du moustique suite à l'infection qui affecterait différemment les communautés microbiennes associées. Ces résultats seront soumis bientôt à publication (Zouache et al. en préparation).

Multi-infection et traits d'histoire de vie. Le coût de l'infection multiple (bactérie, virus) a été évalué par une analyse comparative entre différents statuts infectieux. Les paramètres mesurés comprenaient la survie, la ponte et l'éclosion. Aucune différence significative n'a été décelée entre les différentes modalités d'infection dans les conditions expérimentales utilisées (Mousson et al. 2010). Des auteurs avaient pourtant rapporté un rôle mutualiste de *Wolbachia* chez une lignée d'*Aedes albopictus* ; l'élimination de la bactérie entraînait notamment une diminution de la fécondité (Dobson et al. 2002). Ces résultats contrastés soulèvent des questions sur les différences génétiques entre les lignées étudiées puisque les moustiques sont sujets à des adaptations locales, mais aussi

sur les conditions expérimentales spécifiques des travaux. D'autres études comparatives sont donc nécessaires.

D 3. Colocalisations, interactions cellulaires et moléculaires CHIK-*Wolbachia*-moustique.

En suivant l'infection de *Wolbachia* dans le moustique par *hybridation in situ*, nous avons montré que la bactérie était capable de disséminer et coloniser les organes clés (intestin et glandes). Afin de mettre en évidence la colocalisation potentielle virus-bactérie, nous avons dans un premier temps développé et adapté avec succès l'*hybridation in situ* pour détecter CHIKV dans des lignées cellulaires d'insectes (Thèse Maxime Solignat, Mavingui et al. en préparation). La co-infection *Wolbachia* et CHIKV ont permis de détecter les deux microorganismes dans un même cytoplasme de quelques cellules (Figure 2) ; la majorité des cellules étant mono-infectée par l'un ou l'autre des microbes. Le modèle cellulaire sera utilisé comme système relativement simple pour explorer les interactions moléculaires entre les différents protagonistes.

En collaboration avec une équipe Lyonnaise travaillant sur les symbioses à *Wolbachia* chez les hyménoptères, nous avons montré que l'expression de la Ferritine des cellules de moustique était modifiée par l'infection bactérienne (Kremer et al., 2009). Afin de déterminer le rôle du fer dans la biologie de l'interaction entre cellule de moustique et *Wolbachia*, la quantité de fer dans le milieu de culture cellulaire a été manipulée. La supplémentation en fer se traduit par une forte toxicité du fer entraînant une nécrose importante des cellules. Toutefois, la présence de *Wolbachia* réduit le taux de nécrose cellulaire, ceci pourrait être lié à l'expression la bactérioferritine bactérienne qui se trouve fortement augmentée (Kremer et al., 2009). Par ailleurs, l'internalisation et le maintien de *Wolbachia* dans des lignées cellulaires de moustique ont permis d'extraire une quantité suffisante d'ADN et de lancer le séquençage du génome de la bactérie (Collaboration avec le Génoscope). Le modèle cellulaire peut être un outil pertinent pour développer des méthodes de détection ou encore pour étudier les interactions moléculaires multipartites virus-bactérie-moustique, permettant par la suite les analyses *in insecta*.

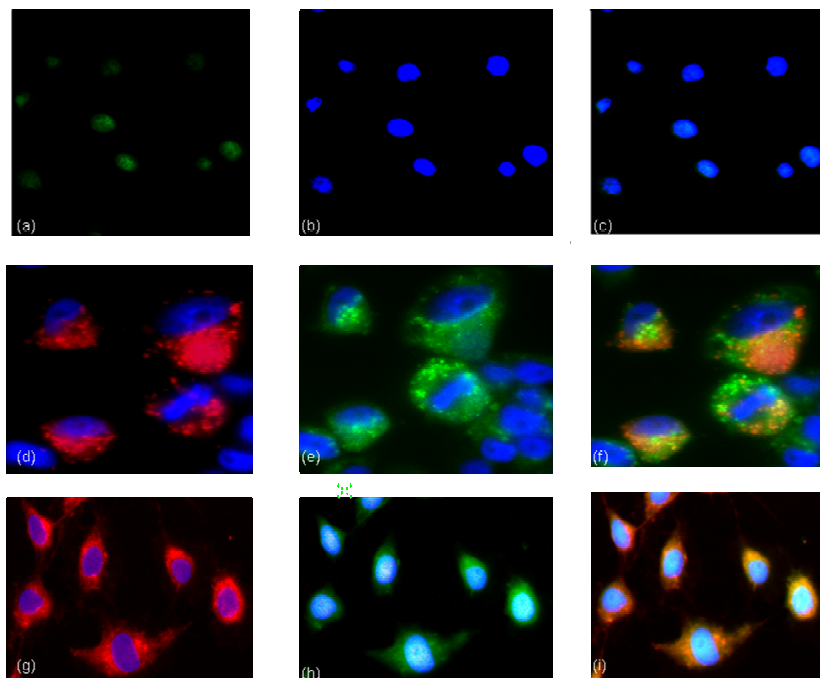


Figure 3. Infection de la lignée cellulaire C6/36 par *Wolbachia* (rhodamine, rouge) et CHIKV 06.21 (Alexa 488, vert) et détection par hybridation fluorescente *in situ* (FISH, Fluorescent Hybridization In Situ). Lignée C6/36 non-infectée : (a) bruit de fond de l'ADN nucléaire pour CHIKV. (b) DAPI. (c) Superposition (a) et (b). Lignée C6/36 wAlbB : (d) *Wolbachia*. (e) CHIKV. (f) Superposition de (d) et (e). Lignée C6/36 wMel : (g) *Wolbachia*. (h) CHIKV. (i) Superposition de (g) et (h). Les triangles blancs montrent les points de *Wolbachia* et les flèches blanches les points de virus à l'intérieur du cytoplasme des cellules infectées (Mavingui et al. En préparation)

E. EXPLOITATION DES RESULTATS

Les résultats ont été publiés dans 8 revues internationales, certaines parmi les plus quotées du domaine. Trois thèses de doctorats et 4 Masters 2 ont été soutenus dans le cadre des activités de recherche de **ChikvEndoM**.

- **Publications**
 - Mavingui. 2007. Entomological Research, **31 (Suppl. 1)**A43.
 - Tortosa et al. 2008. Insect Molecular Biology, **17**:677-684.
 - Rancès et al. 2008. Journal of Bacteriology, **190**:5020-5030.
 - Zouache et al. 2009. PLoS One, **4**:e6388.
 - Kremer et al. 2009. PLoS Pathogens, **5**:e1000630.
 - Voronin et al. 2010. Journal of Applied Microbiology, **108**:2133-2141
 - Mousson et al. 2010. Molecular Ecology, **19**: 1953-1964.
 - Zouache et al. 2010. FEMS Microbiology Ecology doi: 10.1111/ [Epub ahead of print]
- **Thèses de doctorat**
 - E. Rancès, Université de Lyon, 2009
 - M. Solignat, Université de Montpellier, 2010
 - K. Zouache, Université Lyon I, 2010
 - F. Raharimalala, Université d'Antananarivo, en cours
- **Master 2**
 - M. Beaume, Université de Lyon, 2008
 - V. Raquin, Université de Lyon, 2009
 - C. Arias Goeta, Université de Lyon 2009
 - M. Pia-Tuset, Université de Lyon 2010

De plus, le rayonnement de **ChikvEndoM** au sein de la communauté scientifique nationale et internationale est attesté par des communications faites au cours du programme. Enfin, **ChikvEndoM** a permis d'initier d'autres travaux comme le séquençage de la souche de *Wolbachia wAlbB* (collaboration Génoscope) ou encore l'analyse du transcriptome d'*Ae. albopictus* par séquençage haut débit via l'ANR blanc **ImmunSymBart** (2010-2014).

F. DISCUSSION

Le projet **ChikvEndoM** constitue un apport significatif dans la compréhension des interactions multipartites dans les pathosystèmes vectoriels à moustique. La combinaison des approches de terrain et des expérimentations au laboratoire a permis des avancées tout à fait significatives. Tout d'abord, elle a permis d'actualiser les informations sur la biogéographie des espèces vectrices et de confirmer l'expansion de l'espèce *Aedes albopictus* à Madagascar, phénomène bioinvasif qui est constaté dans différentes régions du monde et qui constitue en soi une avancée importante pour la poursuite des travaux sur la dynamique de transmission de pathogènes par cette espèce. Ensuite, les approches moléculaires ont permis de décrire pour la première fois de façon exhaustive les communautés bactériennes associées à *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*; les études du rôle biologique de ces symbiotes peuvent maintenant être initiées tant au niveau des populations que des communautés. Dans le contexte de Madagascar, la prévalence de CHIKV chez les moustiques semble faible en période inter-épidémique. L'influence possible de la transmission verticale du virus peut donc être considérée comme négligeable, ce qui mettrait en avant le rôle des réservoirs vertébrés secondaires qui sont mal connus à ce jour. Enfin, les phénomènes d'interférence entre bactérie et virus ont été observés avec des effets variables selon les groupes bactériens. Des travaux seront poursuivis pour mieux disséquer le fonctionnement de cette symbiose multipartenaire et les conséquences sur la dynamique de transmission virale.

G. CONCLUSION

Le projet **ChikvEndoM** a permis d'ouvrir des axes de recherche et des collaborations dans la prise en compte de l'ensemble du microbiote du moustique sur le processus de vection de pathogènes par les moustiques. Les avancées significatives ainsi obtenues permettent d'envisager une suite à ce projet en intégrant d'autres arbovirus comme la dengue qui sévit également dans le monde. Les approches de séquençage haut débit tant sur le microbiote que sur le transcriptome qui seront initiées en collaboration avec le Génoscope permettra de soumettre un programme sur les déterminants génétiques qui modulent les interactions multipartites dans ce pathosystème à moustique. Cette connaissance est essentielle pour mieux exploiter le potentiel modulateur de certaines bactéries sur la réplication et la dissémination virale par les espèces vectrices.

H. RÉFÉRENCES

- Angellini P., P. Macini, A.C. Finarelli et al. 2008. Chikungunya epidemic outbreak in Emilia-Romagna (Italy) during summer 2007. *Parasitologia* 50:97-98.
- Bian G., Xu Y., LU P., Xie Y., Xi Z. (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to Dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens*, 6:e1000833.
- Castillo JM. 1980. *Bull WHO* 58S :3346.
- De Thoisy, B., V. Lacoste A. Germain, J. Munuz-Jordan, C. Colon, J.F. Mauffrey, M. Delaval, F. Catzeflis, M. Kzanji, S. Matheus, P. Dussart, J. Morvan, A.A. setien, X. Deparis, and A. Lavergne. 2009. Dengue infection in neotropical forest mammals. *Vector Borne Zoonotic Dis* 9 :157-170.
- Delatte, H., C. Paupy, J.S. Dehec, J. Thiria , A-B Failloux et al. 2008. *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. *Parasite* 15: 3-13.
- Dobson SL, Marsland EJ, Rattanadechakul W (2002) Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* 160: 1087-1094.
- Gould, E.A., P. Gallian, X. de Lamballerie, and R.N. Charrel. 2010. First cases of autochthonous dengue fever and chikungunya fever in France: from bad dream to reality. *Clin Microbiol Infect* 165:1702-1704.
- Hedges, L.M., J.C. Brownli, S.L. O'Neil, and K.N. Johnson. 2008. *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* 322:702.
- Kambris Z., Cook P.E., Phuc H.K., Sinkins S.P. (2009). Immune activation by life-shortening *Wolbachia* and reduced filarial competence in mosquitoes. *Science*, 326: 134-136.
- Kremer N., D. Voronin, D. Charif, P. Mavingui, B. Mollereau, F. Vavre. 2009. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathogens* 5:e1000630.
- McMeniman, R.V. Lane, B.N. Cass, A.W. Fong, M. Sidhu, Y.F. Wang and S.L. O'Neill (2009) Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*, *Science* 2009; 323: 141–144.
- Montllor CB, Maxmen A, Purcell AP (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefits pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol Entomolo* 27: 189–195.
- Moreira L.A., Iturbe-Ormaetxe I., Jeffery J.A., Lu G.J., 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.
- Morin, S., M. Ghanim, M. Zeidan, H. Czosnek, M. Verbeek, J.F. van den Heuvel. 1999. A GroEL homologue from endosymbiotic bacteria of whitefly *Bemisia tabaci* is implicated in the circulative transmission of tomato leaf curl virus. *Virology* 256 :75-84.
- 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.
- Oliver KM, Moran NA, Hunter MS (2005) Variation in resistance to parasitism in aphids is due to symbionts not host genotype. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 12795-12800.
- OMS.1975. Technical report 561 :1-35.
- Rani A., Sharma A, rajagopal E, Adak T and Bhatnagar RK (2009). Bacterial diversity of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*- an Asian malarial vector. *BMC Microbiol* 9:96.
- Raymond M, Callaghan A, Fort P, Pasteur N. (1991). Worldwide migration of amplified insecticide resistance genes in mosquitoes. *Nature* 250:151-153.
- Rishikesh N, Quelennec G. 1983. *Bull World Health Organ*. 61:93-103.
- Ross RW. 1956. The Newala epidemic. III. *J. hyg.* 54 :177-191.

- 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.
- Teixeira L., Ferreira A., Ashburner M. (2009). The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biology*, 6:e2.
- Tortosa P, Courtiol A, Moutailler S, Failloux AB and Weill M (2008) Chikungunya–*Wolbachia* interplay in *Aedes albopictus*. *Insect Mol Biol* 17: 677–684.
- Tsuchida, T, R. Koga, T. Fukatsu. (2004). Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* 303: 1989.
- Turley AP, Moreira LA, O'Neill SL, McGraw EA (2009) *Wolbachia* infection reduces blood-feeding success in the dengue fever mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis* 2009; 3: e516.
- Van den Heuvel, J.F., M. Verbeeck, F. van der Wilk. (1994). Endosymbiotic bacteria associated with circulative transmission of potato leafroll virus by *Myzus persicae*. *J Gen Virol* 75:2559-2565.
- Werren JH, O'Neill SL. (1997). in SL O'Neill, AA Hoffmann, JH Werren (eds.) *Influential passengers :Inherited microorganisms and arthropod reproduction*. Oxford University Press, New York, pp 42-80.
- Wolfe, N.D., A.M. Kilbourn, W.B. Karesh et al. (2001). Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *Am J Trop Med Hyg* 64:310-316.
- Zouache K., D. Voronin, V. Tran-Van, and P. Mavingui. (2009a). Composition of bacterial communities associated with natural and laboratory populations of *Asobara tabida* infected by *Wolbachia*. *Appl Environ Microbiol* 75: 3755-3764.
- Zouache K., Voronin D., Tran-Van V., Mousson L., Failloux A.B., Mavingui P. (2009b). Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS One* 4 :e6388.
- Zouache K., F.N. Raharimalala, V. Raquin, V. Tran-Van, L.H. Raveloson Ravaomanarivo, P. Ravelonandro, P. Mavingui. 2010. Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different regions of Madagascar. *FEMS Molecular Ecology*. Online DOI: 10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x.