



HAL
open science

**Amélioration des connaissances sur les épidémies
d'arboviroses en Nouvelle-Calédonie et dans la région
Pacifique : importance du vecteur régional *Aedes
aegypti*.**

Elodie Calvez

► **To cite this version:**

Elodie Calvez. Amélioration des connaissances sur les épidémies d'arboviroses en Nouvelle-Calédonie et dans la région Pacifique : importance du vecteur régional *Aedes aegypti*.. Zoologie des invertébrés. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2017. Français. NNT : 2017NCAL0003 . tel-02929903

HAL Id: tel-02929903

<https://unc.hal.science/tel-02929903>

Submitted on 4 Sep 2020

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

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



Université de Nouvelle-Calédonie

Ecole doctorale du Pacifique (ED 469)

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie

Unité de Recherche et d'Expertise Dengue et Arboviroses

Thèse de Doctorat

Discipline : Biologie des organismes

Amélioration des connaissances sur les épidémies d'arboviroses en Nouvelle-Calédonie et dans la région Pacifique : importance du vecteur régional *Aedes aegypti*.

Par Elodie CALVEZ

Thèse dirigée par Myrielle DUPONT-ROUZEYROL

Soutenue le 11 décembre 2017

Devant le jury composé de :

Dr. Didier FONTENILLE, Directeur de Recherche
Dr. Louis LAMBRECHTS, Chargé de recherche
Pr. Xavier de LAMBALLERIE, Professeur
Dr. Yvon CAVALOC, Maître de Conférences
Dr. Vincent RICHARD, Directeur de Recherche
Dr. Myrielle DUPONT-ROUZEYROL, Chargée de Recherche

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

“L'expérimentateur se trouve sans cesse aux prises avec des faits qui ne se sont pas encore manifestés. L'inconnu dans le possible et aussi dans ce qui a été, voilà son domaine. Le charme de nos études, l'enchantement de la science, consiste en ce que, partout et toujours, nous pouvons donner la justification de nos principes et la preuve de nos découvertes.”

Louis Pasteur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Myrielle Dupont-Rouzeyrol, ma directrice de thèse. Je te remercie de la confiance que tu m'as accordée pour la réalisation de cette thèse tout au long de ces trois années. Merci de m'avoir permis de réaliser mon VSC et ma thèse dans des conditions optimales afin de m'épanouir scientifiquement et humainement pendant les cinq ans passés dans ton unité. Merci pour ton soutien et tes conseils qui m'ont permis de rester sereine pendant toutes ces années. Je ne te remercierai jamais assez pour avoir été la première à me donner la chance de travailler dans le monde des arbovirus.

Je tiens à remercier Didier Fontenille et Louis Lambrechts pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mémoire. Merci à Xavier de Lamballerie, Yvon Cavaloc et Vincent Richard pour avoir accepté d'examiner ce travail.

Je remercie aussi Anna-Bella Failloux, Van-Mai Cao-Lormeau et Valérie Burtet-Sarramegna pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse et de m'avoir prodigué de précieux conseils durant ces trois années.

Je voudrais remercier Yves Letourneur, les membres de l'Université de Nouvelle-Calédonie et de l'Ecole Doctorale du Pacifique pour leur aide, pour les différentes formations proposées pendant les trois ans de ma thèse et pour le prix que j'ai eu la chance d'obtenir aux Doctoriales 2017.

Olivia je te remercie pour ces cinq ans durant lesquels tes conseils, ton aide, ta rigueur et surtout ta bonne humeur auront été des éléments essentiels pour que mon séjour à l'IPNC reste inoubliable sur le plan scientifique et humain.

Merci à Dominique, ma première binôme de compétence vectorielle, tes conseils et ta bonne humeur ont été très importants pour moi pendant cette thèse. Merci Catherine pour nos discussions scientifiques ou non dans notre bureau 100% Finistère. Merci aux différentes VSC, Morgane, Julie et Marine avec qui j'ai pu travailler à l'UREDA. Merci aussi aux différents stagiaires que j'ai eu la chance de rencontrer tout au long de mon VSC et de ma thèse.

Laurent G., je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as pu m'apprendre sur les moustiques, tu m'as donné les bases essentielles à la réalisation de cette thèse. Merci aussi pour

les soirées aux accents irlandais et sud-américains toujours accompagnés d'histoires apprises au fil de tes aventures à travers le monde que tu nous racontes avec passion. Merci pour ta gentillesse et ta patience. Et Merci à Sonia pour sa bonne humeur communicative à chacune de nos rencontres.

Merci à l'équipe d'entomo : Nico, Morgane et Sosiasi. Merci pour vos conseils qui m'ont permis d'en apprendre chaque jour un peu plus sur les insectes. Mais surtout merci de m'avoir confié vos petites protégées pour me permettre de réaliser mes expériences.

Merci à l'UREL : Cyrille, Roman, Marie-Estelle et Emilie. Cyrille merci pour tes conseils pendant ces cinq ans et merci pour ton aide avec Homère qui nous a souvent donné du fil à retordre.

Merci au GIMIN : Mariko, Julie et Karl. Groupe récemment formé et déjà GENIAL.

Merci Arnaud pour ta disponibilité et pour ton aide dans les différents projets de recherche de cette thèse.

Merci Magali pour ta disponibilité et ta pédagogie. Ta patience pour m'expliquer les stats et pour dompter le logiciel R m'a été indispensable pour analyser mes résultats.

Merci à l'ensemble de mes colocataires de l'open-space que j'ai pu rencontrer pendant ces cinq ans à l'IPNC : Left, Noémie, Marie-Estelle, Sophie, Mathias, Emilie, Lan, Raphael, Alison, Eva et Emilie.

Merci à Pierre, Véronique, Nathalie, Elodie et l'ensemble du personnel de l'IPNC que j'ai pu rencontrer pendant ces cinq années. Je n'oublierai jamais les pauses de 10h ou de midi au faré, durant lesquelles le partage d'anecdotes mais surtout de viennoiseries participait largement à la bonne ambiance de l'Institut.

Merci à Laurent M. pour tes conseils et ton aide tout au long de l'étude de génétique des populations. Tu as réussi, dans la bonne humeur, à me faire comprendre tous ces paramètres qui m'étaient avant obscurs ; et je n'oublie pas tous les résultats de séquençage et de génotypage que tu m'as envoyé par mail pendant de nombreux mois.

Merci à Anna-Bella d'avoir accepté que je réalise mon stage de six mois dans son unité. Ce stage a été une réelle chance pour moi de progresser sur le plan technique mais aussi dans la réflexion scientifique. Bella, merci pour tes conseils et ton soutien pendant cette thèse. Laurence et Marie, travailler à vos côtés a été une incroyable opportunité pour moi de progresser dans le

domaine de la compétence vectorielle dans une atmosphère conviviale. Je remercie également Fadila, Célestine, Yousra, Thais et Dinair pour leurs conseils, leur gentillesse et pour toutes les discussions qu'on a pu avoir tout au long de mon stage. Pei-Shi and Leen, I thank you so much for all our discussions, I learned a lot about your respective disciplines thanks to you. Moreover, thank you for our after works at the Zig Zag. Merci à Jocelyne pour sa gentillesse lors des élevages à l'insectarium. Merci à François Rougeon, j'ai été ravie de faire votre connaissance. Et merci à Catherine qui avait été d'une aide précieuse pour toutes les démarches administratives relatives à ma venue au campus parisien.

Je remercie aussi Anna-Bella et Vincent Robert pour avoir organisé le cours « Insectes vecteurs et transmission d'agents pathogènes » auquel j'ai eu la chance de participer. Je remercie aussi l'ensemble des professeurs et des élèves rencontrés pendant ce mois de cours qui aura été très enrichissant pour moi.

Merci à Van-Mai Cao-Lormeau, Vaea Richard, Hervé Bossin et Jérôme Marie, de l'Institut Louis Malardé à Tahiti, pour leur collaboration et leur aide dans plusieurs projets de cette thèse.

Les différents projets de recherche sur lesquels j'ai eu la chance de collaborer m'ont permis de rencontrer de nombreuses personnes dans la région Pacifique et je tiens à remercier nos collaborateurs de Fidji, de Tonga, de Samoa, de Polynésie Française et Françoise Mathieu-Daudé pour leur aide dans ces projets.

Lucie et Arnaud, sans vous tout cela n'aurait pas débuté ! Je ne vous remercierai jamais assez de m'avoir parlé de cette annonce de VCS à l'IPNC un soir de décembre 2012. Lucie sans toi mon arrivée en Nouvelle-Calédonie aurait été difficile, tu m'as aidé à prendre mes marques et à m'intégrer rapidement à cette vie sous les tropiques. Merci aussi à vos familles qui ont toujours été adorables et chaleureuses avec moi. Je vous souhaite plein de bonheur avec vos têtes blondes.

Nico et Julie je tiens aussi à vous remercier à nouveau. Merci pour les discussions que nous avons pu avoir pendant cette dernière année de thèse et les vendredis soirs, aux couleurs de la Belgique et des Antilles, étaient pour moi de vraies soirées de décompression pendant l'écriture de ce manuscrit.

Comment parler de mon passage en Nouvelle-Calédonie sans parler du basket! Merci à Jean-Marc et Brigitte pour leur accueil dans le fabuleux club de l'AS6^{ème}Km. Merci de votre disponibilité et de votre gentillesse, les heures passées au complexe, les weekends à la Baie Maa et bien sûr les séjours à Tahiti seront des souvenirs inoubliables pour moi. Merci aussi à l'ensemble

des coéquipières avec qui j'ai eu la chance de jouer, ça n'a pas toujours été facile pour moi de vous suivre à l'entraînement, mais votre soutien m'a aidé à toujours me dépasser. Merci pour toutes les émotions que j'ai pu vivre avec vous dans les différentes compétitions qu'on a jouées ensemble. Merci à l'ensemble de la section Basket-Ball et du Grand Club de l'AS6^{ème}Km, j'ai vécu de formidables moments avec vous pendant ces cinq ans en Nouvelle-Calédonie.

Aurore et Mariko, notre trinôme Saké-Rhum-Chouchen est indissociable de ma vie à Nouméa. Merci de votre présence dans les moments difficiles et dans les moments plus festifs. Mariko je te souhaite que du bonheur dans ta nouvelle vie avec ton petit trésor. Aurore comment te remercier pour ces soirées *Imprévues* qui m'ont été essentielles pendant ces cinq années. Je te souhaite aussi le meilleur pour cette nouvelle aventure qui se présente devant toi. Et comme l'a joliment dit Albert Schweitzer "*Il y a deux moyens d'oublier les tracas de la vie : la musique et les chats*".

Mes amis calédoniens sont importants mais mes amis bretons aussi ! Merci à Audrey, Marine et Andréa, notre amitié de longue date maintenant est très importante pour moi. Lors de mes retours en Bretagne vous étiez toujours présentes pour passer de bonnes soirées et votre soutien pendant ces trois ans a été essentiel. Marine je te souhaite de t'épanouir autant que moi en Nouvelle-Calédonie. Je n'oublie pas ma filleule Léana qui reste un rayon de soleil à chaque fois que je la vois. Merci à mes coéquipières du club de Plouider Basket-Ball Côte des Légendes et à tous mes amis de métropole.

Je remercie l'ensemble de ma famille, mes oncles et tantes, mes cousins et cousines et tous les arrière-petits-enfants qui sont venus agrandir notre grande famille. Merci de votre soutien et de votre présence à chacun de mes retours à Plouider. Je remercie en particulier mon parrain et ma marraine pour leurs encouragements, vos parcours ont été une vraie source de motivation pour moi.

J'ai une pensée émue pour mes grands-parents, qui nous ont toujours soutenus et qui nous ont donnés les valeurs qui nous sont indispensables maintenant.

Julie et Anne-Laure, mes petites sœurs, merci pour votre soutien pendant ces cinq ans passés loin de notre Bretagne natale. Vos encouragements ont été très précieux pour moi.

Le plus grand merci est pour mes parents qui nous ont toujours encouragées et soutenues pour atteindre nos objectifs. Sans votre présence à mes côtés tout cela n'aurait pas été possible.

Résumé

Depuis la fin du 19^{ème} siècle, les épidémies dues aux arbovirus constituent un problème de santé publique majeur en Nouvelle-Calédonie et dans la région Pacifique de manière générale. Ces cinq dernières années, la fréquence des épidémies de dengue a augmenté et l'introduction des virus du chikungunya et du Zika (ZIKAV) a démontré que cette région du monde pouvait être un hot spot d'émergence des arboviroses. Ces trois virus sont transmis par des moustiques du genre *Aedes* dont le principal vecteur de la région Pacifique est *Aedes aegypti*. Mis à part des données sur l'épidémiologie de la dengue dans la région, peu d'informations étaient alors disponibles sur les vecteurs ou sur leurs capacités à transmettre les arbovirus. Or ces données sont cruciales pour mieux comprendre l'incidence particulière de ces épidémies dans la région. Dans ce travail de thèse, nous avons tout d'abord caractérisé génétiquement le vecteur *Ae. aegypti* de la région Pacifique. Les résultats de cette étude ont permis de mettre en avant i) un polymorphisme génétique modéré de ce vecteur à l'échelle de la région Pacifique principalement liée à l'isolement des îles et à leurs environnements et ii) une corrélation entre déplacements humains et introduction d'*Ae. aegypti* dans les différentes îles de la région. Ces déplacements humains sont également à mettre en rapport avec la propagation du ZIKAV dans la région Pacifique comme le suggère d'ailleurs l'étude de l'évolution virale du ZIKAV. En effet, l'épidémie qui a touché la région entre 2013-2016 serait due à l'introduction unique du virus en Polynésie Française et à une circulation active entre les différentes îles par la suite. Nous avons ensuite, pour la première fois, évalué la compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* pour les virus de la dengue 1 (DENV-1) et du ZIKAV. Les résultats obtenus montrent une faible transmission du DENV-1 et du ZIKAV de la lignée asiatique/pacifique. A l'inverse, la transmission est modérée à haute pour des ZIKAV de la lignée africaine. Les interactions entre le génotype du vecteur et le génotype viral semblent donc revêtir une importance particulière dans notre contexte. Les résultats ainsi obtenus au cours de ce travail doctoral devraient permettre une meilleure évaluation du risque de survenue d'une épidémie d'arbovirose en Nouvelle-Calédonie et aider à la mise en place de nouvelles méthodes de lutte anti-vectorielle et de prévention.

Mot clés : *Aedes aegypti*, dengue, Zika, Nouvelle-Calédonie, région Pacifique, compétence vectorielle

Abstract

Since the end of the 19th century, epidemics due to arboviruses have been a major public health problem in New Caledonia and the Pacific region. Over the past five years, the incidence of dengue epidemics has increased and the introduction of the chikungunya and Zika viruses (ZIKAV) has demonstrated that this region of the world is to be considered as a hot spot for the emergence of arboviruses. These three viruses are transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*, whose main vector in the Pacific region is *Aedes aegypti*. With the exception of some data concerning the dengue virus epidemiology in the region, little was known about vectors or on their ability to transmit arboviruses. These data are crucial to increase our knowledge about the specific appearance of these epidemics in the region. During my PhD, I first genetically characterized the vector *Ae. aegypti* from the Pacific region. The results of this study highlighted i) a moderate genetic difference among the *Ae. aegypti* population in the Pacific region mainly linked to the isolation and the specific environments and ii) a correlation between human flows and the various introductions of *Ae. aegypti* in the Pacific region. These human flows are also related to the spread of ZIKAV in the Pacific region as suggested by the study of the viral evolution of ZIKAV. Indeed, the ZIKAV epidemic that affected the region between 2013-2016 could be due to the single introduction of the virus in French Polynesia followed by an active circulation between the different islands. We were also the first to evaluate *Ae. aegypti* vector competence for dengue virus 1 (DENV-1) and for different ZIKAV strains. The results have shown a low transmission efficiency for DENV-1 and the Asian / Pacific ZIKAV strains. On the opposite, the Caledonian vector's transmission efficiency is moderate to high with the African ZIKAV. The interactions between the vector genotype and the viral genotype seem to be particularly important in our context. The results obtained during this PhD work should allow a better assessment of the risk of an arbovirus outbreak in New Caledonia as well as the development of new antivectorial and prevention strategies.

Keywords: *Aedes aegypti*, dengue, Zika, New Caledonia, Pacific region, vector competence

Table des matières

REMERCIEMENTS	I
RESUME	V
ABSTRACT	VI
FINANCEMENTS ET RECOMPENSES	XI
ILLUSTRATIONS	XII
1. <i>Figures</i>	<i>xii</i>
2. <i>Tableau</i>	<i>xiii</i>
LISTE DES ABREVIATIONS	XIV
PREAMBULE	XIX
PARTIE 1 : INTRODUCTION	1
CHAPITRE 1 : LES ARBOVIRUS	3
1.1. <i>Les arbovirus : Définition, classification et transmission</i>	5
1.2. <i>Les Alphavirus</i>	6
1.2.1. Le virus du chikungunya.....	6
1.2.2. Le virus de la Ross River	7
1.3. <i>Les Flavivirus</i>	8
1.3.1. Classification et structure.....	8
1.3.2. Cycle de réplication	11
1.4. <i>Le virus de la dengue</i>	12
1.4.1. Phylogénie	13
1.4.2. Symptômes de la dengue	14
1.5. <i>Le virus Zika</i>	16
1.5.1. Phylogénie	16
1.5.2. Symptômes	17
1.6. <i>Traitements et vaccins</i>	19
CHAPITRE 2 : ÉPIDEMIOLOGIE DES ARBOVIRUS	21
2.1. <i>Epidémiologie mondiale des arbovirus</i>	23

2.2. <i>Epidémiologie dans la région Pacifique</i>	24
2.3. <i>Epidémiologie en Nouvelle-Calédonie</i>	27
CHAPITRE 3 : LES MOUSTIQUES VECTEURS D'ARBOVIRUS	29
3.1. <i>Biologie des moustiques</i>	31
3.2. <i>Bio-écologie d'Aedes aegypti, vecteur majeur d'arbovirus</i>	34
3.3. <i>Distribution géographique du vecteur Aedes aegypti</i>	35
3.3.1. <i>Distribution mondiale</i>	35
3.3.2. <i>Distribution dans le Pacifique</i>	36
3.4. <i>Diversité génétique du vecteur Aedes aegypti dans le monde</i>	38
CHAPITRE 4 : LA CAPACITE VECTORIELLE	41
4.1. <i>La capacité vectorielle : définition</i>	43
4.2. <i>La transmission vectorielle</i>	45
4.3. <i>Les facteurs pouvant influencer la capacité vectorielle des vecteurs d'arbovirus</i> . 48	
4.4. <i>La compétence vectorielle</i>	51
OBJECTIFS	54
PARTIE 2 : DEMARCHE EXPERIMENTALE	57
CHAPITRE 1 : ÉTUDE DE LA DIVERSITE GENETIQUE D'AEDES AEGYPTI DANS LA	
REGION PACIFIQUE	59
1.1. <i>Contexte de l'étude et démarche expérimentale</i>	61
1.2. <i>Résultats et conclusion</i>	62
1.3. <i>Article 1</i>	63
CHAPITRE 2 : ÉTUDE DE LA COMPETENCE VECTORIELLE D'AEDES AEGYPTI POUR	
LE VIRUS DE LA DENGUE 1	85
2.1. <i>Contexte de l'étude et démarche expérimentale</i>	87
2.2. <i>Résultats et conclusion</i>	88
2.3. <i>Article 2</i>	90
CHAPITRE 3 : ÉTUDE DE L'ÉVOLUTION MOLECULAIRE DU VIRUS ZIKA DANS LA	
REGION PACIFIQUE	105
3.1. <i>Contexte de l'étude et démarche expérimentale</i>	107
3.2. <i>Résultats et conclusion</i>	108
3.3. <i>Article 3</i>	110

CHAPITRE 4 : INFLUENCE DE LA SOUCHE VIRALE ZIKA SUR LA TRANSMISSION PAR LE VECTEUR <i>Aedes aegypti</i> DE NOUVELLE-CALÉDONIE.....	119
4.1. <i>Contexte de l'étude et démarche expérimentale</i>	121
4.2. <i>Résultats et conclusion</i>	122
4.3. <i>Article 4</i>	124
PARTIE 3 : DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES.....	141
1. <i>Etude de la compétence vectorielle d'Aedes aegypti dans le Pacifique</i>	144
1.1. <i>Le rôle des barrières physiologiques dans la réponse du moustique à l'infection</i>	144
1.2. <i>Des relations complexes entre virus et vecteurs</i>	148
2. <i>L'impact du microbiome et de l'environnement sur la transmission des arbovirus</i>	149
3. <i>Le rôle de l'intensification des échanges sur la dissémination des arbovirus et de leurs vecteurs</i>	151
4. <i>Conclusion</i>	153
BIBLIOGRAPHIE	157
ANNEXES.....	189
COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES.....	231

Financements et Récompenses

Financements :

Ce programme de thèse a reçu le soutien financier de :

- Le Fonds Pacifique (programme AeDenPac CZT102701R/n°1162, CNC194801X/n°1272 et UO029CSOLD988/n°1439 ; programme ISID-Pacifique, n°063-14_2014/ n°121-15_2016/ n°030-16_2016)
- Le Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie (CS123007063/n°1162)
- Les Actions Concertées Inter Pasteuriennes (ACIP, A-15-2014)
- Le Ministère de l'Outre-Mer (programme ArboPac, 2014-2016)
- Programme de Recherche et de l'Innovation de l'Union Européenne Horizon 2020 dans le projet ZIKAlliance (n°734548)
- Bourse de stage Calmette et Yersin de l'Institut Pasteur (6 mois)
- L'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie

Récompenses :

- Prix de la meilleure présentation orale aux Doctoriales 2017 (Université de Nouvelle-Calédonie) d'une valeur de 400 000 XPF.
- Early Career Scholar Grant (International Congress for Tropical Medicine and Malaria, 2016, Brisbane, Australie) d'une valeur de 1 000 \$ AUD.

Illustrations

1. Figures

Figure 1	Classification des arbovirus.	5
Figure 2	Génomome du virus de la dengue.	6
Figure 3	Organisation structurale des Flavivirus.	7
Figure 4	Maturation des virions de dengue.	8
Figure 5	Réplication du virus de la dengue dans une cellule de mammifère.	10
Figure 6	Arbre phylogénétique obtenue par analyse bayésienne des régions codantes de génome viraux de dengue.	11
Figure 7	Classification des cas de dengue.	12
Figure 8	Arbre phylogénétique réalisé par la méthode du neighbor-joining sur les génomes complets de virus Zika.	14
Figure 9	Eruption cutanée (A) et microcéphalie après infection par le virus Zika (B).	15
Figure 10	Circulation des virus de la dengue et du Zika entre 2005 et 2015.	19
Figure 11	Circulation des arbovirus dans la région Pacifique entre 2007 et 2016.	21
Figure 12	Epidémies dues aux arbovirus en Nouvelle-Calédonie entre 1995 et 2017.	23
Figure 13	Scutum d'adulte <i>Aedes aegypti</i> (A) et <i>Aedes albopictus</i> (B).	27
Figure 14	Cycle de développement du moustique.	28
Figure 15	Morphologie du moustique au stade de la larve (A), de la nymphe (B) et de l'adulte (C).	29
Figure 16	<i>Aedes aegypti formosus</i> (à gauche) et <i>Aedes aegypti aegypti</i> (à droite).	31
Figure 17	Prédiction de la distribution mondiale d' <i>Aedes aegypti</i> .	32
Figure 18	Distribution des vecteurs <i>Aedes</i> dans la région Pacifique.	33
Figure 19	Historique de l'introduction d' <i>Ae. aegypti</i> en Nouvelle-Calédonie	34
Figure 20	Etude phylogénétique d' <i>Ae. aegypti</i> basée sur des SNPs (à gauche) et le séquençage de gènes nucléaires (à droite).	35

Figure 21	Interactions G x G pour le virus de la dengue et le vecteur <i>Ae. aegypti</i> .	41
Figure 22	Etapes du développement viral dans le moustique vecteur.	42
Figure 23	Cycle de transmission du virus de la dengue et du Zika.	43
Figure 24	Principales voies de signalisation et d'ARN interférence de l'immunité du moustique suite à une infection virale.	46
Figure 25	Principales voies d'ARN interférence.	47
Figure 26	Protocole d'infection expérimentale de moustiques.	48
Figure 27	Résumé des objectifs de ce travail de thèse.	137
Figure 28	Les barrières à la transmission des arbovirus chez le moustique.	138
Figure 29	Représentation schématique de la permissivité des cellules épithéliales intestinales.	139

2. Tableau

Tableau 1	Tableau des symptômes cliniques de trois arbovirus.	15
-----------	---	----

Liste des abréviations

% :	Pourcentage
°C :	Degré Celsius
µL :	Microlitre
ADN :	Acide DésoxyriboNucléique
<i>Ae.</i> :	<i>Aedes</i>
AMPs :	Peptides AntiMicrobiens
ARN :	Acide RiboNucléique
ARNi:	ARN interference
ATP :	Adénosine TriPhosphate
C6/36 :	cellules d’ <i>Aedes albopictus</i>
CHIKV :	virus du chikungunya
CO1 :	Cytochrome Oxydase sous-unité 1
CO ₂ :	Dioxyde de carbone
CPS :	Communauté du Pacifique Sud
DASS-NC :	Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de la Nouvelle-Calédonie
DDT :	DichloroDiphényl-Trichloroéthane
DENV :	virus de la dengue
DENV-1 :	DENV sérotype 1
DENV-2 :	DENV sérotype 2
DENV-3 :	DENV sérotype 3
DENV-4 :	DENV sérotype 4
DH :	Dengue Hémorragique
DSC :	Dengue avec Syndrome de Choc
DVRF :	Dengue Virus Restriction Factors
E :	acide glutamique
FFU :	Focus-Forming Unit
G x G :	interaction Génotype x Génotype
G x G x E:	interaction Génotype x Génotype x Environnement

h :	heure
Imd :	Immune Deficiency
IPNC :	Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie
JAK/STAT :	Janus Kinase/Signal Transductcers and Activators of Transcription
kb :	kilobase
kDa :	kiloDalton
M :	méthionine
miRNA :	micro RNA
mL :	millilitre
mm :	millimètre
N :	asparagine
NADH :	forme réduite de la Nicotinamide Adénine Dinucléotide
ND4 :	NADH Déshydrogénase sous unité 4
nm :	nanomètre
NS :	protéines Non Structurales
OMS :	Organisation mondiale de la Santé
ONNV :	O'nyong nyong virus
ORF :	Open Reading Frame
PCR :	Polymease Chain Reaction
pfu :	Plaque-Forming Unit
pH :	potentiel hydrogène
PIE :	Période d'Incubation Extrinsèque
piRNA :	PIWI-interacting RNA
PPRR :	Pattern Recognition Receptors
prM :	précurseur de la protéine de la Membrane
Protéine C :	Protéine de la Capside
Protéine E :	Protéine de l'Enveloppe
Protéine M :	Protéine de la Membrane
QTL :	Quantitatif Trait Loci
RISC :	RNA Induced Silencing Complex
RT-PCR :	Reverse Transcriptase PCR
S :	sérine

siRNA :	small interfering RNA
smRNA :	small RNA
SNP :	Single-Nucleotide Polymorphism
sp :	espèce
T :	thréonine
TCID50 :	50% Tissue Culture Infective Dose
V :	valine
VERO :	cellules de rein de singe vert
VLPs :	Viral Like Particles
wAlbB :	souche de <i>Wolbachia</i> isolée d' <i>Aedes albopictus</i>
wMel :	souche de <i>Wolbachia</i> isolée de <i>Drosophila melanogaster</i>
wMelPop-CLA :	souche de <i>Wolbachia</i> isolée de <i>Drosophila melanogaster</i>
ZIKAV :	virus Zika

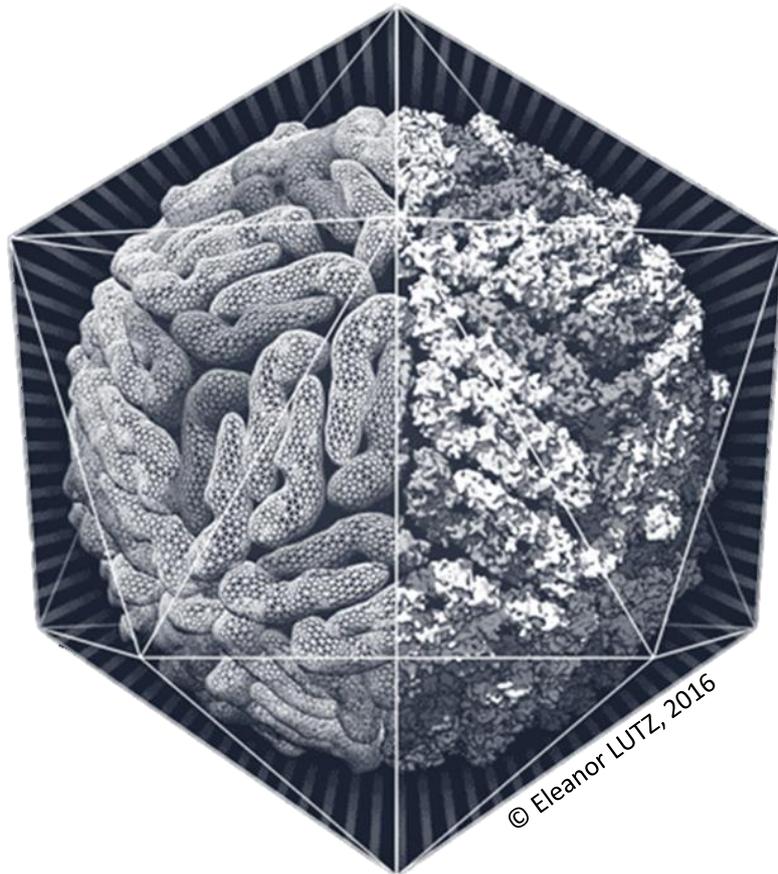
Préambule

La région Pacifique, comme la majorité des pays des zones tropicales et intertropicales, est régulièrement frappée par les épidémies d'arboviroses, ce qui représente un problème de santé publique majeur. Ces cinq dernières années, l'augmentation de la fréquence des épidémies de dengue et l'introduction des virus du chikungunya et du Zika, a démontré la nécessité de mieux comprendre ces épidémies, en Nouvelle-Calédonie et dans la région Pacifique, afin de mieux les appréhender.

Le travail présenté dans ce manuscrit est centré sur les interactions entre les virus de la dengue et du Zika et leur vecteur principal en Nouvelle-Calédonie, le moustique *Aedes aegypti*. La caractérisation de ces interactions permettra de mieux évaluer leurs importances respectives dans la survenue des épidémies d'arboviroses en Nouvelle-Calédonie et dans la région Pacifique.

Partie 1 : Introduction

Chapitre 1 : Les arbovirus



Chapitre 1 : Les arbovirus

1.1. Les arbovirus : Définition, classification et transmission

Les arbovirus (de l'anglais Arthropod-Borne Virus) sont des virus capables d'infecter des arthropodes hématophages suite à l'ingestion d'un repas sanguin chez un hôte vertébré infecté. Le virus est ensuite capable de se répliquer dans les tissus de l'arthropode, pour être à nouveau transmis lors d'une piqûre ultérieure à un nouveau hôte vertébré (Mellor, 2000). Parmi les 534 virus présents dans le Catalogue International des Arbovirus, 134 peuvent entraîner une maladie chez l'homme et la majorité de ces arbovirus sont répartis parmi les familles suivantes : *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Bunyaviridae*, *Reoviridae* et *Rhabdoviridae* (Go *et al.*, 2014; Gubler, 2002; Karabatsos, 1985; Mellor, 2000) (Figure 1). Les arbovirus responsables des problèmes de santé publique majeurs appartiennent principalement à trois familles : *Flaviviridae*, *Togaviridae* et *Bunyaviridae* (Gubler, 2002).

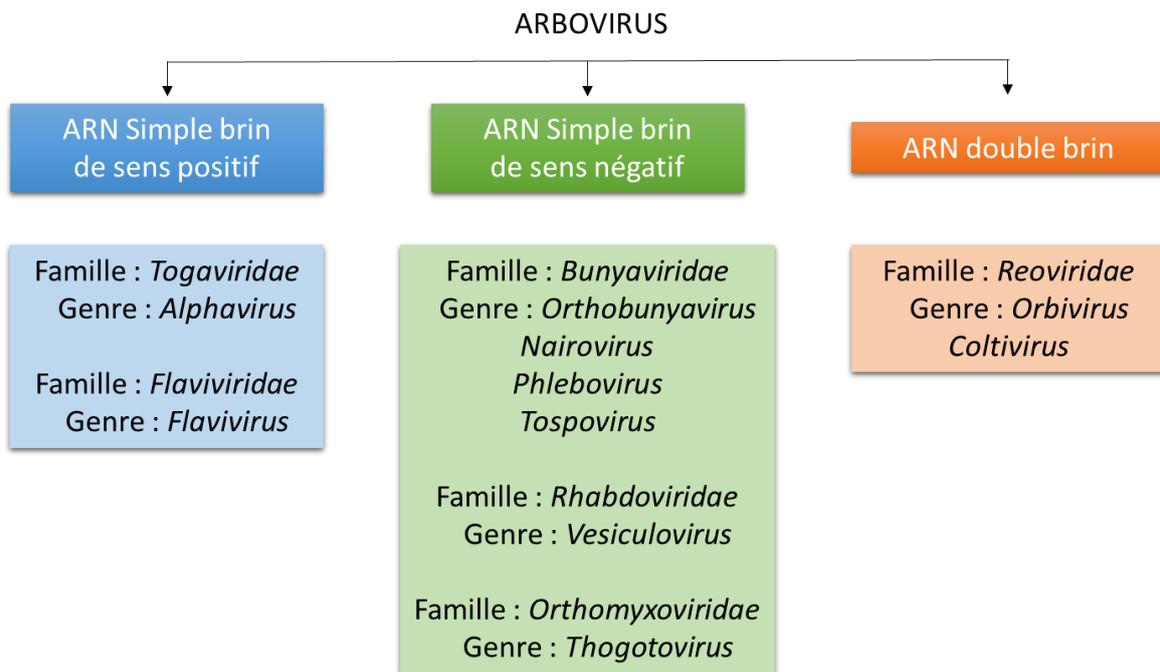


Figure 1. Classification des arbovirus. Adaptée de Go *et al.*, 2014

Plusieurs arthropodes sont vecteurs d'arbovirus et notamment des insectes comme les moustiques ou les phlébotomes, mais aussi des arachnides tels que les tiques. Les moustiques représentent le principal enjeu mondial de santé publique en raison du grand nombre d'arbovirus qu'ils peuvent transmettre (Bolling *et al.*, 2015; Mellor, 2000).

Ce manuscrit sera centré sur les *Flavivirus* et en particulier les virus de la dengue et du Zika. Mais une brève description des *Alphavirus* sera réalisée en évoquant la circulation du virus du chikungunya et de la Ross River dans la région Pacifique.

1.2. Les *Alphavirus*

Les *Alphavirus* font partis de la famille des *Togaviridae*. Ce groupe est constitué de 31 espèces de virus tels que le virus du Chikungunya (CHIKV) et du virus de la Ross River. Les virus de ce groupe sont principalement isolés de vertébrés et d'arthropodes terrestres, cependant des *Alphavirus* ont été isolés d'hôtes et de vecteurs aquatiques (Forrester *et al.*, 2012). Une étude récente semble indiquer que l'origine des *Alphavirus* pourrait être les océans du Sud et que ces virus se seraient propagés à l'ensemble du monde (Forrester *et al.*, 2012). Plusieurs de ces virus présentent la particularité de provoquer des épidémies explosives dans la population humaine et ont une capacité de propagation rapide vers des régions non endémiques, devenant ainsi un problème de santé publique majeur (Weaver and Reisen, 2010).

Les *Alphavirus* sont des virus enveloppés et leur capsid de symétrie icosaédrique contient un ARN simple brin de sens positif d'environ 11,7 kb (Strauss and Strauss, 1994). L'organisation génomique est composée d'une coiffe 5'NTR, d'un premier cadre de lecture (*ORF*) qui code les protéines non structurales nsP1 à nsP4, d'une région jonction, d'un second *ORF* nommé la région subgénomique 26S qui code les glycoprotéines de l'enveloppe (E1, E2, E3 et 6k) et la protéine de la capsid (C) et d'une queue polyA en 3'NTR (Chevillon *et al.*, 2008).

1.2.1. Le virus du chikungunya

Le virus du chikungunya (CHIKV) a été isolé pour la première fois en 1953 en Tanzanie et a ensuite circulé en Afrique et en Asie. Il serait apparu en Afrique il y a environ 500 ans et aurait été introduit en Asie au 20^{ème} siècle depuis l'Afrique de l'Est. Il est divisé en trois lignées phylogénétiques distinctes : Asie, Afrique de l'Ouest et Afrique de l'Est, Centrale et du Sud

(ECSA) (Volk *et al.*, 2010). En 2005-2006, une épidémie de CHIKV est observée à l'île de la Réunion et les études génétiques démontrent que cette épidémie est due à un virus de la lignée ECSA. Des analyses complémentaires révèlent la présence d'une mutation au niveau de la protéine d'enveloppe E1 à la position 226 à laquelle une alanine a été remplacé par une valine (E1-A226V) qui n'était pas présente au début de l'épidémie (Schuffenecker *et al.*, 2006). Cette mutation serait à l'origine de la flambée épidémique car elle serait corrélée à une meilleure transmission du virus par le vecteur majoritaire de l'île, le moustique *Aedes albopictus* (Vazeille *et al.*, 2007).

Après infection, la durée d'incubation du CHIKV est de 2 à 4 jours chez l'homme. Les principaux symptômes sont de la fièvre, des éruptions cutanées et des arthralgies. Une forme sévère de la maladie peut mener à des arthralgies invalidantes pouvant durer des mois voire des années chez 30 à 40% des patients, des méningo-encéphalites, et plus rarement des hépatites, des insuffisances respiratoires et des hémorragies. La proportion de patients présentant une forme asymptomatique de la maladie est plus faible que pour les autres arbovirus tel que la dengue, elle a été estimée à 15% lors de l'épidémie à la Réunion (Lemant *et al.*, 2008) et des études réalisées en Asie et en Amérique ont confirmé ce résultat avec une proportion de cas asymptomatiques variant de 3 à 40% et une durée de virémie asymptomatique estimée à 2,5 jours (Appassakij *et al.*, 2013; Gallian *et al.*, 2017; Gay *et al.*, 2016; Yactayo *et al.*, 2016).

1.2.2. Le virus de la Ross River

Ce virus est endémique et enzootique en Australie et en Papouasie Nouvelle-Guinée. Les études phylogénétiques montrent une diversité génétique faible du virus de la Ross River et suggèrent une origine récente (Jones *et al.*, 2010).

Après infection la période d'incubation est de 7 à 9 jours. Les symptômes de la maladie sont proches de ceux dus au CHIKV : fièvre, arthralgie et éruptions cutanées. Des formes plus graves de la maladie ont été décrites telles que des encéphalites et des méningites (Harley *et al.*, 2001).

1.3. Les *Flavivirus*

Les *Flavivirus* font partis de la famille des *Flaviviridae*, tout comme les *Pestivirus* et les *Hepacivirus*. Ce groupe représente plus de 70 virus responsables de maladies pouvant être sévères et mortelles. Les arbovirus appartenant aux *Flavivirus* sont principalement transmis par les moustiques (sérocomplexe de l'encéphalite japonaise, sérocomplexe de la dengue, Fièvre Jaune, Zika,...) mais aussi par les tiques (sérocomplexe des encéphalites à tiques) (Go *et al.*, 2014; Mukhopadhyay *et al.*, 2005).

1.3.1. Classification et structure

Les *Flavivirus* sont des virus à ARN simple brin de polarité positive d'environ 11 kb. Leur génome, composé d'un seul *ORF*, est directement traduit en protéines (Lindenbach and Rice, 2003). Ce génome viral composé de 10 gènes (Figure 2) est traduit en un seul long polypeptide qui est ensuite clivé par des protéases virales et cellulaires pour former 10 protéines. Parmi ces protéines, trois sont des protéines structurales pour : la capsid (C), l'enveloppe (E) et la membrane (M) et sept sont des protéines non structurales (NS1 à NS5) qui jouent un rôle dans la réplication et l'assemblage viral (Figure 3) (Go *et al.*, 2014; Guzman *et al.*, 2010; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Perera and Kuhn, 2008; Shi and Gao, 2017). Les extrémité 5' et 3', sont quant à elles respectivement formées d'une coiffe de type I (m7GpppAm) et d'une terminaison non-polyadénylée (Rice, 1990).

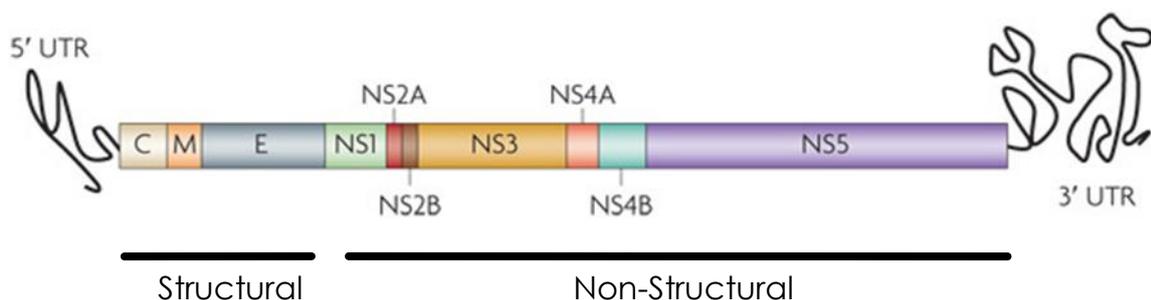


Figure 2. Génome du virus de la dengue. Adaptée de Guzman *et al.*, 2010

Lors de la réplication des *Flavivirus*, des erreurs de l'ARN polymérase, en l'absence de correction de l'ARN, peuvent entraîner un taux d'erreur pouvant aller de 10^{-3} à 10^{-5} substitutions par nucléotide et l'apparition de quasi-espèces au sein de la population virale

(Domingo, 1992; Domingo and Holland, 1997; Domingo *et al.*, 2006; Kurosu, 2011; Mas *et al.*, 2010). L'alternance d'hôtes dans le cycle de transmission des arbovirus, qu'ils soient vertébrés ou invertébrés, va aussi entraîner une force sélective des variants, à la fois chez l'hôte et le vecteur, limitant le taux d'évolution virale, au cours d'une épidémie, en imposant un compromis adaptatif (Grange *et al.*, 2014; Strauss and Strauss, 1994).

La structure des *Flavivirus* est approximativement sphérique de diamètre de 50 nanomètres (nm). Le génome viral se trouve dans une nucléocapside à symétrie icosaédrique composée de la protéine structurale de capsid (C). Cette nucléocapside est entourée d'une bicouche lipidique dans laquelle sont ancrées 180 copies des protéines de membrane (prM ou M) et des protéines de l'enveloppe (E) qui sont fixées à cette bicouche par des hélices transmembranaires. Les protéines prM/M et E constituent la coque glycoprotéique à la surface du virus, les protéines E favorisant l'entrée dans la cellule de l'hôte (Figure 3) (Perera and Kuhn, 2008).

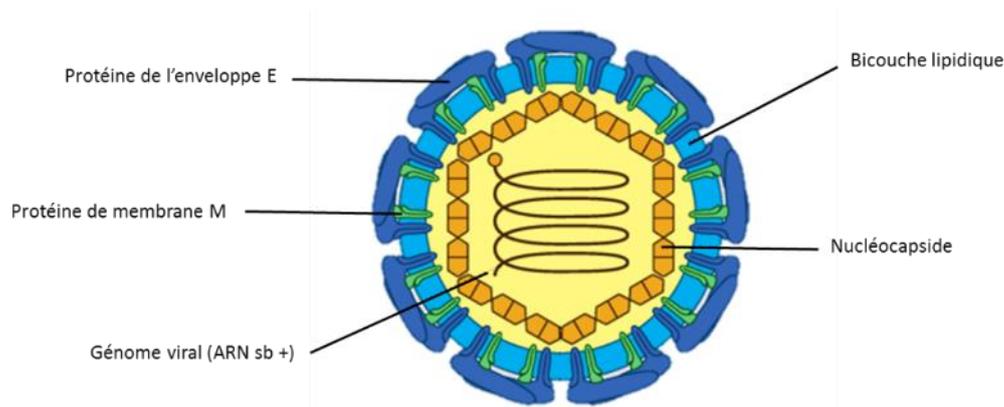


Figure 3. Organisation structurale des Flavivirus. Adaptée de Perera and Kuhn, 2008 ; © Promega

Ces virus peuvent se retrouver sous forme immature (morphologie « épineuse ») ou sous forme mature (morphologie « lisse »). Ces caractéristiques structurelles sont dues à des conformations des protéines E et M différentes (Figure 4). Dans le virion immature les protéines E et prM forment 90 hétérodimères qui forment 60 pointes trimères à la surface de la particule (Figure 4a). Dans le virion mature, la protéine E est retrouvée en homodimères qui recouvrent la surface virale formant une coque protéique « lisse » (Figure 4d). Ce changement de conformation est obtenu par clivage du peptide « pr » du groupe protéique prM pendant la maturation virale par une furine codée par l'hôte (Figures 4b et 4c) (Stadler *et al.*, 1997; Yu

et al., 2008). La protéine M reste dans la particule virale mature sous la forme d'une protéine transmembranaire sous la coque protéique E (Figure 4d). Ces transitions structurales se produisent lors de la réplication du virus (Modis *et al.*, 2003; Modis *et al.*, 2004; Perera and Kuhn, 2008; Zhang *et al.*, 2004). Ces changements sont aussi opérés sous l'influence du pH (entre 5,8 et 6,0), et sont réversibles. Il a été suggéré que la particule virale immature pourrait exister réversiblement sous forme « épineuse » ou « lisse » en fonction du pH de l'environnement cellulaire (Perera and Kuhn, 2008).

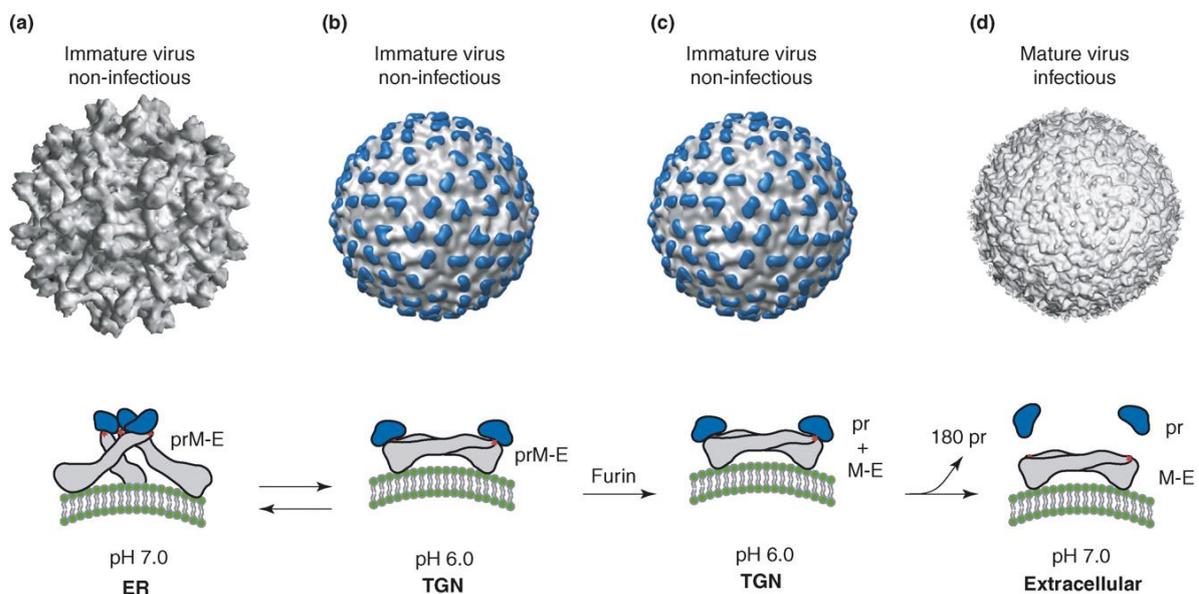


Figure 4. Maturation des virions de dengue. Perera and Kuhn, 2008

Les protéines structurales sont donc exposées à la surface du virion et sont impliquées dans différentes étapes du cycle viral, notamment la liaison aux récepteurs et à la pénétration dans les cellules cibles, l'assemblage des virions et leur sortie, mais aussi dans les interactions avec le système immunitaire de l'hôte (Hurrelbrink and McMinn, 2003). Les protéines non-structurales quant à elles s'associent et forment le complexe de réplication (RC) qui est impliqué dans la réplication de l'ARN viral. Ces protéines interviennent aussi dans le processus de clivage protéolytique après la traduction (Perera and Kuhn, 2008). La région non codante 5' est impliquée dans l'initiation de la traduction et la région 3' dans la synthèse de l'ARN viral, qui reposent sur des interactions ARN/ARN et ARN/protéine (Friebe and Harris, 2010; You *et al.*, 2001; You and Padmanabhan, 1999).

1.3.2. Cycle de réplication

La réplication du génome viral des *Flavivirus* nécessite l'entrée du virion à l'intérieur de la cellule hôte, que ce soit une cellule de vertébré ou d'arthropode (Figure 5). Plusieurs protéines ont été identifiées comme potentiels récepteurs ou corécepteurs. Ces récepteurs varient en fonction du type cellulaire ou de l'hôte (Mukhopadhyay *et al.*, 2005). Une des voies d'entrée mise en évidence est l'entrée du virion par endocytose, cette réaction étant possible par la liaison des récepteurs cellulaires au virus qui perd de sa mobilité au niveau d'une cavité préexistante recouverte de protéines de clathrine (Perera and Kuhn, 2008). Le virion entre ainsi dans la cellule par invagination de la membrane plasmique et donne naissance à une vésicule contenant le virus enrobé de clathrine appelé endosome. L'acidification du pH cellulaire va déclencher une série de réarrangements structuraux de l'endosome au niveau de la glycoprotéine E qui va amener à la fusion de l'enveloppe virale et de la membrane endosomale, ce processus va libérer la nucléocapside virale dans le cytoplasme de la cellule (Kuhn *et al.*, 2002; Modis *et al.*, 2003; Modis *et al.*, 2004; Mukhopadhyay *et al.*, 2005). La capsid est ensuite dégradée par les enzymes cellulaires du cytosol cellulaire et l'ARN viral est libéré dans le milieu. La machinerie cellulaire traduit immédiatement l'ARN viral en une unique polyprotéine qui est clivée par des protéases pour former les trois protéines structurales (la protéine E, pr/M et C) et les sept protéines non structurales (NS1 à NS5) (Lindenbach and Rice, 2003; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Rice, 1990). Une fois libérées et clivées, certaines protéines non-structurales vont s'associer à des protéines cellulaires pour former un complexe de réplication qui va permettre la copie de l'ARN viral génomique viral de sens positif (+) en un brin de sens négatif (-) pour servir de matrice pour l'amplification de l'ARN (Bollati *et al.*, 2010; Khadka *et al.*, 2011; Mukhopadhyay *et al.*, 2005; Perera and Kuhn, 2008). L'assemblage de l'ARN viral (+) et des protéines de capsides nouvellement produites se constitue ensuite à la surface cytosolique du réticulum endoplasmique par un bourgeonnement au travers de la membrane dans le lumen. Les particules virales immatures sont transportées par des voies de sécrétion dans le réseau trans-golgien (Welsch *et al.*, 2009), où elles mûrissent par acidification du pH afin de former le virion mature. Néanmoins la partie « pr » reste associée au virion pour empêcher une fusion membranaire prématurée (Yu *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2003). Les virus matures sont ensuite libérés de la cellule par exocytose dans le compartiment

extracellulaire (Mukhopadhyay *et al.*, 2005) et les peptides « pr » sont, sous l'effet du pH neutre, dissociés des particules virales, entraînant la fin de la maturation des virions qui deviennent infectieux (Yu *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2010).

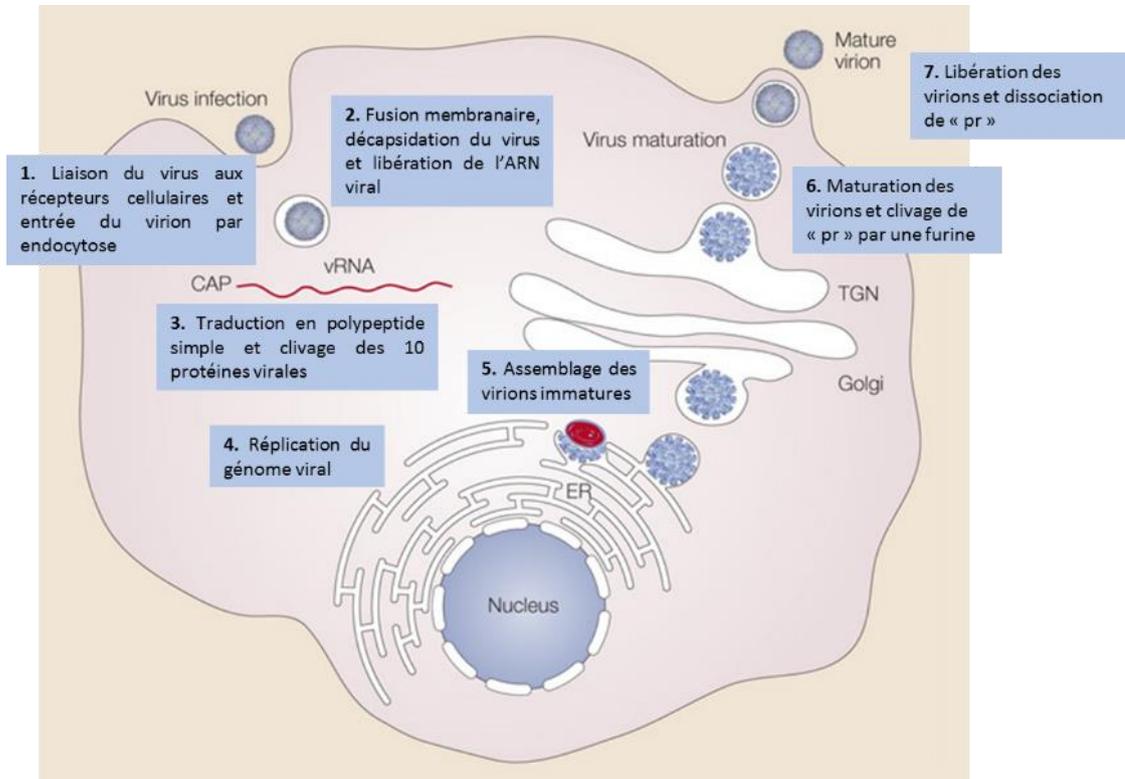


Figure 5. Réplication du virus de la dengue dans une cellule de mammifère. Adaptée de Mukhopadhyay *et al.*, 2005 et de la thèse de M. Aubry, 2012.

1.4. Le virus de la dengue

Le virus de la dengue (DENV) est un arbovirus de la famille des *Flaviviridae* et du genre *Flavivirus*. Ce virus existe sous 4 sérotypes (DENV-1 à DENV-4), ces sérotypes sont eux-mêmes sous-divisés en génotypes (Henchal and Putnak, 1990). Une infection causée par un des sérotypes entraîne une immunité spécifique et prolongée contre ce sérotype seulement (Gubler, 1998). La transmission à l'homme est principalement due aux moustiques du genre *Aedes* et en particulier *Aedes aegypti* (Gubler, 2002).

1.4.1. Phylogénie

Le DENV est classé en 4 sérotypes. Cette classification a été définie en premier lieu par la limitation des réactions croisées lors de tests sérologiques, puis confirmés par l'analyse des génomes par séquençage (Weaver and Vasilakis, 2009). L'analyse des quatre sérotypes du DENV a mis en évidence une différenciation supérieure à 30% de la séquence globale des acides aminés (Soo *et al.*, 2016). L'étude plus approfondie de ces 4 sérotypes viraux a permis de mettre en évidence l'existence de génotypes au sein de chaque sérotype. La différenciation de ces génotypes est définie par une divergence de plus de 6% du génome viral au niveau de la région E/NS1 (Figure 3) (Rico-Hesse, 1990). Pour la dengue, un génotype viral est souvent lié à l'origine géographique des isolat viraux (Rico-Hesse, 2003). L'étude des génomes viraux soulève aussi l'hypothèse que les 4 sérotypes de la dengue auraient une origine simienne et que le passage du virus d'un cycle selvatique à un cycle urbain aurait entraîné, par transmission inter-espèces, l'émergence de ces 4 sérotypes (Figure 6) (Gubler, 1998; Kuno *et al.*, 1998; Weaver and Vasilakis, 2009). Les études phylogénétiques suggèrent aussi une origine asiatique plutôt qu'africaine de la dengue, de par la position basale des souches selvatiques asiatiques par rapport à celles africaines (Rico-Hesse, 1990; Wang *et al.*, 2000; Weaver and Vasilakis, 2009).

Cependant une étude récente a démontré que les ressemblances antigéniques ne corrèlent pas forcément avec la classification en différents sérotypes du DENV. En effet, l'étude d'isolats viraux (différents sérotypes, différentes régions du monde et épidémies) et de leurs titres en anticorps neutralisants démontrait des ressemblances antigéniques entre des virus de sérotypes différents. Ces résultats sont d'une grande importance notamment dans le développement de vaccins (Katzelnick *et al.*, 2015).

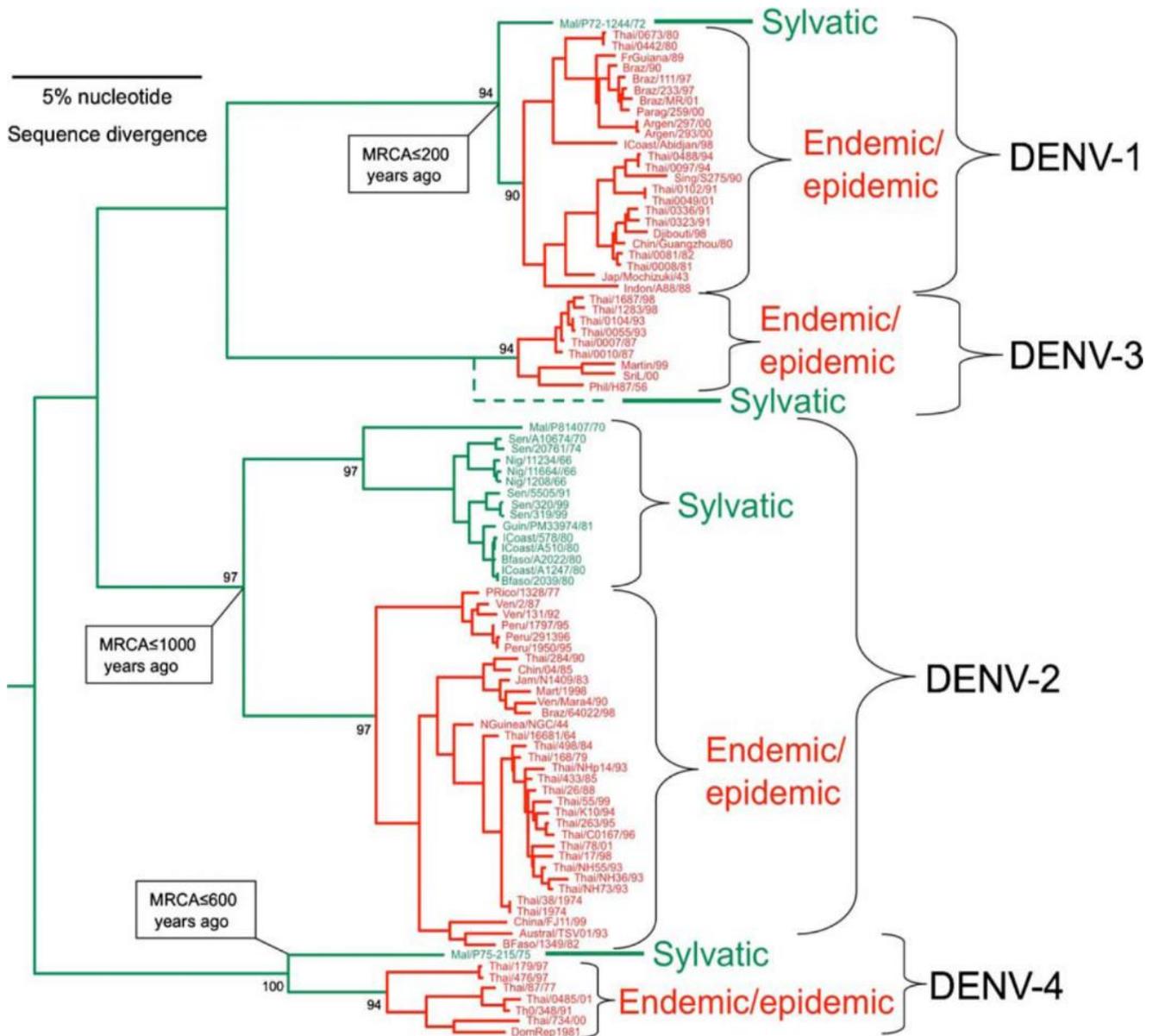


Figure 6. Arbre phylogénétique obtenue par analyse bayésienne des régions codantes de génome viraux de dengue. Les périodes approximatives de divergence sont indiquées dans les cadres à la base des nœuds. Weaver et Vasilakis, 2009

1.4.2. Symptômes de la dengue

Suite à la piqure infectante d'un moustique vecteur, la période d'incubation chez l'homme du DENV est de 2 à 7 jours. Il existe deux formes de dengue : la dengue classique et la dengue sévère selon la classification de l'OMS (OMS, 2013). La première se manifeste par une forte fièvre pouvant être accompagnée de maux de tête, de nausées, de douleurs articulaires et musculaires et d'une éruption cutanée (Figure 7). La forme sévère, qui

représente 1% des cas dans le monde, entraîne des fuites plasmatiques sévères, des hémorragies sévères et des atteintes organiques sévères (Figure 7). Cette forme sévère peut mener à une forme mortelle de la maladie qui est la dengue avec syndrome de choc (DSC) (Halstead, 1988; Martina *et al.*, 2009; OMS, 2013). Les enfants et en particulier ceux de moins de quinze ans peuvent développer un choc hypovolémique (entraînant un refroidissement, une moiteur de la peau et un pouls imperceptible indiquant une défaillance circulatoire) et des douleurs abdominales pouvant provoquer la mort.



Figure 7. Classification des cas de dengue. OMS, 2013

L'infection par un des sérotype confère au patient une immunité à vie contre ce sérotype mais pas contre les autres, il n'y a pas d'immunité croisée à long terme pour ce virus (Reich *et al.*, 2013). De plus il semble que la présence d'anticorps spécifiques à un sérotype favoriserait le développement des formes sévères de la dengue lors d'une infection secondaire par un autre sérotype, c'est l'hypothèse des anticorps facilitants ou ADE (Antibody Dependent Enhancement) (Halstead, 1979; Halstead and O'Rourke, 1977). La présence d'anticorps hétérologues, en concentration insuffisante pour neutraliser le nouveau sérotype viral, entraînerait la formation de complexe antigène/anticorps facilitant la pénétration des virus dans les cellules monocytaires (Zompi *et al.*, 2012).

1.5. Le virus Zika

Le virus Zika (ZIKAV) est un arbovirus de la famille des *Flaviviridae* et du genre *Flavivirus*. C'est un virus transmis principalement par les moustiques *Aedes*, *Ae. aegypti* étant le vecteur principal (Petersen *et al.*, 2016). La structure du ZIKAV semble être la même que celle des autres *Flavivirus*, avec une partie de la protéine structurale E plus proche de celle des virus West-Nile et de l'encéphalite japonaise qui sont des virus neurotropes, les autres *Flavivirus* étant plus proches du DENV pour cette protéine (Kostyuchenko *et al.*, 2016). Certaines études ont démontré que le ZIKAV par rapport au DENV est plus tolérant aux variations de température (jusqu'à 50°C) (Goo *et al.*, 2016; Kostyuchenko *et al.*, 2016; Müller *et al.*, 2016). Cette stabilité structurale est potentiellement une des raisons permettant d'expliquer la survie du virus dans le sperme, dans la salive ou dans l'urine (Kostyuchenko *et al.*, 2016). Ces échantillons biologiques non invasifs peuvent ainsi devenir des échantillons utilisables pour le diagnostic biologique (Barzon *et al.*, 2016; Gourinat *et al.*, 2015; MMWR, 2016a; MMWR, 2016b).

1.5.1. Phylogénie

Le ZIKAV est divisé en deux lignées génétiques distinctes: la lignée Africaine, sous-divisée en deux génotypes : l'est africain et l'ouest africain, et la lignée Asiatique (Figure 8) (Faye *et al.*, 2014; Lanciotti *et al.*, 2016). La divergence génétique entre ces lignées est très faible, moins de 12% au niveau nucléotidique (Haddow *et al.*, 2012). Cette faible divergence génétique est importante car cela suggère la possibilité que la réalisation d'un vaccin développé à partir d'une souche de ZIKAV serait efficace contre les autres souches (Petersen *et al.*, 2016).

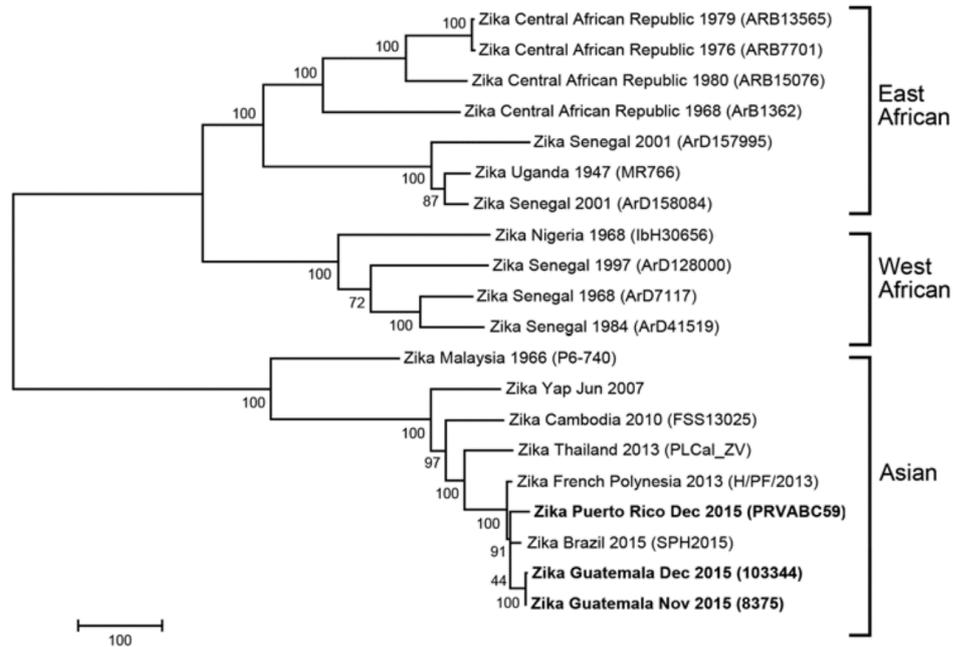


Figure 8. Arbre phylogénétique réalisé par la méthode du neighbor-joining sur les génomes complets de virus Zika. Lanciotti *et al.*, 2016

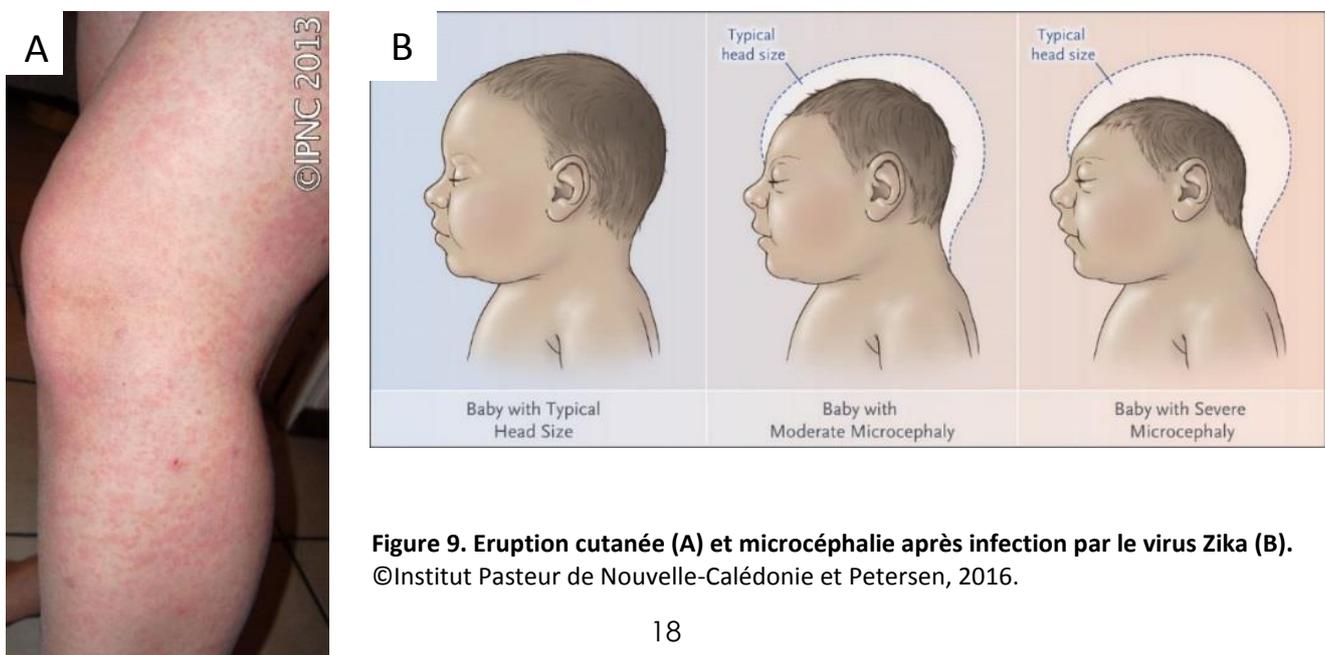
1.5.2. Symptômes

La période d'incubation du ZIKAV semble similaire à celle des autres *Flavivirus* soit approximativement une semaine suite à la piqure infectante d'un moustique. Dans la grande majorité des cas l'infection par le ZIKAV est asymptomatique. L'épidémie ayant touché l'Etat de Yap, en Micronésie en 2007, a démontré que seulement 20% des personnes infectées présentaient des symptômes attribuables à une infection par le ZIKAV (Duffy *et al.*, 2009). En Polynésie Française, après l'épidémie de 2013-2014, des études de séroprévalence ont montré un taux de cas asymptomatiques de 43% (Aubry *et al.*, 2017b). Et en Martinique, la proportion de cas asymptomatiques a été estimée à 45% lors de l'épidémie de 2015 (Gallian *et al.*). Ces résultats confirmant que la moitié ou plus des personnes infectées ne présentent pas de symptômes après infection avec cet arbovirus. Les symptômes provoqués par une infection à ce virus sont semblables à ceux de la dengue : fièvre (modérée), maux de tête, douleurs musculaires et articulaires (Tableau 1). L'infection au ZIKAV est aussi souvent accompagnée d'une éruption cutanée (Figure 9a) mais aussi de conjonctivite et de troubles digestifs (Duffy *et al.*, 2009; Petersen *et al.*, 2016).

Tableau 1. Tableau des symptômes cliniques de trois arbovirus. Adapté de Halstead *et al.*, 1988 et d'une brochure du Département de la santé de l'Etat de Yap

Symptômes	Dengue	Chikungunya	Zika
Fièvre	+++	+++	+++
Douleurs articulaires et musculaires	+++	++++	++
Eruption cutanée	++	++	+++
Douleurs rétro-orbitaires	++	+	++
Conjonctivite	0	+	+++
Adénopathie	++	++	+
Hépatomégalie	0	+++	0
Leucopénie/Thrombopénie	+++	+++	0
Hémorragie	+	0	0

L'épidémie mondiale de 2013-2016 a pour la première fois mis en évidence des complications graves potentiellement liées à une infection par le ZIKAV. Ces complications d'ordre neurologique, ont été décrites principalement dans la région Pacifique et sud-américaine. Ainsi des complications chez l'adulte de type de syndrome de Guillain-Barré ont été mises en évidence, entraînant une paralysie progressive pouvant atteindre les muscles respiratoires (Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Igor *et al.*, 2016; Molko *et al.*, 2017; Oehler *et al.*, 2014). D'autres études ont également démontré un risque de microcéphalie fœtale, qui entraîne de graves anomalies du développement cérébrale chez le fœtus. Ce risque semble plus élevé si la mère est infectée par le virus lors du premier trimestre de la grossesse (Figure 9b) (Cauchemez *et al.*, 2016; Igor *et al.*, 2016; Schuler-Faccini *et al.*, 2016).



1.6. Traitements et vaccins

A l'heure actuelle, il n'existe aucun traitement spécifique contre le DENV ou contre le ZIKAV. Néanmoins il semble qu'une prise en charge adaptée de la dengue puisse ramener le taux de mortalité de 20 à 1% dans le cas de formes sévères en maintenant les volumes liquidiens du patient (OMS, 2013).

Un vaccin a été développé contre le DENV (Dengvaxia®, Sanofi Pasteur) et son utilisation a été enregistrée dans plusieurs pays, notamment au Mexique, aux Philippines, au Brésil et au Salvador, en vue d'une utilisation chez des personnes âgées de 9 à 45 ans et vivant dans des zones où le virus circule de façon endémique. Son efficacité reste cependant variable, de 45 à 66%, en fonction de la tranche d'âge et en fonction des sérotypes du DENV (58% pour la DENV-1, 47% pour la DENV-2, 74% pour la DENV-3 et 83% pour la DENV-4 chez le patient de plus de 9 ans) (Hadinegoro *et al.*, 2015). D'autres vaccins tétravalents vivants atténués sont en cours de développement (phase III des essais cliniques) et d'autres vaccins candidats sont à des stades plus précoces de la mise au point (source OMS).

Il n'existe pour le moment aucun vaccin contre le ZIKAV mais des études sont en cours pour en développer. Une première approche, qui consiste à injecter une faible dose d'ARN messager modifié, a démontré une efficacité de 100% chez 19 souris et 5 macaques testés et sans apparition d'effets secondaires (Pardi *et al.*, 2017). Mais ce vaccin n'est qu'au début des tests cliniques et nécessitera encore du temps avant d'être testé sur la population des zones où le ZIKAV circule. Une deuxième approche a démontré que l'utilisation de particules « Zika virus-like » (VLPs), avec une co-expression des protéines structurales (CprME) et non structurales (NS2B/NS3), semble être une bonne alternative pour la production de ce vaccin (Boigard *et al.*, 2017). D'autres études sont en cours, notamment pour l'utilisation de protéines recombinantes de ZIKAV, afin d'identifier les candidats efficaces pour l'élaboration de vaccins. La mise au point d'un vaccin contre le ZIKAV semble encore longue et selon l'OMS aucun vaccin ne sera disponible avant 2020.

En l'absence de traitements et de vaccins efficaces, le seul moyen de lutte contre le DENV et le ZIKAV reste la prévention et la lutte anti-vectorielle.

Chapitre 2 : Epidémiologie des arbovirus



Chapitre 2 : Epidémiologie des arbovirus

2.1. Epidémiologie mondiale des arbovirus

L'intensification des échanges mondiaux, qu'ils soient dus au tourisme ou au commerce, a considérablement modifié l'aire de répartition des arbovirus (Figure 10). Les récentes épidémies liées aux virus du chikungunya et du Zika ont mis en évidence la possible émergence de ces arboviroses dans les îles tropicales telle que l'île de Réunion ou la Polynésie Française (Cao-Lormeau, 2016; Petersen *et al.*, 2016; Weaver, 2014) et leur diffusion par la suite à l'échelle mondiale. Dans ce chapitre, nous nous intéresserons principalement aux épidémies liées au virus de la dengue et du Zika.

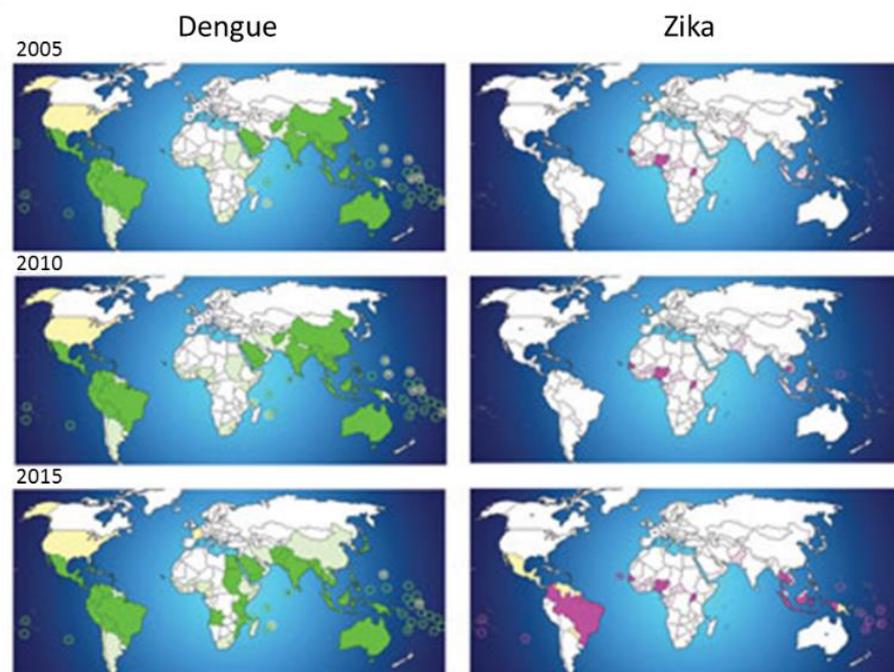


Figure 10. Circulation des virus de la dengue et du Zika entre 2005 et 2015. Adaptée de Cao-Lormeau, 2016.

La dengue est l'arbovirose la plus répandue dans le monde. Les premières épidémies liées à ce virus ont été reportées entre 1779 et 1780 en Asie, Afrique et Amérique (Gubler and Clark, 1995). L'épidémiologie de la dengue a ensuite changé, notamment lors de la seconde guerre mondiale, pendant laquelle les déplacements des troupes américaines et japonaises ont entraîné une diffusion des virus dans de nouvelles zones géographiques. L'augmentation des mouvements de population d'après-guerre a aussi été un facteur favorisant la circulation des quatre sérotypes du DENV dans la zone intertropicale (Gubler, 1997; Gubler, 1998).

L'augmentation du nombre d'épidémie liée à ce virus, en particulier dans le sud-est de l'Asie, a provoqué l'émergence de formes plus sévère de la maladie dont la DSC. La première épidémie connue de DH a été observée à Manille (Philippines) en 1953-54 puis à Bangkok en 1958 (Halstead, 1980; Hammon *et al.*, 1960). Depuis le DENV n'a cessé de circuler en Asie, dans la région Pacifique, en Afrique ou encore en Amérique (Bhatt *et al.*, 2013). Des études de prévalence de la dengue estiment que plus de 390 millions de personnes dans 128 pays sont exposées à ce virus (Bhatt *et al.*, 2013; Brady *et al.*, 2012). Chaque année, plus de 500 000 personnes, surtout des enfants, sont atteintes de dengue sévère, nécessitant une hospitalisation et environ 2,5% des patients décèdent suite à l'infection (source OMS, 2017).

Le ZIKAV a été isolé pour la première fois en Ouganda chez des singes dans la forêt Zika en 1947 (Dick, 1952; Dick *et al.*, 1952). Après une circulation sporadique du virus en Afrique et en Asie, la première grande épidémie est notifiée sur l'île de Yap en Micronésie en 2007. Lors de cette épidémie plus de 5 000 personnes seront infectées par le virus, sur une population d'environ 6 700 individus (Duffy *et al.*, 2009). Il faut attendre 2013 pour que le virus soit à nouveau à l'origine d'une épidémie en Polynésie Française (Cao-Lormeau *et al.*, 2014b). Le ZIKAV va ensuite se propager à toute la région Pacifique, notamment en Nouvelle-Calédonie en 2013 (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015; Gourinat *et al.*, 2015), aux îles Cook, Vanuatu, Fidji, Samoa, Salomon en 2014 et à Tonga en 2016 (Kindhauser *et al.*, 2016; Petersen *et al.*, 2016). Les premiers cas en Amérique du Sud sont détectés en mars 2015 au Brésil (Gubio *et al.*, 2015) avant de se propager à plus de 48 pays et territoires d'Amérique (Etienne *et al.*, 2017). Le ministère de la santé au Brésil estime en décembre 2015 que plus de 1,3 millions de personnes ont pu être infectées par le ZIKAV (Hennessey *et al.*, 2016) et plus de 4300 cas de microcéphalies ont été enregistrés au Brésil sur la même période (PAHO/WHO, 2017; Victora *et al.*, 2016).

2.2. Epidémiologie dans la région Pacifique

La région Pacifique n'est pas épargnée par les épidémies liées aux arbovirus, les premières épidémies dues au virus de la dengue étant enregistrées dès la fin du 19^{ème} siècle (Perry, 1950). Des épidémies, dues aux différents sérotypes de la dengue ont ensuite été régulièrement observées depuis la deuxième guerre mondiale. La survenue des épidémies suivait un modèle

sporadique, sans endémisme, avec un cycle de 3 à 5 ans entre chaque épidémie. (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2014; Roth A, 2014; Singh *et al.*, 2005). Lors des épidémies un seul sérotype du DENV circulait et l'introduction d'un nouveau sérotype, venant d'une région endémique comme par exemple l'Asie du Sud-Est, remplaçait le virus circulant (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2014).

Depuis le début des années 2000, le sérotype 1 du DENV est le sérotype majoritaire. Mais depuis cinq ans le profil épidémique est en évolution dans le Pacifique et la circulation des arbovirus s'est intensifiée avec la co-circulation de plusieurs sérotypes du DENV avec généralement une introduction d'un virus circulant en Asie et l'introduction des virus du chikungunya et du Zika (Figure 11) (Aubry *et al.*, 2012; Cao-Lormeau and Musso, 2014; Chungue E, 1998; Li *et al.*, 2010). Ainsi en 2012, le sérotype 2 a été détecté notamment à Tuvalu, Fidji, Vanuatu, Samoa Américaine, Nouvelle-Calédonie après plus de 15 ans sans avoir circulé dans la région Pacifique. Le sérotype DENV-3 a de nouveau été détecté en 2012 notamment à Fidji où plus de 25 000 cas ont été suspectés et plus de 15 décès enregistrés. Aux îles Salomon, c'est plus de 6 000 cas et 7 décès qui ont été observés suite à l'épidémie de DENV-3 de 2013. Ce sérotype a ensuite circulé dans l'ensemble du Pacifique, notamment en Polynésie Française et en Nouvelle-Calédonie. Les épidémies de DENV-4 restent quant à elle encore rares dans cette région du monde (Aubry *et al.*, 2012; Aubry *et al.*, 2017c; Cao-Lormeau and Musso, 2014; Cao-Lormeau *et al.*, 2011; Cao-Lormeau *et al.*, 2014a; Roth *et al.*, 2014). Depuis 2016, la co-circulation des sérotypes 1, 2 et 3 du DENV est enregistrée dans la région Pacifique (source CPS).

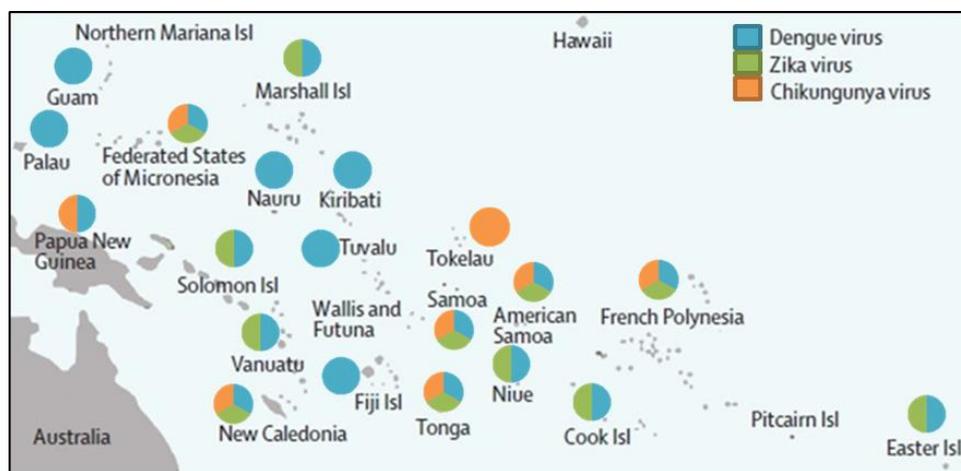


Figure 11. Circulation des arbovirus dans la région Pacifique entre 2007 et 2016. Adaptée de Cao-Lormeau, 2014.

La première épidémie due au virus de la Ross River a eu lieu entre 1979 et 1980 dans la région Pacifique (Nouvelle-Calédonie, Fidji, Wallis et Futuna, Vanuatu, îles Cook, Samoa Américaines) et près de 500 000 personnes ont été infectées. Cette épidémie serait due à l'émergence d'un seul variant viral provenant d'Australie (Aaskov *et al.*, 1981; Faragher *et al.*, 1985; Harley *et al.*, 2001). Cette épidémie n'avait pas semblé avoir touché la Polynésie Française à l'époque, hors des études de séroprévalence récentes semblent indiquer que le virus a déjà circulé dans l'archipel dès 1980 (Aubry *et al.*, 2017a). De plus des retours de voyageurs provenant de Fidji infectés par le virus de la Ross River dans les années 2000, semblent indiquer, tout comme en Polynésie Française, une circulation silencieuse de ce virus dans la région Pacifique (Aubry *et al.*, 2015; Klapsing *et al.*, 2005).

Le CHIKV est pour la première fois détecté dans la région Pacifique en Nouvelle-Calédonie en 2011 (Alibert *et al.*, 2011). Depuis la moitié des îles du Pacifique ont été touchées par des épidémies dues au CHIKV. Des épidémies ont été décrites en Papouasie Nouvelle-Guinée en 2012, en Nouvelle-Calédonie et à Yap en Micronésie en 2013 (Roth *et al.*, 2014). Entre 2014 et 2015 une épidémie majeure a touché la région Pacifique et plus particulièrement les îles Tonga, les Samoa Américaines, les Samoa, Tokelau, la Polynésie Française, les îles Cook, les Kiribati, les îles Marshall (Source CPS).

La première épidémie de Zika dans la région Pacifique a eu lieu à Yap en 2007, puis le virus a réémergé en 2013 en Polynésie Française. Cette nouvelle épidémie, comme la précédente, était due à la lignée asiatique du virus Zika (Cao-Lormeau *et al.*, 2014b; Duffy *et al.*, 2009). Lors de l'épidémie en Polynésie Française plus de 30 000 cas suspects ont été détectés par le réseau de surveillance (Roth *et al.*, 2014) et des études de séroprévalence ont montré qu'à la fin de l'épidémie 66% de la population avait été infectée par le ZIKAV (Aubry *et al.*, 2017b). Lors de cette épidémie en Polynésie Française, 42 cas de syndrome de Guillain-Barré et 8 cas de microcéphalie ont été observés (Cao-Lormeau *et al.*, 2016; Cauchemez *et al.*, 2016). Le virus a ensuite rapidement disséminé à l'ensemble de la région Pacifique entre 2013 et 2015 (Cao-Lormeau and Musso, 2014; Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015; Kindhauser *et al.*, 2016).

2.3. Epidémiologie en Nouvelle-Calédonie

La première épidémie connue de dengue en Nouvelle-Calédonie a eu lieu dans les années 1880 (Perry, 1950) et depuis, comme dans la région Pacifique, des épidémies successives dues aux quatre sérotypes de la dengue ont été recensées. En 2011 et 2013 des introductions et circulations de chikungunya ont été décrites et l'étude phylogénétique des virus a démontré une appartenance à la lignée asiatique (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2012; Roth A, 2014). En 2014, pour la première fois une circulation autochtone du ZIKAV a été détectée en Nouvelle-Calédonie. Entre 1995 et 2017, ce sont 14 épidémies dues aux arbovirus qui ont été enregistrées sur le territoire calédonien (Figure 12).

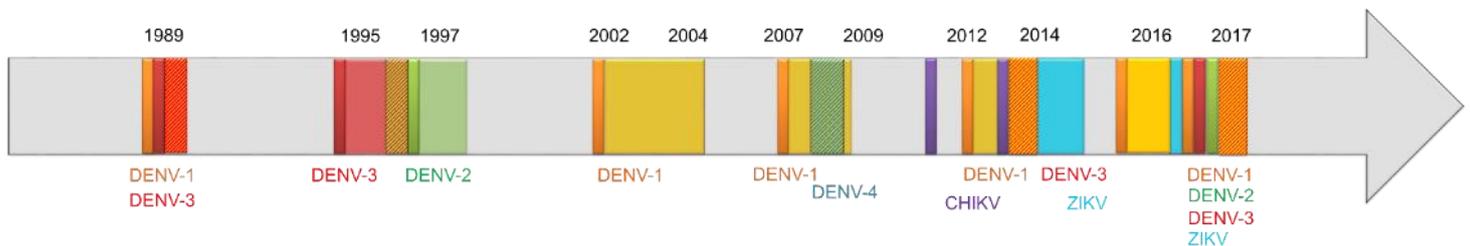


Figure 12. Epidémies dues aux arbovirus en Nouvelle-Calédonie entre 1995 et 2017. Source DASS-NC et Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.

Le DENV est l'arbovirus ayant le plus circulé en Nouvelle-Calédonie et depuis 1995 les quatre sérotypes ont circulé sur le territoire. Les épidémies sont généralement espacées de 3 à 4 ans, (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2005). Les épidémies de dengue présentent habituellement le même profil, une circulation sur deux années successives avec deux pics pendant la période chaude et humide. Les plus importantes épidémies ont eu lieu: en 2003-2004, avec la DENV-1 et plus de 3 000 cas confirmés ou probables et 19 décès, en 2008-2009, avec la circulation de la DENV-1 et DENV-4 durant laquelle plus de 8 000 cas sont enregistrés ainsi que 5 décès et en 2012-2013 avec à nouveau la DENV-1 et plus de 10 000 cas confirmés ou probables et 5 décès (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2014). Actuellement, l'épidémie de dengue est causée par la circulation de trois sérotypes de dengue (DENV-1, DENV-2 et DENV-3), avec plus de 4 400 cas suspects et confirmés, plus de 570 cas de dengue hospitalisés et 11 patients décédés au 8 octobre 2017 (source DASS-NC).

Concernant le CHIKV, il n'y a pas eu d'épidémie majeure en Nouvelle-Calédonie. Des introductions ont eu lieu en 2011 et 2013-2014 avec à chaque fois une trentaine de cas autochtones détectés. L'introduction du virus est dans les deux cas due à un retour de voyage

d'Asie du Sud-Est (Indonésie) (Alibert *et al.*, 2011; Roth A, 2014). Pour le virus Ross-River, la seule circulation documentée est celle de l'épidémie de 1980 qui a touché une grande partie du Pacifique (Faragher *et al.*, 1985).

En novembre 2013, les premiers cas importés de Zika de Polynésie Française ont été confirmés en Nouvelle-Calédonie, le premier cas autochtone a été détecté en janvier 2014 (Annexe 2) (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2015). Entre 2014 et 2015, plus de 1500 cas de Zika ont été confirmés biologiquement. En 2017, il y a eu une circulation à bas bruit de virus Zika en Nouvelle-Calédonie et 38 cas de personnes infectées par le virus ont été confirmés biologiquement depuis le 1^{er} janvier 2017 (source DASS-NC et CPS).

En Nouvelle-Calédonie, les autorités de santé ont mis en place depuis près de 50 ans une surveillance des cas d'arboviroses. Cette surveillance maintenue au cours du temps, nous permet de suivre l'évolution du profil épidémiologique avec une co-circulation de trois sérotypes de dengue (DENV-1, DENV-2 et DENV-3) et du virus Zika depuis le début de l'année 2017 (source DASS-NC, CPS et IPNC).

Chapitre 3 : Les moustiques vecteurs d'arbovirus



© Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie

Chapitre 3 : Les moustiques vecteurs

3.1. Biologie des moustiques

Les moustiques sont des arthropodes hématophages de la classe des insectes, de l'ordre des diptères, et de la famille des *Culicidae*. Ce sont des insectes solénophages, ce qui signifie que leurs pièces buccales sont longues et fines, provoquant des lésions minimales et permettant un repérage du capillaire sanguin et l'aspiration du sang directement dans le capillaire (Duvallet *et al.*, 2017). D'après la classification historique, la sous-famille *Culicinae* inclut 42 genres dont deux, les genres *Culex* et *Aedes*, sont connus pour compter plusieurs espèces vectrices d'arbovirus. Le genre *Culex* comprend des moustiques vecteurs de certains d'arbovirus, tel que le virus West-Nile ou le virus de l'encéphalite japonaise. Le genre *Aedes*, et en particulier le sous-genre *Stegomyia*, comprend des espèces notamment impliquées dans la transmission d'arbovirus tels que le virus de la dengue, du chikungunya, du Zika ou encore de la fièvre jaune (Duvallet *et al.*, 2017; Gubler, 2002; Weber *et al.*, 2017). Les principales espèces vectrices du sous-genre *Stegomyia* sont *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus*, qui sont toutes les deux des espèces anthropophiles. Ces moustiques du sous-genre *Stegomyia* se caractérisent au stade adulte par leur couleur noire, la présence d'anneaux blancs sur les tarsomères et des écailles blanches formant un dessin au niveau du scutum. Dans la région Pacifique dans le sous-genre *Stegomyia*, ces écailles permettent de facilement différencier *Ae. aegypti* des *Aedes* du groupe *Scutellaris*, tel qu'*Ae. albopictus* ou *Aedes polynesiensis* (Figure 13).

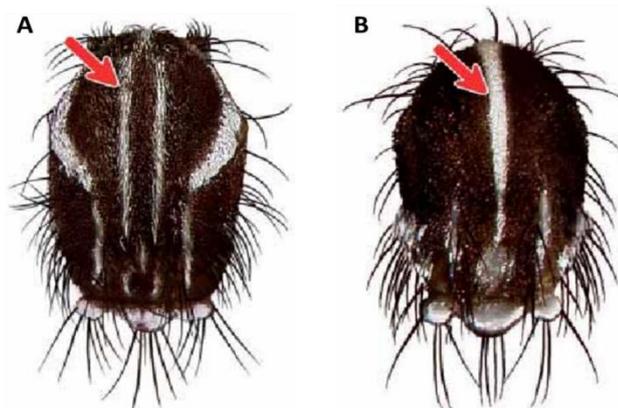


Figure 13. Scutum d'adulte *Aedes aegypti* (A) et *Aedes albopictus* (B). Adaptée de Rueda, 2004.

Le cycle de vie des moustiques comporte une vie aquatique dite préimaginale (larves et nymphes) et une phase aérienne dite imaginale (adultes) (Figure 14). Les femelles *Aedes* sont généralement inséminées par un seul mâle, mais des études semblent néanmoins démontrer que l'insémination multiple des femelles est possible notamment chez *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti* (Boyer et al., 2012; Helinski et al., 2012). Une fois fécondées, les femelles stockent les spermatozoïdes dans leurs spermathèques pour toute leur vie. Après environ 3 jours d'ovogénèse, les femelles vont pondre leurs œufs au-dessus de la surface de l'eau sur un support solide. Ces œufs sont bruns, d'environ 0,5 mm, sans flotteur. Ils sont dits « quiescents » car ils résistent à la dessiccation pendant plusieurs mois grâce à un chorion imperméable à base de chitine (Rezende *et al.*, 2008; Russell *et al.*, 2001). Après un ou deux jours dans l'eau, les œufs éclosent donnant des larves aquatiques. Ces larves sont microphages et se nourrissent de petites particules dans l'eau grâce à des pièces buccales de type broyeur (Figure 15A). Le développement larvaire est composé de quatre stades (L1 à L4) séparés de mues permettant l'augmentation de la taille de la larve à chacun des stades, passant ainsi de 1 mm en L1 à 1 cm au stade L4. Ces larves possèdent un siphon respiratoire bien visible situé à l'extrémité de l'abdomen. Ce siphon permet aux larves de respirer en se positionnant à la surface de l'eau. Les conditions environnementales jouent un rôle important dans le développement larvaire. C'est le cas de la température, de la disponibilité en

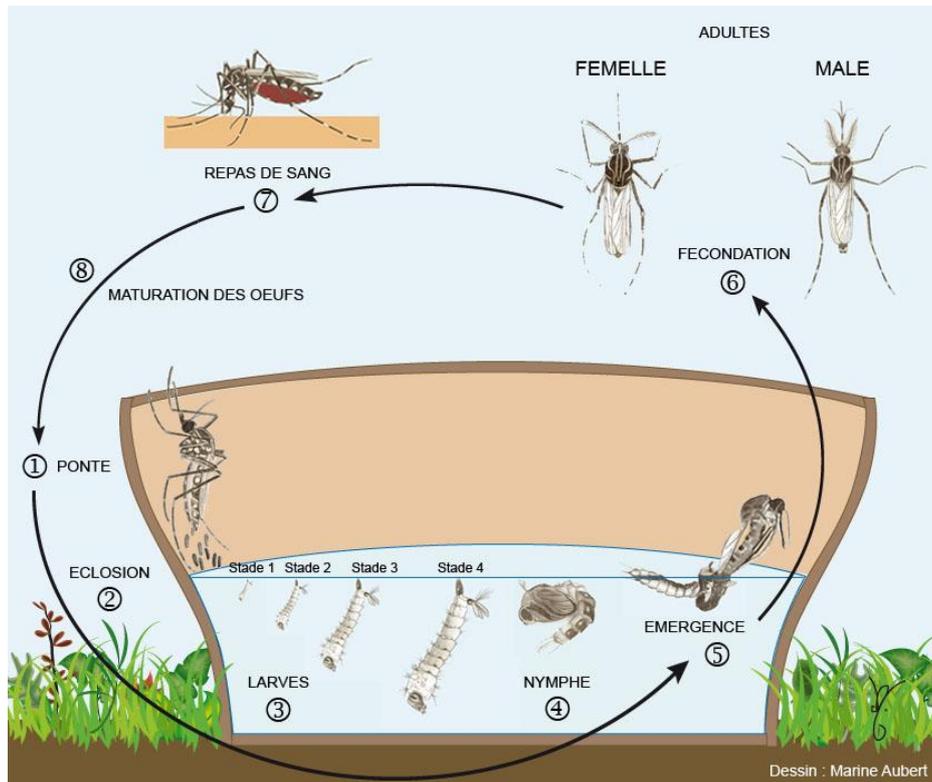


Figure 14. Cycle de développement du moustique.

nutriments ou encore de la prédation (Ho *et al.*, 1989; Tun-Lin *et al.*, 2000). La larve de stade 4 va muer pour aboutir au stade nymphal qui dure entre 1 et 3 jours. Pendant ce stade la nymphe ne se nourrit pas et respire grâce à deux trompettes respiratoires (Figure 15B). Contrairement à la larve, qui a une forme allongée, la nymphe est recourbée en forme de virgule (Duvallet *et al.*, 2017). C'est lors de ce stade nymphal qu'une métamorphose appelée nymphose va permettre au moustique de passer du mode aquatique au mode aérien lors de l'émergence. Ce sont généralement les mâles qui émergent en premier. L'adulte peut mesurer de 5 à 20 mm et possède un corps constitué d'une tête, d'un thorax, d'un abdomen et de 3 paires de pattes (Figure 15C). C'est au niveau de la tête que l'on retrouve le proboscis, permettant la pique et la succion lors des repas, mais aussi les organes sensoriels comme les yeux composés et les antennes. Ces antennes sont plus longues et plumeuses chez le mâle que chez la femelle. Le thorax est composé de trois parties (pro, méso et métathorax) portant chacune une paire de pattes. Le mésothorax possède aussi une paire d'ailes membraneuses et le métathorax une paire d'haltères (ailes atrophiées) qui assurent la stabilité du moustique lors du vol. Le thorax contient les glandes salivaires qui sont trilobées et qui sécrètent de la salive tout au long de la pique par la femelle moustique. L'abdomen est quand-à-lui constitué de segments abdominaux et des appendices génitaux. L'anatomie interne est caractérisée par un appareil digestif qui occupe la majorité de la cavité interne du moustique. L'appareil digestif est composé de trois parties et notamment de l'intestin moyen qui contient le repas sanguin ou les sucres ingérés. Le repas sera contenu ensuite dans une enveloppe péritrophique semi-perméable, sécrétée par l'épithélium stomacale, dans laquelle sera effectuée la digestion.

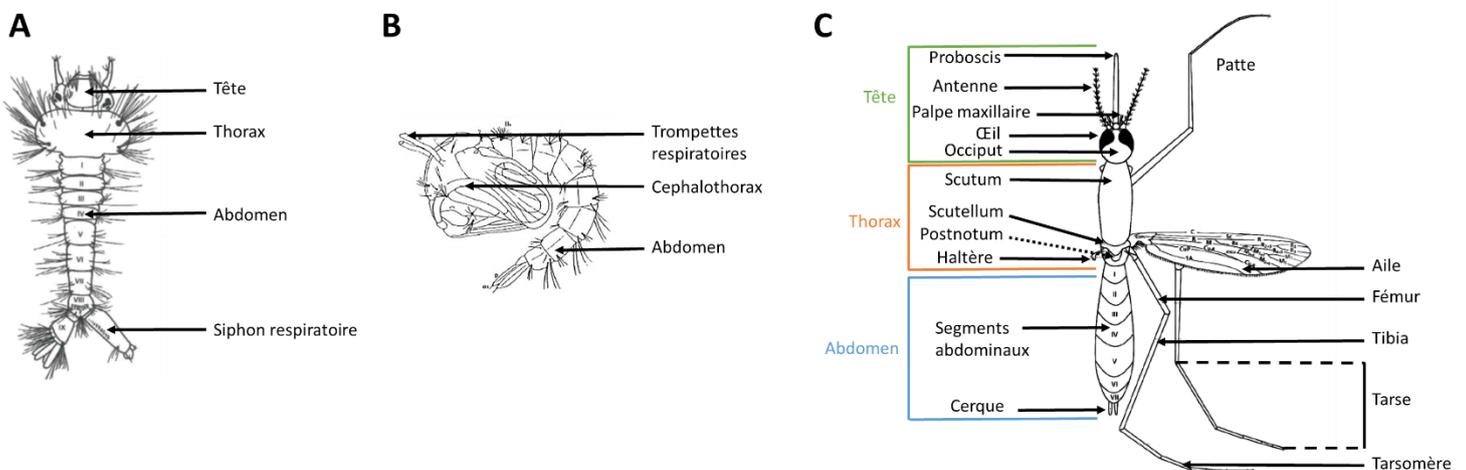


Figure 15. Morphologie du moustique au stade de la larve (A), de la nymphe (B) et de l'adulte (C).

Contrairement aux femelles, les mâles ne sont pas hématophages et se nourrissent exclusivement de liquides sucrés (sève d'arbre, nectar de fleur, ...). L'espérance de vie des mâles est généralement plus courte que celle des femelles, leur rôle étant essentiellement l'accouplement avec les femelles (Duvallet *et al.*, 2017). Les femelles peuvent aussi se nourrir de liquides sucrés, mais à chaque cycle gonotrophique, qui correspond à la succession des phénomènes physiologiques se produisant entre deux repas sanguins successifs (entre 2 à 5 jours), elles doivent prendre un repas sanguin sur un hôte vertébré afin d'assurer la maturation des œufs par un apport de protéines suite à leur fécondation. Ce repas sanguin peut être fractionné et la femelle effectue plusieurs repas et plusieurs pontes au cours de sa vie. Au moment de la pique nécessaire au repas sanguin, la femelle va injecter des molécules anti-hémostatiques à l'hôte par le biais de sa salive. Ces molécules biochimiques vont empêcher l'agrégation plaquettaire, la vasoconstriction et la coagulation (Fontaine *et al.*, 2011; James, 1994). Les femelles ont une espérance de vie moyenne de quelques semaines à plusieurs mois en laboratoire (Duvallet *et al.*, 2017).

3.2. Bio-écologie d'*Aedes aegypti*, vecteur majeur d'arbovirus

Ae. aegypti (Linnaeus, 1792) est une espèce de moustique originaire d'Afrique. C'est actuellement le vecteur majeur des virus de la dengue, du chikungunya, du Zika ou encore de la fièvre jaune (Failloux *et al.*, 2002; Gubler, 1998; Guillaumot, 2005).

Deux formes de ce vecteur existent, les différences étant basées sur des critères morphologiques et éco-éthologiques. Une forme ancestrale *Ae. aegypti formosus* observée en Afrique tropicale, de couleur plus sombre (Figure 16), aux préférences trophiques diverses (homme et animaux) et qui peut vivre en milieu urbain (développement des larves dans des gîtes artificiels) ou en milieu forestier (développement des larves dans des gîtes naturels). *Ae. aegypti aegypti* est la forme cosmopolitique, de couleur plus claire (Figure 16), hautement anthropophile, qui vit en milieu urbain, où ses larves se développent préférentiellement dans des gîtes artificiels tel que des pneus, des sous-pots ou des récipients de collecte d'eau de pluie (Duvallet *et al.*, 2017; Guillaumot, 2005). L'évolution de la forme *Ae. ae. formosus* en *Ae. ae. aegypti* est peu connue mais des études suggèrent que ce vecteur se serait différencier au

contact de l'homme lors de sa migration du centre vers le nord de l'Afrique (Failloux *et al.*, 2002). Dans la région Pacifique, c'est la forme *Ae. ae. aegypti* qui est présente, de ce fait uniquement cette forme sera présentée dans le reste de ce manuscrit.

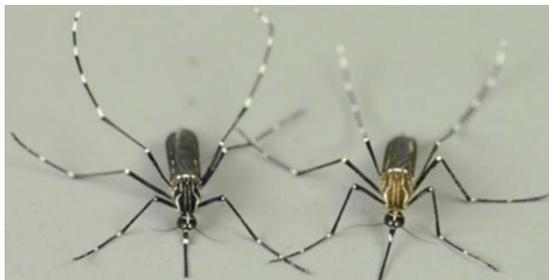


Figure 16. *Aedes aegypti formosus* (à gauche) et *Aedes aegypti aegypti* (à droite). Photo de Carolyn McBride.

Ae. aegypti est un moustique diurne. Les femelles piquent préférentiellement en journée et plutôt en début de matinée et le soir au crépuscule. Ce moustique étant inféodé à l'homme, l'urbanisation incontrôlée, les habitudes liées au stockage de l'eau et le manque d'infrastructures sanitaires peuvent expliquer l'abondance de ce vecteur dans les zones intertropicales en voie de développement. Les facteurs abiotiques tel que la température, l'humidité, ou la photopériode sont aussi à prendre en compte dans la prolifération et la dispersion d'*Ae. aegypti*. Il a été démontré que les formes préimaginales de cette espèce peuvent résister à des températures positives extrêmes (supérieures à 40°C), mais contrairement à *Ae. albopictus*, ces formes ne peuvent résister aux températures négatives, ce qui explique que cette espèce reste essentiellement en zone tropicale et intertropicale (Duvallet *et al.*, 2017). Ces caractéristiques bio écologiques peuvent en partie expliquer la répartition du vecteur *Ae. aegypti* à travers le monde.

3.3. Distribution géographique du vecteur *Aedes aegypti*

3.3.1. Distribution mondiale

La migration d'*Ae. aegypti* est principalement liée aux vagues de migration humaine (Lounibos, 2002). Une première vague d'expansion de ce vecteur a été observée vers le Nouveau Monde dès le XV^{ème} siècle suite à l'augmentation des échanges maritimes et à la traite des esclaves (Tabachnick, 1991). La deuxième vague a eu lieu vers l'Asie au XVIII^{ème} siècle, toujours en lien avec l'augmentation des échanges commerciaux. Ensuite son

expansion a continué et *Ae. aegypti* a été détecté dans la région Pacifique dès la fin du XIXème siècle en lien avec la colonisation de la région (Guillaumot, 2005). *Ae. aegypti* a été décrit dans le bassin méditerranéen au début du XXème siècle (Brown *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2011). Le vecteur aurait néanmoins disparu de ce dernier dans les années 1950-1960 grâce à l'épandage de DDT (Dichloro-Diphenyl-Trichloroethane) utilisé pour la lutte contre le paludisme (Gubler, 1998) avant d'être à nouveau réintroduit sur l'île de Madère et dans le Sud-Est de la Russie et de la Géorgie (Medlock *et al.*, 2015). A l'heure actuelle, même si les échanges commerciaux et touristiques augmentent, la répartition géographique d'*Ae. aegypti* est concentrée dans les zones tropicales et intertropicales, la température restant un paramètre important limitant l'expansion de ce vecteur à d'autres régions du monde (Figure 17) (Kraemer *et al.*, 2015).

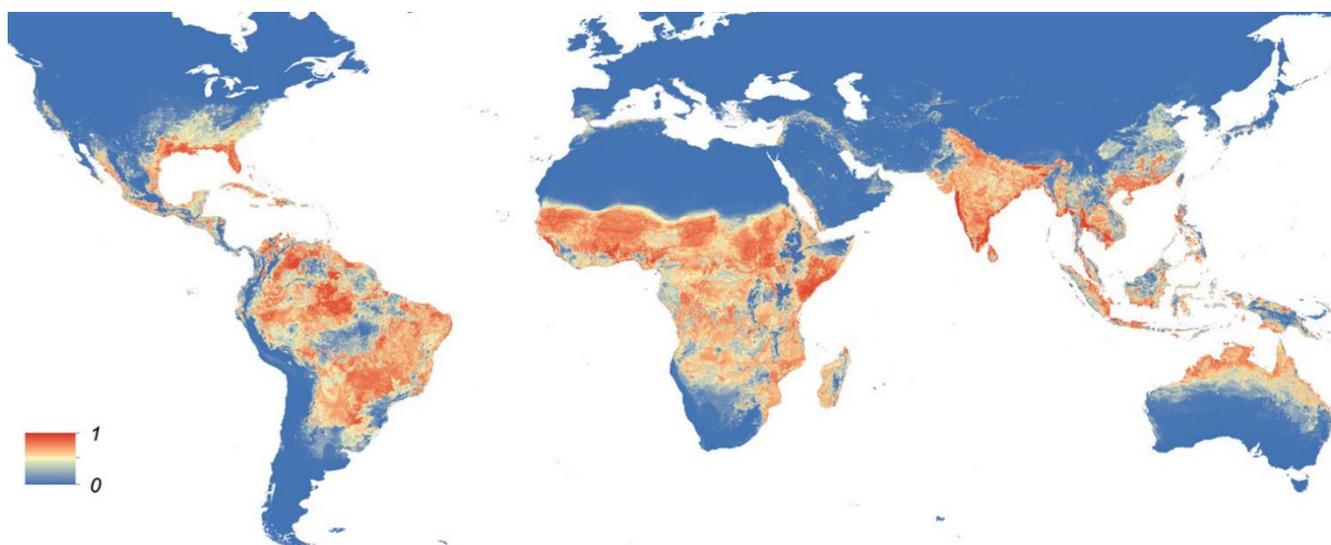


Figure 17. Prédiction de la distribution mondiale d'*Aedes aegypti*. La probabilité de la présence est représentée par une échelle de 0 (bleu) à 1 (rouge). Kramer *et al.*, 2015

3.3.2. Distribution dans le Pacifique

A l'échelle du Pacifique, *Ae. aegypti* est aussi le vecteur majeur d'arbovirus, il est présent dans une grande partie de la région, à l'exception de Futuna et de quelques îles isolées. D'autres vecteurs secondaires sont répertoriés tel qu'*Ae. albopictus*, en provenance d'Asie et qui diffuse dans l'Ouest de la région, *Ae. polynesiensis* présent dans la partie Est et d'autres espèces vectrices plus isolées telles qu'*Aedes hensilli* et une dizaine d'autres espèces d'*Aedes* présentes plus localement dans la région (Figure 18) (Guillaumot, 2005; Roth *et al.*, 2014).

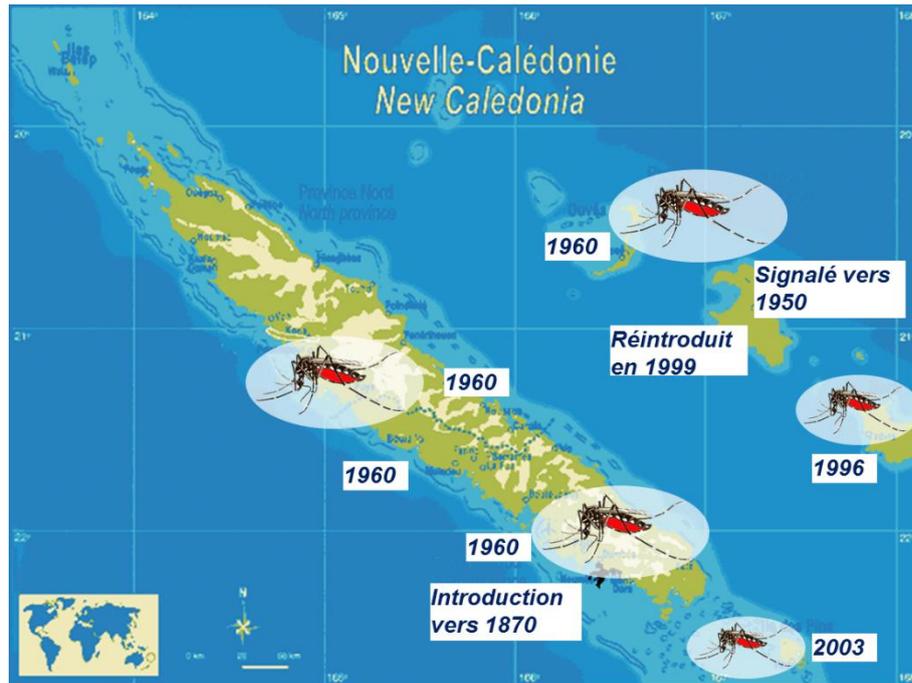


Figure 19. Historique de l'introduction d'*Ae. aegypti* en Nouvelle-Calédonie. Source IPNC

3.4. Diversité génétique du vecteur *Aedes aegypti* dans le monde

La génétique des populations vise à déterminer la variabilité génétique d'une population, par l'étude de la fréquence des gènes et des génotypes, en prenant en compte les facteurs susceptibles de modifier ces fréquences au cours des successions de générations. La pression de sélection liée à l'environnement est très importante dans l'évolution d'une population, le taux de mutation spontanée étant faible : de l'ordre de 1×10^{-6} mutation par gène et par génération. Ces mutations sont la seule source de différenciation d'un allèle et leur fréquence de différenciation dépendra des pressions sélectives s'exerçant sur la population. Les fréquences alléliques peuvent néanmoins être homogénéisées par la migration d'individus entre des populations d'une même espèce, mais ces mouvements sont minimes. L'absence de pressions sélectives entraîne une dérive génétique qui résulte de la fluctuation aléatoire des fréquences alléliques (Vega-Rua, 2015). En entomologie médicale, l'étude de la génétique des populations de vecteurs est essentielle dans la compréhension des épidémies liées aux arbovirus. En effet, la caractérisation génétique des populations de moustiques est importante dans l'évaluation de leur capacité d'adaptation aux pressions de sélection liées à

l'environnement mais aussi à l'utilisation d'insecticides, avec l'apparition de gènes de résistance.

Depuis plusieurs années, différents marqueurs ont été utilisés pour caractériser la génétique des populations d'*Ae. aegypti* à l'échelle locale, régionale mais aussi mondiale. Ces marqueurs génétiques peuvent être des isoenzymes ou encore des marqueurs d'ADN tel que les SNPs (Single-Nucleotide Polymorphism), les microsatellites ou les gènes mitochondriaux (Urduaneta-Marquez and Failloux, 2011). A l'échelle mondiale, les populations d'*Ae. aegypti* de la zone Est Africaine semblent les plus différenciées génétiquement, alors que celle du Centre et de l'Ouest de l'Afrique montrent des résultats plus intermédiaires. Entre les populations de la zone pantropicale des différences existent avec une diversité génétique faible pour la région Asie/Pacifique et plus importante pour la région Amérique (Brown *et al.*, 2014). Les populations Asie/Pacifique montrant aussi une forte différenciation avec la souche ancestrale africaine, cela suggérant une invasion plus récente de cette région par *Ae. aegypti* (Figure 20) (Brown *et al.*, 2014; Tabachnick, 1991).

A l'échelle régionale de nombreuses études ont été réalisées en Amérique, notamment après la pression de sélection exercée par l'utilisation de DDT (DichloroDiphényl-

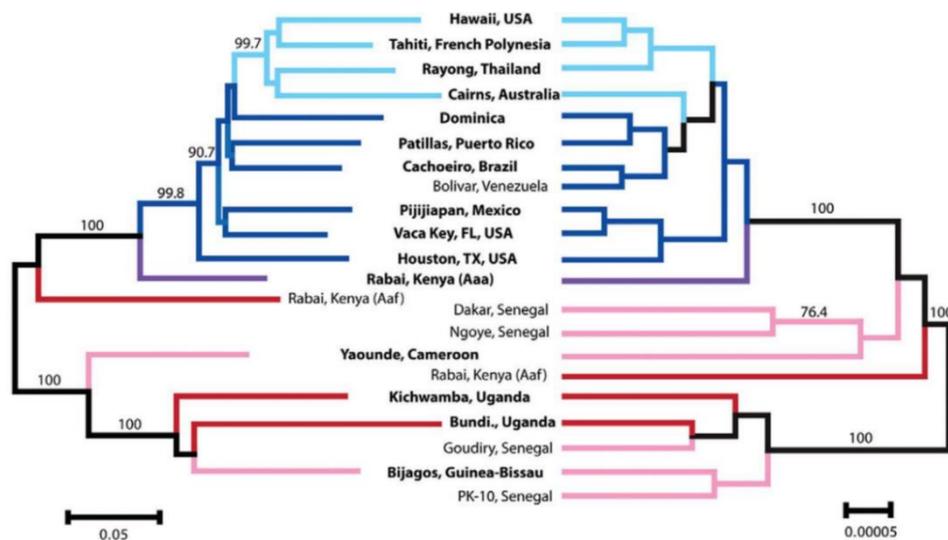


Figure 20. Etude phylogénétique d'*Ae. aegypti* basée sur des SNPs (à gauche) et le séquençage de gènes nucléaires (à droite). En rouge les population d'Afrique de l'Est, en rose les population d'Afrique de l'Ouest et Centrale, en bleu foncé les populations d'Amérique et en bleu clair les populations du Pacifique. Brown *et al.*, 2014

Trichloroéthane) lors de la campagne d'éradication d'*Ae. aegypti* entre 1940 et 1970 en Amérique du Sud (Urduaneta-Marquez and Failloux, 2011), en Asie (Bosio *et al.*, 2005; Mousson *et al.*, 2002; Sukonthabhirom *et al.*, 2005) ou encore en Afrique (Huber *et al.*, 2008; Paupy *et*

al., 2008; Sylla *et al.*, 2009) afin de déterminer l'histoire de la diffusion de ce vecteur mais aussi sa structuration génétique (Urdaneta-Marquez and Failloux, 2011). Les résultats de ces études suggèrent que le degré de différenciation des populations dépend de l'environnement spécifique de chaque région (Brown *et al.*, 2014; Brown *et al.*, 2011).

Dans la région Pacifique, seules les populations de Polynésie Française ont été caractérisées génétiquement (Failloux *et al.*, 1995; Paupy *et al.*, 2000). Ces études ont montré un faible taux de différenciation génétique, mais elles ont néanmoins démontré que la densité de population humaine, l'intensité de l'utilisation des insecticides et les caractéristiques écologiques du lieu d'isolement des populations d'*Ae. aegypti* testées semblent avoir un impact sur les différences génétiques observées.

Même si l'environnement reste une des pressions de sélection imposée aux populations de moustiques, l'utilisation des insecticides en lutte anti-vectorielle conditionne de plus en plus la structuration génétique des populations, notamment d'*Ae. aegypti*. En effet l'utilisation intensive de certains insecticides entraîne la sélection de mutations, préexistantes ou importées, dans une population et lui confère une résistance à ces molécules (Marcombe *et al.*, 2013; Moyes *et al.*, 2017; Urdaneta-Marquez and Failloux, 2011). Dans la région Pacifique, les méthodes de lutte varient en fonction des îles et ont évolué notamment avec l'apparition de résistance. Et c'est principalement le malathion (organophosphoré) et la deltaméthrine (pyréthrianoïde) qui sont utilisés depuis la fin des années 1980 (Huerre *et al.*, 1995). Si la diminution du nombre de vecteurs a pu être observée lors de campagnes de lutte anti-vectorielle, l'éradication d'*Ae. aegypti* n'a jamais été enregistrée depuis son introduction dans les îles du Pacifique (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2012; Lardeux *et al.*, 2002; Nhan *et al.*, 2014; Raju, 2003).

Chapitre 4 : La capacité vectorielle



Paul Howell et Frank Hadley Collins, Center for Disease Control Public Health Image Library.

Chapitre 4 : La capacité vectorielle

4.1. La capacité vectorielle : définition

La transmission vectorielle d'un arbovirus est dépendante de la relation entre trois acteurs : le virus, l'hôte et le vecteur. Les interactions, entre ces différents acteurs, sont influencées par l'environnement. Pour évaluer le risque d'épidémie lié à un arbovirus il est nécessaire de déterminer la capacité vectorielle. Cet indicateur permet de déterminer l'efficacité d'un vecteur à transmettre, dans le cas des arbovirus, un virus en condition naturelle. Un modèle mathématique permet de quantifier la capacité d'un vecteur en utilisant la formule suivante (Garrett-Jones and Grab, 1964):

$$C = \frac{ma^2bp^n}{-\ln p}$$

Où :

- m → la densité des vecteurs par rapport à l'hôte vertébré
- a → la probabilité journalière qu'un vecteur pique l'homme
- b → la proportion de vecteurs infectés
- p → la probabilité journalière de la 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

La capacité vectorielle peut ainsi être modulée par des facteurs extrinsèques, liés à l'hôte (état immunitaire, proportion à être piqué ...), à l'environnement (température, pluviométrie ...) ou encore à la densité de vecteurs, ainsi que par des facteurs intrinsèques (longévité du vecteur, préférences trophiques, fréquence des repas sanguins et compétence vectorielle).

L'aptitude d'un moustique à transmettre un arbovirus est spécifique et peut varier d'une espèce vectrice à l'autre (Weaver and Barrett, 2004). Les vecteurs *Aedes* tels qu'*Ae. aegypti*

et *Ae. albopictus* sont connus comme étant les vecteurs principaux des virus tels que le DENV, le CHIKV ou encore le ZIKAV alors que les *Culex* semblent être réfractaires à l'infection par ces virus. Des études ont ainsi démontrées, que ce soit pour le CHIKV ou le ZIKAV, que ces virus, chez *Culex pipiens* et *Culex quinquefasciatus*, ne parviennent pas à traverser la paroi de l'intestin et donc à disséminer dans le corps du vecteur (Aliota *et al.*, 2016a; Amraoui *et al.*, 2016; Kenney *et al.*, 2017; Talbalaghi *et al.*, 2010; Weber *et al.*, 2017). Cela a aussi été observé pour le virus O'nyong nyong (ONNV), arbovirus d'importance médicale de la famille de *Togaviridae* comme le CHIKV et circulant principalement en Afrique (Lanciotti *et al.*, 1998), dont la particularité est d'être transmis par des moustiques du genre *Anopheles* (Brault *et al.*, 2004). Ces moustiques sont principalement connus comme vecteurs de parasites et notamment celui responsable du paludisme, mais sont généralement réfractaires à l'infection par une grande majorité des arbovirus (Vega-Rua, 2015). Bien que le ONNV soit proche génétiquement du CHIKV, les anophèles sont incapables de transmettre ce dernier (Vanlandingham *et al.*, 2005; Vanlandingham *et al.*, 2006). Enfin, au sein d'une même espèce de moustiques des différences dans la capacité de transmission des arbovirus ont aussi été observées. Ces différences de réceptivité entre des populations d'une même espèce ont été démontrées pour le CHIKV (Vega-Rua *et al.*, 2015; Vega-Rua *et al.*, 2014), le virus de la fièvre jaune (Couto-Lima *et al.*, 2017), le DENV (Bennett *et al.*, 2002; Diallo *et al.*, 2008; Knox *et al.*, 2003) ou plus récemment pour le ZIKAV (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016).

Le génotype viral a aussi son importance dans la transmission des arbovirus. En effet la susceptibilité des vecteurs aux virus peut varier et l'exemple décrivant le mieux cette spécificité est celui de la transmission du CHIKV lors de l'épidémie qui a touché l'île de la Réunion en 2005-2006. Le virus qui a circulé sur l'île lors de l'épidémie semble s'être adapté au vecteur *Ae. albopictus* par le changement d'un seul acide aminé (alanine par valine) à la position 226 de la protéine de l'enveloppe virale E1 (Schuffenecker *et al.*, 2006). Cette mutation semble avoir favorisé la dissémination et la transmission du variant viral E1-226V par rapport au variant E1-226A chez le vecteur *Ae. albopictus* (Agarwal *et al.*, 2016; Tsetsarkin *et al.*, 2007). Des études réalisées avec différents génotypes du DENV ont aussi confirmé cette spécificité d'interaction entre des génotypes viraux au sein d'un même vecteur (Armstrong and Rico-Hesse, 2001; Vazeille *et al.*, 2003). Pour le ZIKAV une différence de transmission a été observée entre la lignée africaine du virus et la lignée asiatique (Ciota *et al.*, 2017; Pompon *et al.*, 2017; Weger-Lucarelli *et al.*, 2016).

Ces différents exemples illustrent l'importance du génotype du vecteur et du génotype viral dans la transmission des arbovirus. Ces interactions Génotype x Génotype, appelées interactions G x G, donnent lieu à des compétences vectorielles spécifiques (Figure 21) (Lambrechts, 2011; Lambrechts *et al.*, 2009). Les mécanismes génétiques conduisant à cette spécificité dans les interactions G x G sont peu connus, mais plusieurs études suggèrent que les interactions entre le DENV et le vecteur *Ae. aegypti* seraient sous le contrôle de plusieurs QTL (Quantitative Trait Loci) localisés sur le chromosome III qui faciliteraient le passage de la barrière intestinale par le virus (Bennett *et al.*, 2005a; Bennett *et al.*, 2005b; Bosio *et al.*, 2000).

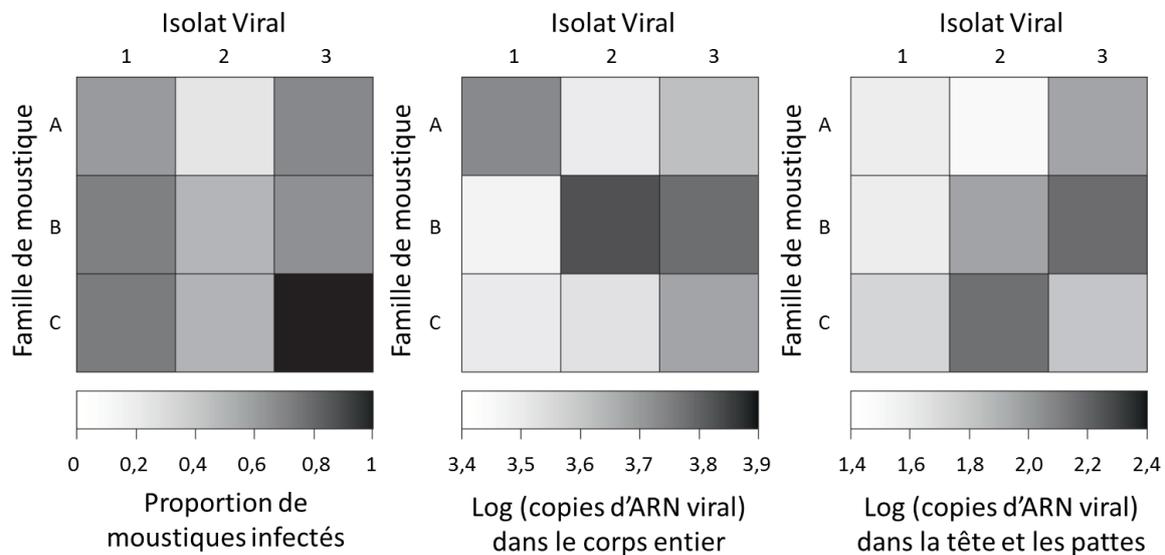


Figure 21. Interactions G x G pour le virus de la dengue et le vecteur *Ae. aegypti*. Les matrices représentent les mesures expérimentales de trois indices de la compétence vectorielle. Ces résultats représentent les combinaisons possibles par interactions entre trois familles d'*Ae. aegypti* et trois virus de dengue. Les nuances de gris représentent les valeurs phénotypes. Adaptée de Lambrechts, 2011.

4.2. La transmission vectorielle

La transmission vectorielle des arbovirus se déroule en plusieurs étapes (Figure 22) (Hardy *et al.*, 1983; Mellor, 2000). La première étape est l'infection de la femelle moustique lors d'un repas sanguin sur un hôte vertébré virémique. Le virus présent dans le sang se retrouve alors dans l'intestin moyen de la femelle, il doit alors pénétrer les cellules épithéliales de l'intestin sans être altéré par les enzymes digestives ou être séparé de l'épithélium par la membrane péritrophique. La membrane péritrophique est une structure imperméable composée de chitine dont la synthèse est déclenchée par la prise du repas sanguin, et qui sépare le bol

alimentaire de l'épithélium intestinal. Le virus arrive à pénétrer les cellules épithéliales de l'intestin du moustique grâce à une reconnaissance spécifique d'une protéine virale et d'un récepteur cellulaire. Le virus, après avoir pénétré la cellule épithéliale par endocytose, peut alors se répliquer. Après la réplication, les virions néoformés doivent franchir l'épithélium digestif au niveau de la lame basale qui le soutient afin d'être libérés dans l'hémocèle où circule l'hémolymphe. Une fois le système circulatoire atteint, le virus peut disséminer dans différents tissus et organes (tissus musculaires ou nerveux, corps gras, organes reproducteurs, glandes salivaires, ...). Cette dissémination peut dépendre d'un tropisme cellulaire spécifique virus/vecteur. Le virus doit ensuite atteindre les glandes salivaires pour permettre la transmission par la salive lors d'une pique à un nouvel hôte vertébré. Pour qu'il puisse y avoir transmission du virus deux grandes barrières sont donc à franchir chez le vecteur : i) la paroi intestinale, qui peut bloquer le passage du virus dans l'hémolymphe et donc empêcher la dissémination, et ii) la paroi des glandes salivaires, qui peut empêcher la libération du virus dans la salive et par conséquent la transmission au nouvel hôte.

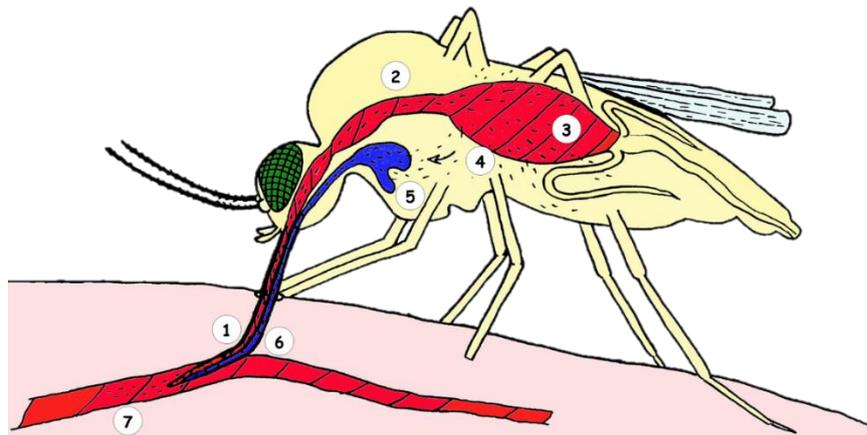


Figure 22. Etapes du développement viral dans le moustique vecteur. L'infection du vecteur par le virus est représentée par les étapes 1 à 3, la dissémination virale par les étapes 4 et 5 et la transmission par les étapes 6 et 7. © Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie

Lors de la dissémination dans le moustique, le virus peut aussi infecter les ovaires de la femelle et donc potentiellement les œufs. Ceci peut favoriser, notamment pour le DENV, la transmission verticale, qui est le passage du virus d'un moustique femelle à sa descendance. Ce phénomène est rare mais peut permettre la persistance du virus en absence d'hôtes réceptifs, lors de conditions environnementales défavorables (saison sèche ou froide) ou lorsque la densité de vecteur est trop faible et que cela défavorise la transmission horizontale (Lequime *et al.*, 2016; Weaver and Reisen, 2010).

Le temps compris entre l'infection du vecteur et la transmission du virus par la salive est appelé la Période d'Incubation Extrinsèque (PIE). Elle est variable et peut être influencée par les interactions G x G, par la dose virale ingérée ou par des facteurs environnementaux tels que la température (Hardy *et al.*, 1983; Tjaden *et al.*, 2013). Pour que la transmission de l'arbovirus soit possible, il est indispensable que cette PIE soit plus courte que la durée de vie du vecteur. La PIE est donc un élément clé de l'évaluation de la capacité vectorielle. Plus elle sera courte et plus le virus pourra être transmis par le vecteur infecté. En effet, l'infection virale est généralement persistante chez la femelle moustique, qui une fois infectée, peut transmettre le virus à un hôte vertébré lors de chaque piqûre. La multiplication des repas sanguins lors d'un cycle gonotrophique, comme c'est le cas pour *Ae. aegypti*, multiplie le risque de transmission du virus (Harrington *et al.*, 2014).

Les virus DENV et ZIKAV sont deux arbovirus ayant un cycle de transmission urbain mais aussi selvatique (Figure 23) (Petersen *et al.*, 2016; Weaver and Reisen, 2010). Ces deux virus utilisent les primates comme réservoirs pour leur amplification avant leur émergence dans un cycle urbain. Ces cycles selvatiques ont été mis en évidence en Afrique et en Asie, que ce soit pour le DENV (Gubler, 1997; Wang *et al.*, 2000) ou pour le ZIKAV (Diallo *et al.*, 2014; Marchette *et al.*, 1969).

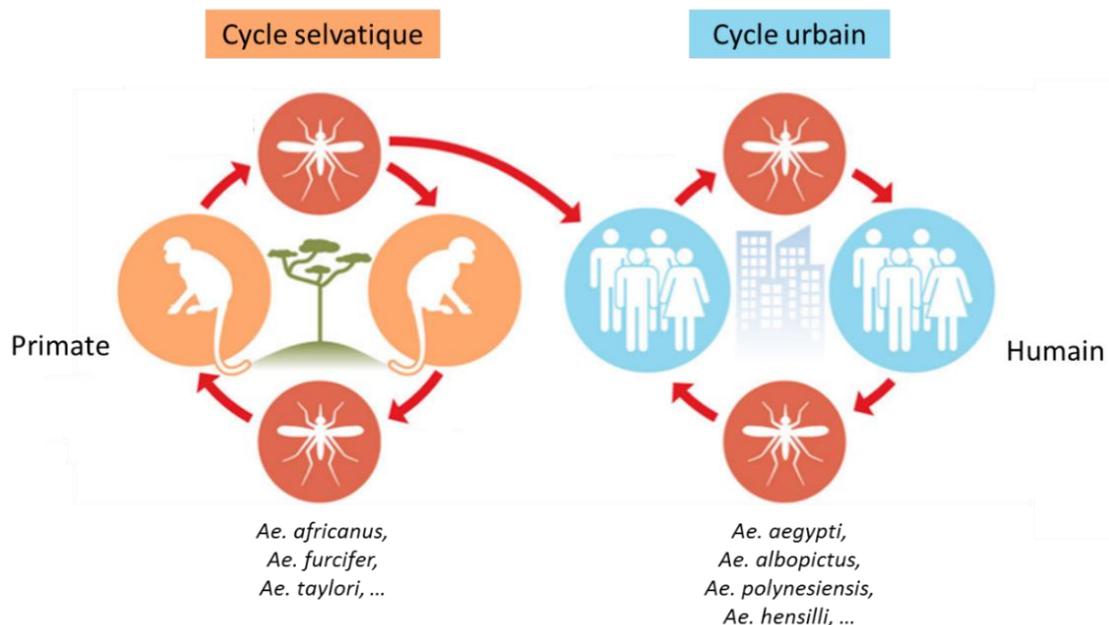


Figure 23. Cycle de transmission du virus de la dengue et du Zika. Adaptée de Council on Foreign Relations

4.3. Les facteurs pouvant influencer la capacité vectorielle des vecteurs d'arbovirus

Plusieurs facteurs peuvent influencer la transmission des arbovirus par leur vecteur. Parmi les facteurs extrinsèques, la température peut agir sur la physiologie du moustique, augmenter l'infection par le virus et diminuer la Période d'Incubation Extrinsèque (PIE) (Black *et al.*, 2002; Mordecai *et al.*, 2017). Cela a été mis en évidence pour le CHIKV (Zouache *et al.*, 2014), pour le virus West-Nile (Dohm *et al.*, 2002) et pour le DENV. Ainsi, une étude menée au Kenya avec deux populations d'*Ae. aegypti* et un DENV-2 a démontré que l'infection du vecteur était favorisée par l'augmentation de la température de 26°C à 30°C, alors que les résultats de la dissémination du virus semblaient être plus influencés par le génotype du vecteur que par la température (Chepkorir *et al.*, 2014). Une autre étude menée en Thaïlande a démontré que d'importantes amplitudes de température réduisent la transmission du DENV-1, probablement par altération des traits d'histoire de vie du moustique (Carrington *et al.*, 2013). Ces études d'interaction G x G avec influence de la température soulignent bien le fait que les facteurs environnementaux, et notamment la température, sont à prendre en considération dans l'évaluation de la capacité vectorielle d'un virus donné pour une population de moustique, et que cette interaction est composée non pas de deux mais de trois paramètres G x G x E (Génotype viral x Génotype du vecteur x Environnement).

La flore microbienne des moustiques peut aussi influencer la transmission des arbovirus. Le microbiome des insectes peut être retrouvé dans différents organes tels que l'intestin, les ovaires, les tubes de Malpighi ou encore l'hémocèle (Dennison *et al.*, 2014; Eleftherianos *et al.*, 2013). L'étude du microbiome intestinal de différentes espèces de moustiques d'Afrique démontre que généralement un taxon bactérien domine ce microbiome, mais que cela peut différer d'une population de moustique à l'autre. Le microbiome est ainsi influencé par la végétation et les populations d'hôtes vertébrés présents dans l'environnement de ces vecteurs et servant de source de nourriture pour les moustiques (Osei-Poku *et al.*, 2012; Zouache *et al.*, 2011). Chez *Ae. aegypti* plusieurs espèces bactériennes ont été décrites pour avoir un impact sur la transmission du DENV, tel que *Proteus sp* qui semble augmenter la résistance à l'infection du vecteur (Ramirez *et al.*, 2012). Différentes souches de *Wolbachia*

ont aussi démontré un rôle dans la résistance à l'infection par différents arbovirus chez *Ae. aegypti*, naturellement dépourvue de cette bactérie. Les souches *wMel* et *wMelPop-CLA*, isolées de *Drosophila melanogaster*, et *wAlbB*, isolée d'*Ae. albopictus*, diminuent la durée de vie de ce vecteur et/ou augmentent la résistance à l'infection par le DENV, le ZIKAV, le virus de la fièvre jaune et le CHIKV notamment par l'activation des voies de l'immunité innée du moustique (Dutra *et al.*, 2016; McMeniman *et al.*, 2009; Moreira *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2012; Rances *et al.*, 2012; Tan *et al.*, 2017; van den Hurk *et al.*, 2012; Walker *et al.*, 2011).

L'infection du moustique par un arbovirus va ainsi entraîner une réponse immunitaire chez le vecteur par activation de différents mécanismes de défense : les voies de signalisation Toll, JAK/STAT, Imd et la voie interférence par ARN (ARNi) qui vont agir sur la capacité de réplication du virus (Figure 24) (Blair, 2011; Sim *et al.*, 2014). Le rôle de la voie Toll a été caractérisé pour la première fois chez *D. melanogaster* chez qui il a été démontré que cette voie a un rôle clé dans la défense contre les champignons, les bactéries gram positif et les virus. La voie Imd (Immune deficiency) est connue pour avoir un rôle dans la défense immunitaire contre les bactéries et les virus chez les insectes. La voie Jak/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription) quant à elle joue un rôle dans l'immunité antivirale (Sim *et al.*, 2014). La voie Toll est activée par la reconnaissance des PRRs (Pattern Recognition Receptors) des agents pathogènes, qui va conduire une cascade de kinases et/ou protéases induisant la translocation du facteur de transcription Rel 1 dans le noyau et activer la transcription de peptides antimicrobiens (AMPs). Des études ont démontré que lors d'une infection du moustique par le DENV, la voie Toll contrôle la réplication du virus dans l'intestin du vecteur dès trois jours post-infection et cela pour les quatre sérotypes viraux (Ramirez and Dimopoulos, 2010; Sim *et al.*, 2013). La voie Imd est activée de la même façon que la voie Toll par la reconnaissance des PRRs, c'est ensuite la translocation de Rel 2, induite par une cascade de kinases et/ou protéases, qui va conduire à l'expression d'effecteurs antimicrobiens. Cette voie semble être requise dans la défense du vecteur contre le DENV. Une étude a pu démontrer que si la voie Imd est désactivée il y a une augmentation du titre viral dans l'intestin du moustique (Sim *et al.*, 2013). L'activation de la voie JAK-STAT est déclenchée par l'attachement du peptide Upd au récepteur extracellulaire Dome, qui permettra la dimérisation de STAT activant ainsi l'expression des gènes effecteurs et la production de peptides antimicrobiens (Hillyer, 2010; Sanders *et al.*, 2005; Sim *et al.*, 2014; Xi *et al.*, 2008).

Les mécanismes antiviraux de la voie JAK-STAT sont encore peu connus, mais deux gènes effecteurs semblent avoir été identifiés sans être encore caractérisés. Il s'agit de DVRF1 et 2 (Dengue Virus Restriction Factors) qui sembleraient jouer un rôle respectivement au niveau du récepteur de la voie et dans la reconnaissance virale. L'activation de cette voie semble être indépendante des voies Toll et ARNi (Souza-Neto *et al.*, 2009).

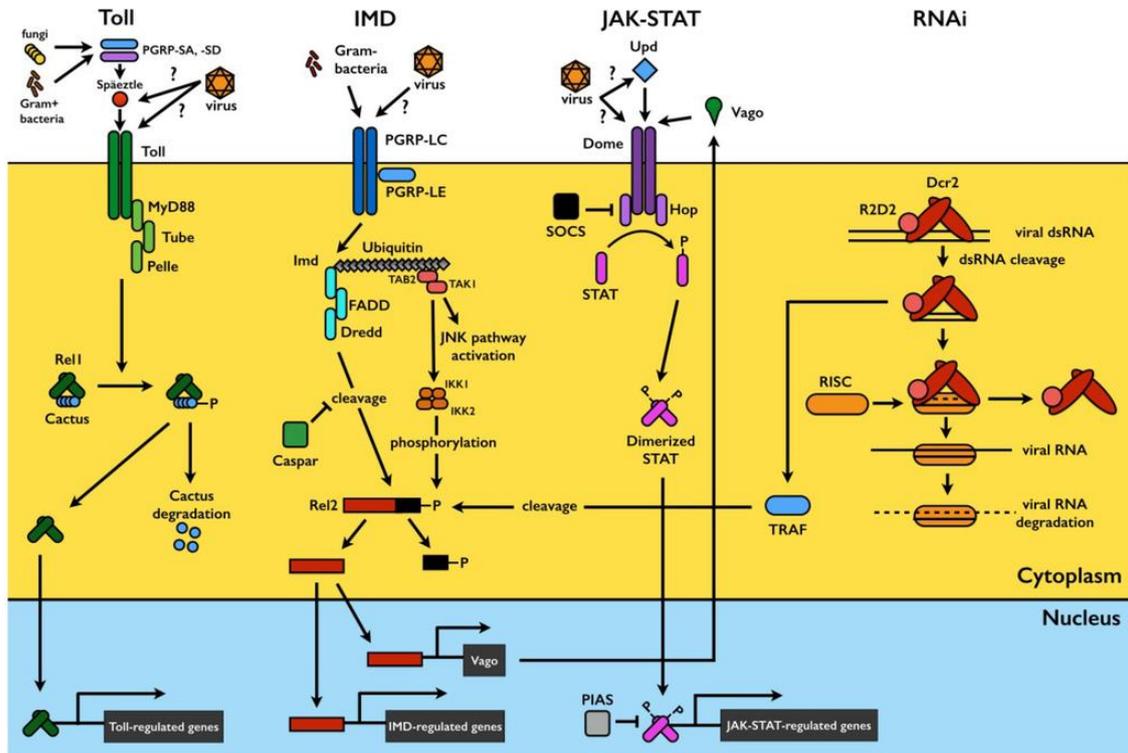


Figure 24. Principales voies de signalisation et d'ARN interférence de l'immunité du moustique suite à une infection virale. D'après Sim *et al.*, 2014

La voie ARNi est la principale voie de l'immunité innée des moustiques activée lors d'une infection avec un arbovirus. Cette réponse antivirale est importante, néanmoins il semble que cette voie joue plus un rôle de contrôle de l'infection et que d'élimination du virus, qui arrive à continuer sa dissémination dans l'insecte (Blair, 2011). La voie ARNi est activée par la reconnaissance, au cours de l'infection virale, d'ARN bicaténaire formé lors de la réplication virale. Lorsque la réponse ARNi est mise en place, les ARN double brin sont reconnus et clivés en petites molécules d'ARN de 21 à 32 nucléotides. Ces smRNA (small RNA) sont ensuite pris en charge par un complexe multiprotéique RISC (RNA Induced Silencing Complex) où ils interagissent avec une protéine de la famille des Argonaute/Piwi, qui va entraîner la reconnaissance et la dégradation des ARN cibles. A l'heure actuelle trois voies de l'interférence par ARN ont été identifiées : la voie siRNA (small interfering RNA), la voie miRNA

(micro RNA) et la voie piRNA (PIWI-interacting RNA) (Figure 25) (Donald *et al.*, 2012; Duvallet *et al.*, 2017).

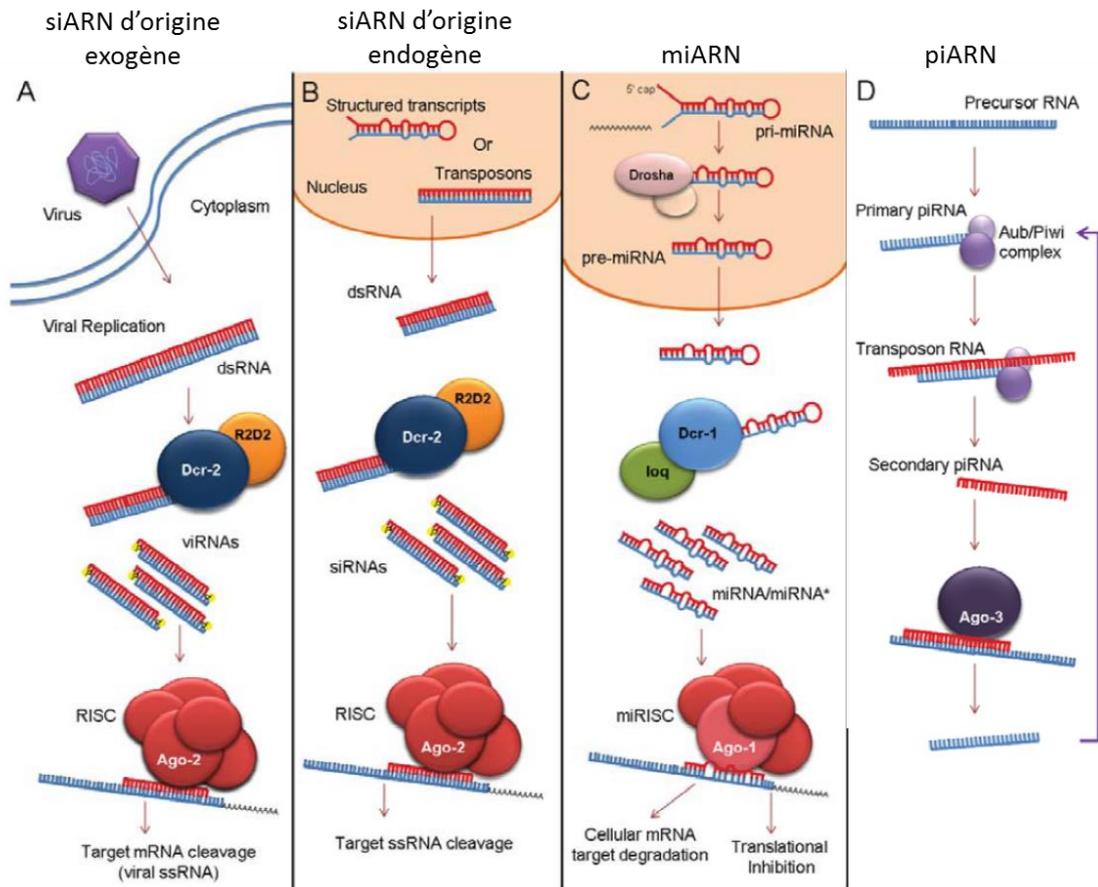


Figure 25. Principales voies d'ARN interférence. Adaptée de Donald *et al.*, 2012

4.4. La compétence vectorielle

La compétence vectorielle est un des paramètres nécessaires pour la détermination de la capacité vectorielle d'un vecteur pour un virus. Elle est définie comme étant l'aptitude du vecteur à être infecté par un virus suite à l'ingestion du repas sanguin, assurer la réplication virale et la transmission de l'agent pathogène à un vertébré lors d'une piqûre (Hardy *et al.*, 1983). Elle dépend de facteurs intrinsèques génétiques liés au vecteur, notamment pour la réceptivité au virus, et de facteurs extrinsèques tels que la dose virale ingérée par le vecteur lors du repas, de la température et de l'humidité d'incubation du vecteur après l'ingestion du virus. Elle permet aussi l'évaluation de la PIE d'un arbovirus chez un vecteur donné, ce paramètre est essentiel dans l'évaluation de la capacité vectorielle.

En laboratoire, l'évaluation de la compétence vectorielle est réalisée grâce à des infections expérimentales (Figure 26). Cette technique n'étant pas développée dans la seconde partie de ce manuscrit, elle est décrite dans ce chapitre. Les moustiques sont élevés en insectarium avec des conditions contrôlées en nutriments, température, humidité et photopériode, afin d'obtenir une population de moustiques homogène en taille et en bonne forme. La veille du repas infectieux les femelles, âgées de 5 à 7 jours, sont mises à jeun pendant 24h pour optimiser le taux de gorgement lors du repas artificiel. Le jour de l'infection expérimentale, un mélange composé d'hématies de lapin, de suspension virale de titre connu et d'ATP (Adénosine TriPhosphate) est proposé aux femelles pendant 20 minutes. Le repas sanguin est maintenu à 37°C pendant la durée de l'infection expérimentale grâce à des gorgeurs chauffants et des capsules recouvertes d'intestin de porc dessalé (système Hemotek®). Après le repas, les femelles sont anesthésiées sur une plaque froide à -4°C, et celles qui sont pleinement gorgées sont transférées dans des boîtes en carton. Un coton imbibé d'une solution de jus sucré à 10% est placé sur le dessus de la boîte afin d'assurer l'alimentation de ces femelles tout au long de l'incubation post-infection, qui se fait à 28°C, 80% d'humidité et une photopériode de 12 :12h.

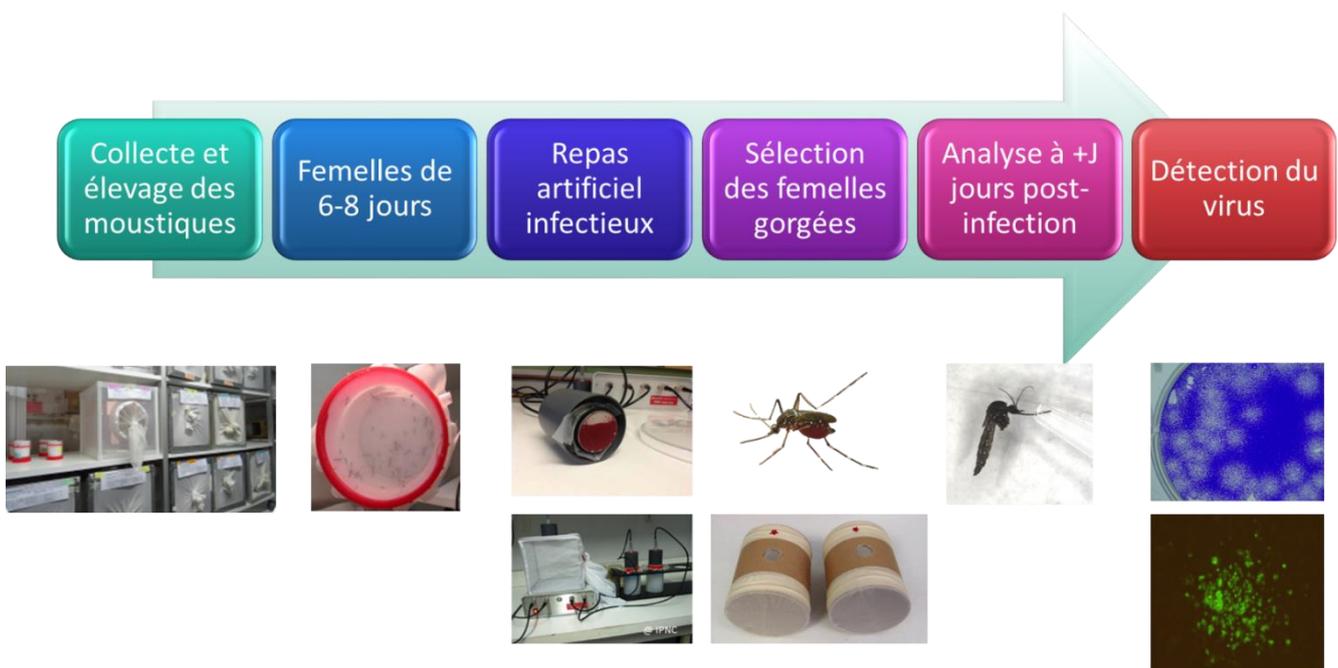


Figure 26. Protocole d'infection expérimentale de moustiques. Source Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie

L'analyse des moustiques se fait ensuite à différents jours post-infection par une technique de salivation forcée (Dubrulle *et al.*, 2009) : les ailes et les pattes de la femelle sont ôtées, leur

proboscis est introduit dans un cône de 20 μ L contenant 5 μ L de sérum de veau fœtal (SVF). Après 20 minutes, la totalité du volume présent dans le cône est transféré dans un tube individuel contenant 45 μ L de milieu de culture. Une fois l'ensemble des échantillons recueillis, le statut infectieux du corps, de la tête et de la salive de chaque femelle est déterminé par inoculation sur cellules.

L'analyse des résultats de compétence vectorielle prend en compte les différentes étapes de développement du virus dans le moustique. Dans ces expériences quatre paramètres sont principalement évalués :

- **Taux d'infection** : c'est la proportion de femelles avec un corps infecté par rapport au nombre de femelles analysées.
- **Taux de dissémination** : c'est la proportion des femelles avec une tête (ou ailes/pattes) infectée par rapport aux femelles avec le corps infecté. Ce rapport permet donc d'évaluer la capacité du virus à franchir la barrière du tube digestif du moustique.
- **Taux de transmission** : c'est la proportion de femelles pour lesquelles la présence de virus infectieux a été détecté dans la salive par rapport aux femelles chez qui le virus a disséminé. Ce rapport permet d'évaluer la capacité du virus à franchir la barrière des glandes salivaires afin d'atteindre la salive du moustique.
- **Efficacité de transmission** : c'est la proportion de femelles ayant du virus infectieux dans la salive par rapport au nombre de femelles analysées.

Ces rapports permettent d'évaluer, expérimentalement, la proportion de moustiques pouvant transmettre un arbovirus et ainsi d'évaluer le risque épidémique d'un arbovirus en fonction d'une population de moustique locale (transmission autochtone). En effet, les données générées lors des expériences de compétence vectorielle font partie intégrante de l'évaluation de la capacité vectorielle.

Objectifs

La circulation des arbovirus dans la région Pacifique ne cesse de s'intensifier depuis les cinq dernières années, et cette intensification a aussi été observée en Nouvelle-Calédonie. La co-circulation de différents sérotypes du virus de la dengue et l'introduction des virus du chikungunya et du Zika ont démontré que la circulation des arbovirus est un problème majeur de santé publique (Cao-Lormeau and Musso, 2014; Cao-Lormeau, 2016; Roth *et al.*, 2014). Dans la région Pacifique, peu d'informations étaient disponibles à l'exception de données globales sur la circulation des arbovirus (Cao-Lormeau and Musso, 2014; Roth *et al.*, 2014; Singh *et al.*, 2005) et d'une répartition des vecteurs réalisée dans les années 1960 et partiellement mise à jour (Belkin, 1962; Guillaumot, 2005; Guillaumot *et al.*, 2012; Roth *et al.*, 2014). De ce fait les travaux menés à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie et à l'Institut Louis Malardé à Tahiti se sont dans un premier temps attachés à définir l'épidémiologie moléculaire des arbovirus qui ont circulé dans la région (Aubry *et al.*, 2012; Descloux *et al.*, 2009; Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2014; Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2012). Quant à la caractérisation des populations d'*Ae. aegypti*, seuls deux études existaient sur la caractérisation génétique des moustiques de Polynésie Française (Failloux *et al.*, 1995; Paupy *et al.*, 2000) et une étude de compétence vectorielle avait été réalisée en Nouvelle-Calédonie avec le vecteur local et le CHIKV (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2012). L'épidémie de Zika, qui a touché une partie de la région Pacifique et Sud-Américaine, a aussi mis en avant la possibilité d'émergence dans la région Pacifique d'une épidémie d'arbovirose qui a ensuite diffusée mondialement (Petersen *et al.*, 2016). Face à ce constat, il nous est paru important de mieux caractériser les épidémies d'arboviroses en Nouvelle-Calédonie et dans la région Pacifique. C'est dans cet optique que nous avons choisi de focaliser ce travail sur des études ciblant le virus, le vecteur et leurs interactions.

Pour cela trois axes seront développés dans ce mémoire: **i) la caractérisation génétique du vecteur majoritaire de la région Pacifique, le moustique *Ae. aegypti*, à l'échelle inter et intra îles ; ii) l'analyse phylogénétique du ZIKAV ayant circulé en Nouvelle-Calédonie et dans la région Pacifique et iii) l'évaluation de la compétence vectorielle, principalement d'*Ae. aegypti*, pour le DENV et le ZIKAV.** Ces trois axes de recherches seront sous-divisés en

quatre chapitres développés dans la seconde partie de ce manuscrit. Le premier chapitre a pour but d'étudier la variabilité génétique du vecteur *Ae. aegypti* dans la région Pacifique, pour cela des marqueurs microsatellites ont été utilisés et une étude phylogénétique a été menée grâce au séquençage de deux gènes mitochondriaux. Les résultats permettront de déterminer, dans le contexte insulaire spécifique à la région Pacifique, si les différences environnementales ont eu un impact sur la structuration génétique des populations de moustiques, et dans un deuxième temps de déterminer l'origine géographique de ces moustiques qui semblent avoir été introduits à la fin du XIX^{ème} siècle. Le second chapitre sera consacré à l'évaluation de la compétence vectorielle de l'*Ae. aegypti* calédonien pour DENV-1 avec une comparaison avec une population de moustiques de Tahiti. Ce virus est celui qui a le plus circulé dans la région Pacifique ces dix dernières années, il nous est paru important dans un premier temps de mesurer la compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* pour ce virus et secondairement de voir si la variabilité génétique observée dans le premier chapitre pouvait influencer cette compétence vectorielle. Le troisième chapitre permettra de centrer ce manuscrit sur l'étude du ZIKAV, avec tout d'abord une étude phylogénétique de plusieurs souches virales isolées de patients en Nouvelle-Calédonie et dans la région Pacifique au cours de l'épidémie de 2013-2016 afin de déterminer si un ou plusieurs variants sont à l'origine de la circulation dans cette région. Le dernier chapitre de ce mémoire aura pour objectif de déterminer si les différences génétiques entre les lignées et les sous-lignées du ZIKAV ont un impact sur la transmission par le vecteur calédonien *Ae. aegypti*.

Les résultats des deux premiers chapitres de ce mémoire expérimental ont fait l'objet de publications, respectivement dans le journal *PLOS Neglected Tropical Diseases* et le journal *Parasites and Vectors*. Les résultats du troisième chapitre de ce mémoire sont en cours de révision pour publication dans le journal *Emerging Microbes & Infections*. La publication, des résultats présentés dans le dernier chapitre, est en cours de soumission.

Les résultats de cette thèse seront ensuite discutés dans un contexte général avec une attention particulière portée sur les barrières à la transmission virale, sur les facteurs intrinsèques pouvant moduler les interactions virus/vecteur et l'influence de l'environnement sur ces interactions. Pour finir une mise en perspective de ces résultats sera abordée autour de la circulation des arbovirus et des vecteurs à l'échelle du Pacifique.

Partie 2 : Démarche expérimentale

Chapitre 1 :

Etude de la diversité génétique *d'Aedes aegypti* dans la région Pacifique



Chapitre 1 : Etude de la diversité génétique d'*Aedes aegypti* dans la région Pacifique

1.1. Contexte de l'étude et démarche expérimentale

Ae. aegypti est le vecteur majoritaire d'arbovirus dans la région Pacifique (Guillaumot, 2005; Roth *et al.*, 2014). La répartition de ce vecteur à travers le Pacifique est connue (Roth *et al.*, 2014) et démontre qu'il s'est installé dans tout le Pacifique à l'exception de Futuna et de quelques îles isolées. Peu d'études de génétique des populations avaient été réalisées dans la région Pacifique que ce soit à l'échelle intra ou inter îles à l'exception de deux études effectuées à l'échelle de Tahiti et de la Polynésie Française. Ces études (méthodes d'alloenzymes et d'isoenzymes) ont démontré qu'il y avait peu d'échanges génétiques entre les populations des différentes îles à l'échelle de la Polynésie et que les différenciations génétiques étaient liées à la densité des populations humaines et aux particularités des écotopes des moustiques entre Tahiti et Moorea (Failloux *et al.*, 1995; Paupy *et al.*, 2000). La génétique du vecteur pouvant avoir un impact sur sa capacité à transmettre les arbovirus (Failloux *et al.*, 2002; Tabachnick, 2013), il est indispensable de caractériser génétiquement les populations d'*Ae. aegypti* de cette région du monde. La région Pacifique est composée de milliers d'îles, relativement isolées, et aux caractéristiques environnementales différentes. Peu d'informations sur ce vecteur étaient connues dans la région Pacifique, mis à part sa colonisation et sa dispersion (Guillaumot, 2005). Les particularités insulaires de la région, liées à l'isolement et à l'environnement spécifique à chaque île, pouvant influencer l'évolution génétique de ce moustique, l'hypothèse que les populations d'*Ae. aegypti* se soient adaptées génétiquement à leur environnement du fait de l'isolement était à vérifier.

Cette caractérisation génétique, du vecteur *Ae. aegypti* à l'échelle de la région du Pacifique, a été réalisée par une étude phylogénétique de deux gènes mitochondriaux, le gène de la NADH déshydrogénase sous unité 4 (ND4) et le gène de la cytochrome oxydase sous-unité 1 (CO1) (da Costa-da-Silva *et al.*, 2005; Paupy *et al.*, 2012) et par une étude de structure génétique des populations (11 microsatellites) (Brown *et al.*, 2011; Lovin *et al.*, 2009; Slotman *et al.*, 2007). Pour cela 9 populations ont été échantillonnées avec à chaque fois 30 individus

étudiés. Trois échantillonnages ont été réalisés en Nouvelle-Calédonie (Nouméa, Poindimié et Ouvéa), deux à Fidji (Lautoka et Suva), un à Tonga (Havelu) et trois en Polynésie Française (Papeete, Mataura et Vaitahu). L'analyse des microsatellites a permis de déterminer l'écart à l'équilibre d'Hardy-Weinberg des populations étudiées, la richesse allélique de chaque loci, ainsi que les paramètres F_{ST} , correspondant à la différenciation entre les échantillons, et F_{IS} , correspondant à l'indice de fixation ou coefficient de consanguinité et enfin de déterminer la structuration génétique des populations à l'échelle du Pacifique. Les gènes mitochondriaux ont quant à eux permis de déterminer, par analyse phylogénétique, l'origine géographique des populations d'*Ae. aegypti*.

1.2. Résultats et conclusion

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal *PLOS Neglected Tropical Diseases* : « **Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific.** » DOI: 10.1371/journal.pntd.0004374.

Cette étude a permis de démontrer une différenciation génétique modérée du vecteur *Ae. aegypti* à l'échelle de la région Pacifique, avec un lien entre l'isolement génétique des populations et l'isolement géographique des îles. Ces différences génétiques peuvent aussi être dues aux conditions environnementales et à l'utilisation des insecticides en lutte-antivectorielle. Une étude, réalisée en Martinique, a démontré que l'utilisation intensive d'insecticides, lors des épidémies d'arboviroses, a entraîné une réduction de la diversité génétique des populations d'*Ae. aegypti* (Marcombe *et al.*, 2013). En effet, des corrélations entre la résistance à la deltaméthrine et la perte de richesse allélique et entre la résistance au téméphos et la consanguinité des populations ont été observées. Ainsi l'utilisation des insecticides en lutte antivectorielle a pu favoriser une diminution de la diversité génétique des populations d'*Ae. aegypti*, car seuls les individus possédant ces gènes de résistance et leurs progénitures ont pu survivre (Marcombe *et al.*, 2013). Notre étude a aussi mis en évidence un lien entre la migration humaine, les axes de commerce maritime de la région et l'origine géographique des populations d'*Ae. aegypti*. Les différences génétiques du vecteur peuvent avoir un impact sur l'habilité du moustique à transmettre les arbovirus et sont liées aux interactions G X G (Lambrechts, 2011; Tabachnick, 1994; Tabachnick, 2013). Il paraît donc

essentiel de : i) continuer la caractérisation des vecteurs potentiels d'arbovirus dans la région Pacifique, en particulier les vecteurs *Ae. albopictus* et *Ae. polynesiensis* présents respectivement à l'ouest et à l'est de la région Pacifique et les autres vecteurs secondaires d'arbovirus (Guillaumot, 2005; Roth *et al.*, 2014); ii) d'évaluer la compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* pour les arbovirus circulants dans la région Pacifique et notamment le DENV-1 qui, comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, est le virus ayant le plus circulé ces dernières années.

1.3. Article 1

Article 1: Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the Pacific.

Elodie Calvez^{1*}, Laurent Guillaumot¹, Laurent Millet², Jérôme Marie³, Hervé Bossin³, Vineshwaran Rama⁴, Akata Faamoe⁵, Sosiasi Kilama¹, Magali Teurlai¹, Françoise Mathieu-Daudé², Myrielle Dupont-Rouzeyrol¹

¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, ² Institut de Recherche pour le Développement, ³ Institut Louis Malardé, ⁴ Ministry of Health, Fiji, ⁵ Ministry of Health, Tonga

ABSTRACT

Background:

The Pacific region is an area unique in the world, composed of thousands of islands with differing climates and environments. The spreading and establishment of the mosquito *Aedes aegypti* in these islands might be linked to human migration. *Ae. aegypti* is the major vector of arboviruses (dengue, chikungunya and Zika viruses) in the region. The intense circulation of these viruses in the Pacific during the last decade led to an increase of vector control measures by local health authorities. The aim of this study is to analyze the genetic relationships among *Ae. aegypti* populations in this region.

Methodology/Principal Finding:

We studied the genetic variability and population genetics of 270 *Ae. aegypti*, sampled from 9 locations in New Caledonia, Fiji, Tonga and French Polynesia by analyzing nine microsatellites and two mitochondrial DNA regions (CO1 and ND4). Microsatellite markers revealed heterogeneity in the genetic structure between the western, central and eastern Pacific island countries. The microsatellite markers indicate a statistically moderate differentiation ($F_{ST} = 0.136$; $P < = 0.001$) in relation to island isolation. A high degree of mixed

ancestry can be observed in the most important towns (e.g. Noumea, Suva and Papeete) compared with the most isolated islands (e.g. Ouvea and Vaitahu). Phylogenetic analysis indicated that most of samples are related to Asian and American specimens.

Conclusions/Significance:

Our results suggest a link between human migrations in the Pacific region and the origin of *Ae. aegypti* populations. The genetic pattern observed might be linked to the island isolation and to the different environmental conditions or ecosystems.

AUTHOR SUMMARY

Aedes aegypti is the major arbovirus vector in the Pacific region. The spread of this mosquito in the different islands seems to be linked to human activities at the beginning of the twentieth century. Since 2010, occurrence of arbovirus outbreaks increased in this region, with the co-circulation of dengue, chikungunya and Zika viruses. The lack of vaccines and treatments for these pathogens led the health authorities to implement vector control measures. In this study, we present the genetic structure and the phylogenetic data obtained from the analysis of 270 *Ae. aegypti* collected in the Pacific region. The infestation of the islands seems to have American and Asian origins. The genetic structure of the vector populations indicates a differentiation of the mosquitoes between the western, central and eastern Pacific island countries and the specific island isolation context. This differentiation could be related to the different environmental conditions in each island country.

1. Introduction

Dengue fever is the most prevalent arthropod-borne viral infection of humans in tropical and subtropical countries (1). In the Pacific region dengue virus outbreaks have occurred regularly since World War II (2). However, over the last 5 years, the arbovirus outbreak profile in the Pacific region has changed. Indeed, the predominant circulation of a single dengue virus serotype moved on to the co-circulation of several dengue serotypes, along with the emergence of chikungunya and Zika viruses (2-5).

Dengue, chikungunya and Zika are arboviruses transmitted to humans

through the bites of mosquitoes belonging to the genus *Aedes*, subgenus *Stegomyia*. In the Pacific region, many of these vectors are endemic species members of the “*scutellaris*” group, which, according to Belkin (6), could have derived from a single original species unintentionally introduced by the first Austronesian navigators 1500 to 2000 years ago. Owing to the very particular conditions of this region including strict isolation and ecological differences between the islands, it underwent a speciation process that led to the separation into different species (6, 7). The introduction of *Aedes aegypti* was more recent, this mosquito was first recorded in the Pacific in the late

nineteenth and the early twentieth century (8). At present, the main *Aedes* vectors are *Ae. aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* along with nine other *Aedes* potential vectors (8). *Ae. aegypti* is present in most Pacific islands with the exception of Futuna and very few other isolated islands. Recently introduced, from South Asia into Western Pacific islands, *Ae. albopictus* is now established as far as the Kingdom of Tonga. *Ae. polynesiensis* is widespread in the Eastern part of Oceania, including Fiji, Samoa Islands, French Polynesia, and Pitcairn (9). Regarding this distribution, *Ae. aegypti* is the most widespread arbovirus vector in the Pacific with its presence reported in a majority of islands. This vector is a domestic species, closely associated with human migrations and transportation, commerce and urbanization (10, 11).

Pacific islands have experienced intense population migrations since the early nineteenth century with the first wave of European colonization (12). During the twentieth century, this migration continued due to the implementation of various business and industrial activities. Thus many Asian workers immigrated into New Caledonia, French Polynesia (13) and Fiji. Population flows between the different Pacific islands have always been observed. This immigration was highly influenced by the vehicular languages used, being more intense between French speaking islands or between English speaking islands (12). The introduction of *Ae. aegypti* in different

islands over time might be linked to the Pacific history of human migrations. In French Polynesia it was first reported in 1924 only in Tahiti, and then in the Marquesas Islands and in the Austral Islands sixty years later (14) but the first dengue epidemic was described in the middle of the nineteenth century (15) and might be due to *Ae. polynesiensis* which is a competent dengue vector (16, 17). The first reported dengue epidemic in New Caledonia was described during the 1880s. This epidemic episode clearly demonstrates the presence of *Ae. aegypti*, as no other dengue vector had been reported at this date or later on (18). In Fiji and Tonga, vector descriptions reported the presence of *Ae. aegypti* from the 1960s (6, 19), but dengue epidemics were recorded before the 1950s (2). During World War II, the exchanges between America, Asia, Europe and the Pacific islands increased and may have impacted the distribution of *Ae. aegypti* (20).

Before 1960, no systematic control measures were implemented against *Ae. aegypti* in the South Pacific islands, except for international airports and harbors (19). Due to an increase in the frequency and intensity of dengue outbreaks in the second half of the twentieth century, French Polynesia and New Caledonia health authorities adopted similar vector control strategies involving a combination of insecticide spraying and community awareness raising, aimed at source reduction. These strategies resulted in a

decrease of the mosquito's presence in these island groups (21-23). In 2003, in Fiji, the Ministry of Health decided to assess a larval source reduction campaign to reduce the density of the vector's breeding sites (24). In Tonga the WHO decided in 1984 to increase the vector control effort at the international airport with insecticide applications and aircraft disinsection. These vector control operations did not result in elimination of *Ae. aegypti*, but they created different environments and exerted selective pressure.

To our knowledge, no studies have investigated the genetic diversity of *Ae. aegypti* in the Pacific region except in French Polynesia, using isoenzymes (11) and alloenzymes (25). These studies demonstrated a link between the genetic diversity of *Ae. aegypti* populations, human population density, and vector control intensity. The recent arbovirus outbreak waves in the Pacific region highlight the need to improve our knowledge of *Ae. aegypti* in the Pacific. The aim of this study is to better understand the genetic structure and the phylogeny of this vector on the Pacific region. For this purpose, we analyzed a set of nine microsatellites and two mitochondrial DNA sequences on 270 *Ae. aegypti* specimens collected in nine locations distributed in four different Pacific Island Countries and Territories.

2. Materials and methods

2.1. Description of the study area

The Pacific region is an area unique in the world, composed of thousands of islands, high volcanic and low coral (atoll) islands, separated by vast stretches of ocean. Our sample sites are situated between longitudes 165° East and 139° West, spanning a region approximately 6,000 km wide. Latitudes of our sample sites are between 9° South and 23° South. There are several tropical climatic zones across the South Pacific region with different environments according to the latitude, localization within the islands and human influence. In New Caledonia (NC), temperatures are generally mild although with marked seasons. Poindimie, situated in a rural area exposed to dominant winds, has heavy rainfall whereas Noumea, the main city, is much drier. Ouvea is a flat coral island with no water supply connection (Figure 1). In Fiji (FJ), both sample sites are situated in peri-urban settings. Lautoka, a city on the leeward side of the island, is situated in a dry area. Suva, on the windward side of the same island, has a wet climate. In Tonga (TG), Havelu is a suburb of Nuku'alofa, capital of the country, on the island of Tongatapu, a flat coral island, but, where piped water supply is available, unlike on Ouvea (Figure 1). In

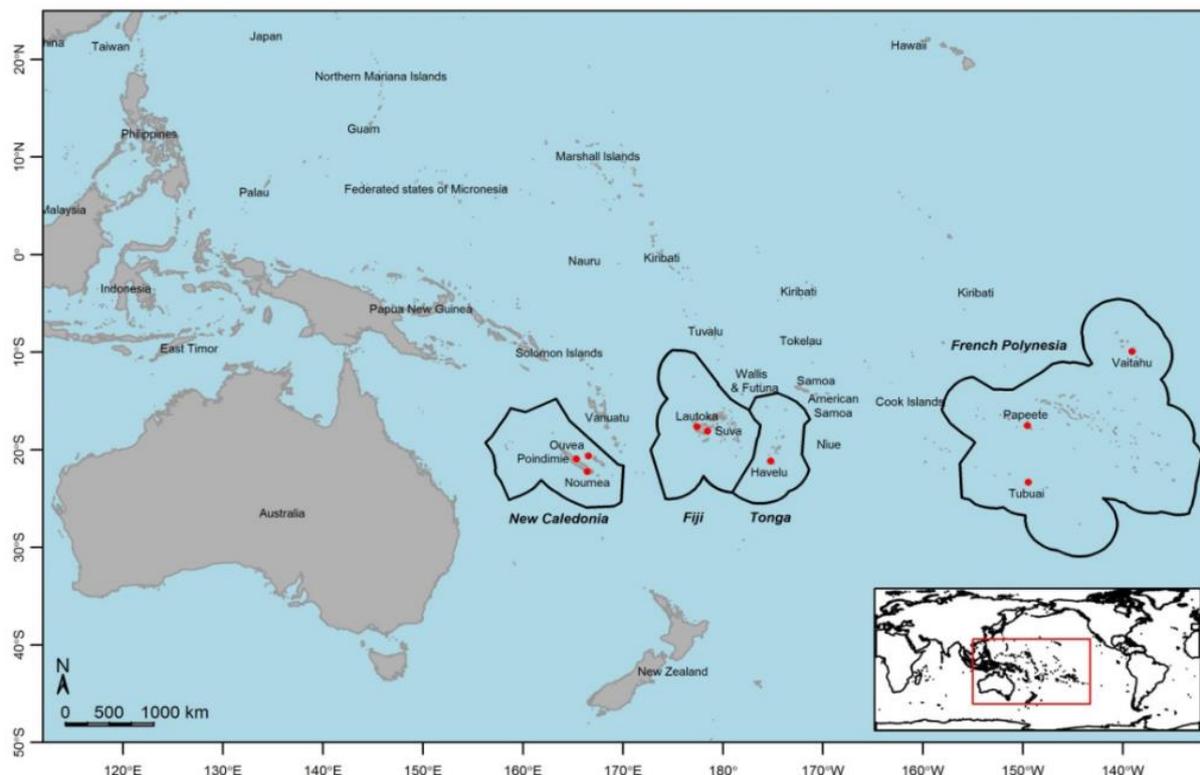


Figure 1. Pacific map locating *Ae. aegypti* sampling sites, 2013. The nine sample sites are represented by the red dots.

French Polynesia (FP) the climate is different between the islands. Tubuai is the southernmost sample site of all. It is a rural island with temperate climate and distinct seasons. Papeete is the main city on Tahiti, with a humid tropical maritime climate and high temperature with slight seasonal variations. The village of Vaitahu on the island of Tahuata in the Marquesas Islands, is the northernmost sample site with warm conditions year round (Figure 1).

2.2. Mosquito sampling

Mosquitoes were sampled at the immature stage (larvae and pupae) in the four island countries: New Caledonia (NC, 3 sites), French Polynesia (FP, 3 sites), Fiji (FJ, 2 sites) and Tonga (TG, 1 site) (Fig. 1). For

each sampling site a central spot was specified (Table 1). All potential breeding sites within a 200 m radius were searched and mosquito larvae and pupae were collected (three to eleven containers were sampled per site). A first morphological identification was carried out. *Aedes*-like larvae were reared to adulthood for confirmation and the *Ae. aegypti* specimens collected. Thirty such specimens from each site were stored in 100% ethanol at -20°C for molecular analysis.

2.3. DNA extraction

Total DNA was extracted from adult mosquitoes using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) with a first step of mechanic lysis with 2.38 mm RNase/DNase

Table 1. *Ae aegypti* sampling sites: coordinates and date in Pacific islands, 2013.

Sample name	Locality	Country	Date	Latitude	Longitude
Poi-NC	Poindimie	New Caledonia	Jul. 2013	20°56'56" S	165°19'58" E
Nou-NC	Noumea	New Caledonia	Jul. 2013	22°13'57" S	166°25'25" E
Ouv-NC	Ouvea (Loyalty Islands)	New Caledonia	Jul. 2013	20°39'00" S	166°32'38" E
Lau-FJ	Lautoka (Viti Levu Island)	Fiji	Oct. 2013	17°39'33" S	177°24'17" E
Suv-FJ	Suva (Viti Levu Island)	Fiji	Oct. 2013	18°05'13" S	178°27'43" E
Hav-TG	Havelu (Nuku'alofa Tongatapu Island)	Tonga	Oct. 2013	21°09'03" S	175°13'12" W
Tub-FP	Mataura (Tubuai Australes Islands)	French Polynesia	Nov. 2013	23°20'49" S	149°28'43" W
Pap-FP	Papeete (Tahiti)	French Polynesia	Aug. 2013	17°31'38" S	149°33'00" W
Vai-FP	Vaitahu (Tahuata Marquisas Islands)	French Polynesia	Jan. 2013	9°56'14" S	139°06'29" W

Thirty mosquitoes were analyzed for each sampling site.

free metal beads at 3000 rpm during 1 min and stored at -20°C.

2.4. Microsatellite analysis

Individual genotypes were scored for 11 previously published microsatellite loci: AC1, AC2, AC4, AG1, AG2, AG5, CT2 (26), A1, B2, B3 (27) and 145TAAA1 (28). DNA was amplified in a Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems) using the GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega) as described in previous studies with slight modifications (26-28). PCR products were analyzed using a Genetic Analyser 3130xl (Applied Biosystems). The results were genotyped with Peak Scanner software (Applied Biosystems) and double-checked.

The deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for each locus was tested with GenAlex 6.5 (29). MicroChecker v2.2.3 (30) was used to calculate the probability of null allele occurrence in each locus within each population. The number of alleles and the estimated allele richness (31) were

determined by FSTAT2.9.3 software (32). The FIS for each population for all loci were calculated using Genetix (33) and Arlequin v3.5.1.2 (34). The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and the FST were computed using Arlequin v3.5.1.2 software (34). The population genetic structure was determined using STRUCTURE software (35). The Bayesian approach was chosen to infer the number of genetic clusters (K). We performed twenty independent runs, K from 1 to 15, with a burn-in period of 100,000 iterations and a total of 1,000,000 Markov Chain Monte Carlo iterations. The program Structure Harvester (36) was used to determine the most probable number of clusters by calculating the ΔK value (37). The web server CLUMPAK was used to summarize and visualize the STRUCTURE results (38). A Mantel test of correlation between geographical and genetic distance matrices was tested on IBD web server 3.23 (39) with 1,000 permutations.

2.5. MtDNA sequencing analysis

A mitochondrial DNA analysis was performed for two genes: CO1 (40) and ND4 (41). The 270 DNA samples were amplified and sequenced with the primers previously published. Amplified fragments were purified with the MinElute PCR Purification kit (Qiagen) and sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) on a Genetic Analyser 3130xl (Applied Biosystems).

Sequences were analyzed using Staden Package (MRC Cambridge, England), nucleotide sequences were aligned with BioEdit (42). The haplotype numbers were assigned in reference to the published *Ae. aegypti* sequence from Cambodia for CO1 (GenBank accession No. JQ926688) and for ND4 (GenBank accession No. JQ926722). The nucleotide diversity (π), the Tajima (43), the Fu and Li (44) and Fu (45) tests were computed by DNASP v5 (46) to determine the neutrality of the populations. The phylogenetic networks based on CO1 and ND4 sequences were constructed using a reduced-median algorithm (47) as implemented in the Network program (48). MRBAYES 3.1.2 software (49) was used to make a CO1-ND4 combined analysis using sequences obtained in this study and retrieved from GenBank. Four Markov chains were run for 2,000,000 generations with a 25% burn-in. The tree was drawn with FigTree v1.4.2 (Institute of Evolutionary Biology, University of

Edinburgh). A Principle Coordinate Analysis (PCoA) of the mtDNA sequences was realized with DARwin software (50).

3. Results

3.1. Microsatellites analysis

3.1.1. Genetic variability of the samples

The 11 microsatellite loci allowed the identification of genotypes from the 270 *Ae. aegypti* adult mosquitoes sampled from the nine sites. The presence of a null allele was suspected at loci AG2 and 145TAAA1, which were therefore excluded from the analysis, leading to a dataset of 9 loci. A total of 57 alleles was observed for all samples (Table 2). The allelic richness was determined as 6 for the whole population ranging from 4 alleles for locus AC2 to 9 alleles for locus AG5. Regarding the allelic richness, no significant difference was observed among the different sampling sites or the different island countries.

3.1.2. Genetic structure of the samples

The AMOVA results indicated statistically moderate genetic differentiation for all samples ($F_{ST} = 0.136$; $P < 0.001$). F_{ST} among the studied sample sites ranged from 0.05 to 0.24 (Table 3). The highest F_{ST} value was obtained between Ouvea (NC) and Vaitahu (FP) with 0.24. The two lowest results were obtained between Suva (FJ) and Lautoka (FJ) on one hand, while between Poindimie (NC) and Noumea (NC) on the other hand with a score of 0.05.

Table 2. Genetic variability parameters estimated for the 9 microsatellites markers analyzed for all mosquito samples.

	AC1			AC2			AC4			A1			AG1			AG5			CT2			B2			B3			All Loci			
	N _{all}	R _s	F _{is}	N _{all}	R _s	F _{is}	N _{all}	R _s	F _{is}	N _{all}	R _s	F _{is}	N _{all}	R _s	F _{is}	N _{all}	R _s	F _{is}	N _{all}	R _s	F _{is}	N _{all}	R _s	F _{is}	N _{all}	R _s	F _{is}	N _{all}	R _s	F _{is}	
Poi-NC	6	6	0,015	4	4	-0,06	4	4	-0,07	3	3	0,376	5	4,97	0,348	4	4	-0,08	2	2	0,223	5	4,97	0,173	3	3	-0,02	36	4	0,086	
Nou-NC	6	6	-0,01	4	4	-0,08	3	3	0,095	5	5	0,038	5	5	-0,12	2	2	0,262	2	2	0,262	2	2	0,721	2	2	-0,32	33	4	0,045	
Ouv-NC	4	3,97	0,139	3	3	-0,24	5	4,97	-0,05	3	3	0,206	5	6,93	0,051	5	5	0,059	2	2	0,296	3	2,97	-0,07	3	3	-0,11	33	4	0,017	
Lau-F	6	5,97	0,01	3	3	0,033	2	2	-0,18	5	4,97	-0,1	4	4	0,025	7	7	0,132	4	4	3,97	-0,11	4	4	-0,09	3	3	-0,3	38	4	-0,055
Suv-F	5	5	-0,23	4	4	-0,12	2	2	-0,39	5	4,97	-0,03	4	4	0,146	6	5,97	-0,08	3	2,97	0,138	4	4	-0,39	4	4	-0,2	37	4	-0,128	
Hav-T	6	5,93	0,158	4	3,967	0,119	2	2	0,141	5	4,97	-0,14	3	3	0,162	4	4	0,136	4	4	-0,15	4	3,97	-0,67	5	4,97	0,186	37	4	0,009	
Mat-FP	4	4	-0,16	4	3,967	0,056	2	2	0,102	4	4	0,037	4	4	0,03	5	5	-0,09	2	2	-0,06	3	3	0,127	3	3	-0,09	31	3	-0,013	
Pap-FP	4	4	0,165	4	3,967	0,157	2	2	-0,21	4	4	-0,04	4	4	0,107	5	5	0,113	3	3	-0,1	5	4,97	-0,22	4	3,97	-0,21	35	4	-0,004	
Vai-FP	4	4	0,075	3	3	0,238	2	2	-0,14	2	2	0,125	5	5,97	-0,19	5	5	0,045	4	3,93	-0,08	5	5	-0,07	2	2	0,065	32	4	0,029	
New Caledonia	6	5,98	0,145	4	3,973	-0,11	5	4,33	-0,05	3	3	0,261	5	5,67	0,169	6	5,79	0,039	2	2	0,283	5	4,24	0,286	3	3	-0,1	39	4	0,103	
Fiji	6	5,5	-0,1	4	3,994	-0,02	2	2	-0,22	5	4,75	-0,06	4	3,99	0,1	8	7	0,055	5	4	0,033	5	4,88	-0,14	4	3,94	-0,25	43	5	-0,062	
Tonga	6	5,93	0,158	4	3,967	0,119	2	2	0,141	5	4,97	-0,14	3	3	0,162	4	4	0,136	4	4	-0,15	4	3,97	-0,67	5	4,97	0,186	37	4	0,009	
French Polynesia	4	4	0,082	4	3,999	0,237	2	2	-0,09	5	4,11	0,17	5	5,11	0,059	7	6,02	0,143	4	3,33	0,074	5	4,79	-0,01	4	3,79	0,092	40	4	0,099	
All samples	8	7,99	0,123	4	4	0,142	5	4,99	0,104	6	6	0,228	6	8,99	0,172	9	9	0,129	8	7,99	0,131	6	6	0,061	5	5	-0,02	57	6	0,12	

Nall corresponds to the number of scored alleles; Rs represents the Allele Richness; FIS indicates the Inbreeding coefficient.

Table 3. Pairwise FST values for the nine populations studied and geographic distances between the sampling sites (in km).

	Poi-NC	Nou-NC	Ouv-NC	Lau-FJ	Suv-FJ	Hav-TG	Tub-FP	Pap-FP	Vai-FP
Poi-NC	-	182	130	1318	1412	2017	4643	4737	6050
Nou-NC	0,051	-	176	1255	1338	1899	4505	4618	5946
Ouv-NC	0,094	0,097	-	1188	1282	1894	4527	4613	5923
Lau-FJ	0,161	0,110	0,185	-	122	865	3499	3498	4763
Suv-FJ	0,122	0,094	0,148	0,051	-	744	3378	3383	4656
Hav-TG	0,156	0,145	0,168	0,136	0,064	-	2657	2720	4053
Tub-FP	0,187	0,176	0,154	0,112	0,110	0,175	-	647	1854
Pap-FP	0,108	0,117	0,149	0,087	0,095	0,141	0,083	-	1408
Vai-FP	0,162	0,172	0,238	0,166	0,148	0,198	0,188	0,130	-

Below diagonal, FST values, statistical significance was 0.05. Above diagonal, geographical distances (km) between the sample sites.

Globally the FST results for Vaitahu (FP) were higher than the others (ranging from 0.13 to 0.24). Moreover, statistically high differences were observed between the New Caledonia samples and the samples of central (FJ and TG) and eastern Pacific (FP). The results of the Mantel test demonstrated a significant correlation between the genetic differentiation and

the geographical distance ($r = 0.6164$; $P < 0.001$) (Figure 2) for the Pacific samples analyzed.

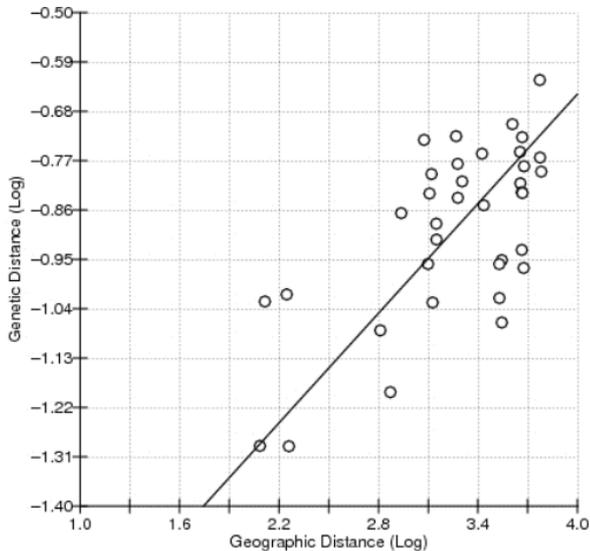


Figure 2. Correlation between the geographic and genetic distance matrices. The regression line corresponds to the standard major axis regression between pairwise genetic distances and logarithmic geographic distances with equation: $F_{st} = -0.1620 + 0.09113 \cdot \log(\text{geographic distance})$. The relationship was significant (Mantel test: $Z = 16.3746$; $r = 0.6164$; $P < 0.001$).

The Bayesian analysis performed, with the Evanno *et al* method (37), revealed that the most likely number of

clusters were $K=2$, $K=4$ (highest probability) and $K=7$. These three clustering models were further analyzed. The two-cluster plot ($K=2$) indicates a differentiation between the samples of New Caledonia (West Pacific) on one hand, Fiji, Tonga (Central Pacific) and French Polynesia (East Pacific) on the other hand (Figure 3). The four-cluster plot ($K=4$) highlights a differentiation between the samples of Fiji and Tonga. The Suva samples seemed to be more differentiated than the Lautoka or Havelu samples. For French Polynesia the Vaitahu samples appeared to be a separate cluster and the Papeete individuals looked to be more diversified than the other FP samples. The seven-cluster plot ($K=7$) confirmed the results obtained with the AMOVA: a high diversity for Suva and Papeete, mid-diversity for Noumea/Poindimie and Lautoka and isolation of Ouvea, Havelu, Tubuai and Vaitahu.

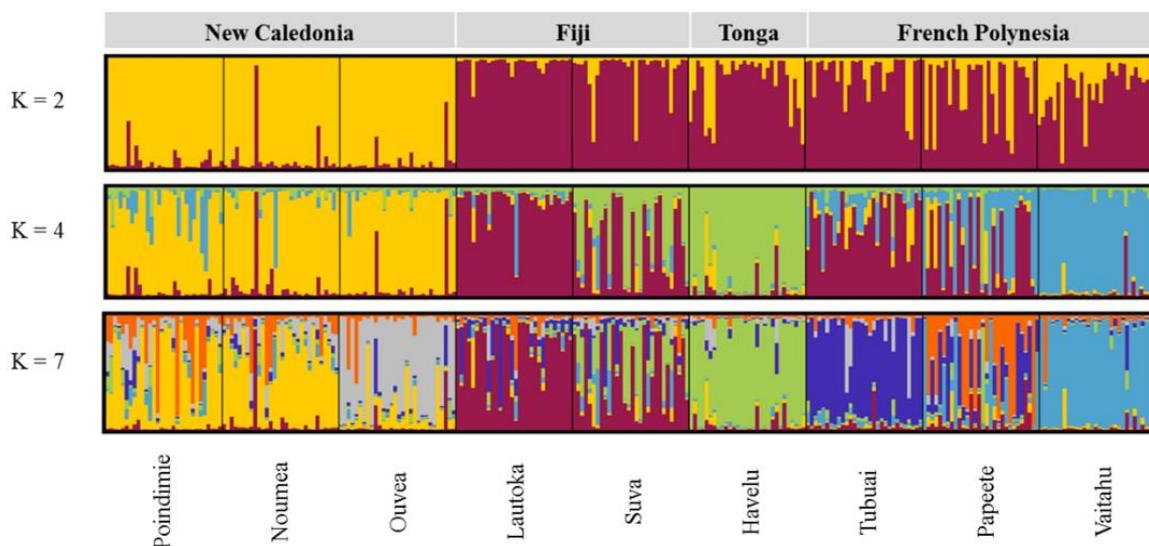


Figure 3. Model-based clustering of 270 *Ae. aegypti* individuals using STRUCTURE software. Each individual is represented by a single vertical line; sample sites are separated by a black line; the whole sample is divided into K colors representing the number of clusters assumed. The colors show the estimated individual proportions of cluster membership.

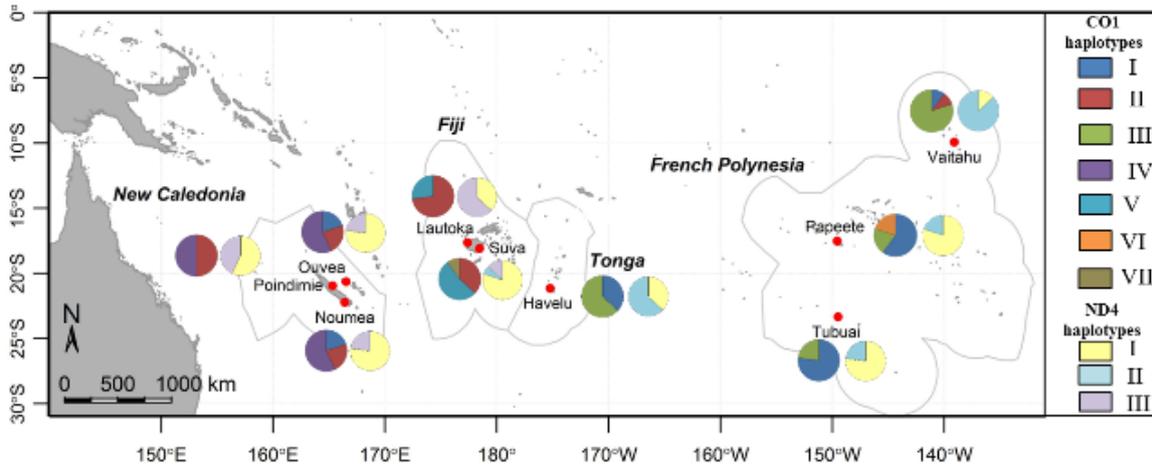


Figure 4. Representation of the MtdNA haplotype frequencies within the sample sites. The left circles indicate the CO1 haplotype frequencies and the right circles the ND4 haplotype frequencies. The arc length of each slice is proportional to the haplotype frequencies (as an example a semicircle represents 15 samples). Haplotype frequencies are indicated in Table S1.

3.2. MtdNA phylogeny analysis

3.2.1. CO1 gene diversity

All 270 individuals were analyzed for their CO1 sequence. The 711 bp alignment revealed the presence of seven distinct haplotypes (Figure 4, 5 and Table S1, S2) and a nucleotide diversity of $\pi = 0.00177$. Haplotype I (frequency = 0.25) was present in all islands except in Poindimie (NC) and in Fiji. Haplotype II (frequency = 0.24) was present in New Caledonia, Fiji and Vaitahu (in FP). Haplotype III (frequency = 0.21) was found in eastern islands (FP). Haplotype IV (frequency 0.18) seemed to be exclusively present in NC. The haplotype V (frequency = 0.09) was present only in Fiji. Haplotype VI (frequency = 0.02) was present only in Papeete (FP). And haplotype VII (frequency = 0.01) appeared to be exclusive to Suva (FJ). Haplotype II seemed to be the link between the different CO1 haplotypes in the Pacific region (Figure 5A). Haplotype VI

appeared to derive from haplotype I with a single mutation. A link between haplotype VII and haplotypes III and V seemed to be present. Tajima's D statistic ($D = 1.02758$, $P > 0.10$), used to determine the departure from neutrality, was not significant but suggested a balancing selection or a decrease in population size due to the presence of multiple alleles, some at low and other at high frequencies. Fu and Li's statistics were positive but not significant ($F^* = 1.17029$, $P > 10$; $D^* = 0.95715$, $P > 0.10$) and confirmed the Tajima's D result.

3.2.2. ND4 gene diversity

Partial ND4 sequence was analyzed for all individuals (Figure 4, 5 and Table S1, S2). The 320 bp alignment revealed the presence of three distinct haplotypes and a nucleotide diversity of $\pi = 0.00203$. Haplotype I (frequency = 0.59) was present in all Pacific samples. As for haplotype II (frequency = 0.22) the results demonstrated its presence only in central

and eastern islands from Suva to Vaitahu. Haplotype III (frequency = 0.19) was present in the western islands from Poindimie (NC) to Suva (FJ). Haplotypes II and III seem to derive from haplotype I with only a single nucleotide difference (Figure 5B). The departure from neutrality, indicated by Tajima's D statistic, was not significant ($D = 1.131386$, $P > 0.10$). Fu and Li's statistics were positive but not significant

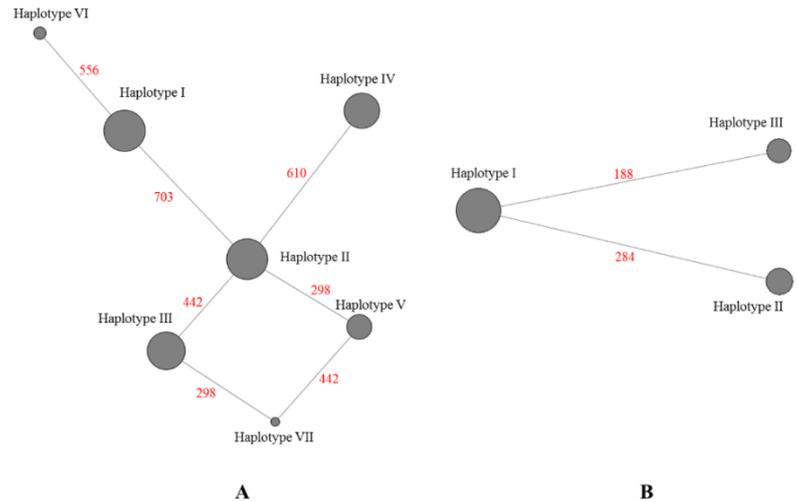


Figure 5. Median-joining network obtained with the haplotypes of all samples. A- Representation for the mtDNA CO1 sequences. B- Representation for mtDNA ND4 sequences. The diameters of grey circles represent the frequency of each haplotype for all individuals. The red number indicates the position of the mutation on the analyzed sequences.

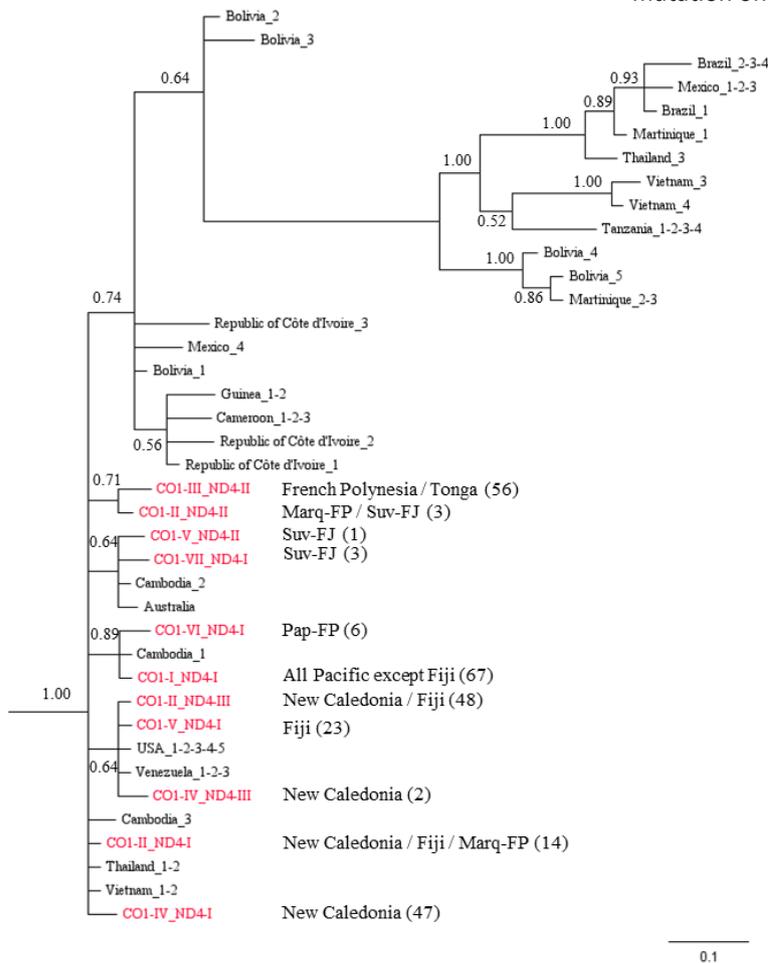


Figure 6. Phylogenetic tree obtained with a Bayesian inference of concatenated CO1 and ND4 sequence data. Numbers in parentheses indicate the number of samples belonging to this haplotype. For the Australian sample, only the CO1 sequence was available. Rooting was inferred from DNA sequences of *Anopheles pullus* and *Culex quinquefasciatus* but were not represented for clarity

either ($F^* = 0.99728$, $P > 0.10$; $D^* = 0.61853$, $P > 0.10$).

3.2.3. Associated CO1-ND4 sequences analysis

The sequences of CO1 and ND4 were concatenated to perform a phylogenetic analysis with published mtDNA sequences from extra-Pacific *Ae. aegypti* specimens (Figure 6 and Table S3). The phylogenetic tree obtained indicated the presence of a main combined haplotype in Pacific samples (CO1-I / ND4-I) originating from Asia. Specimens from the West Pacific (NC and FJ) were both linked to American mosquitoes and to Asian mosquitoes. A haplotype of Papeete-FP originated from Asia. Two haplotypes of Suva-FJ seemed to be linked to Australian specimens

(CO1 mtDNA) and Asian specimens. The other samples principally of French Polynesia, Tonga and Suva-FJ were not clearly affiliated. The PCoA performed on associated CO1-ND4 sequences (Figure S1) corroborated the results obtained. Indeed, it underlined three origins: Asian, American and Australian.

4. Discussion

The spread of *Ae. aegypti* in the Pacific took decades (6, 14, 18, 19). The presence of this vector contributed to an explosive arbovirus situation in the Pacific region since the year 2010. Pacific Island Countries and Territories tried to limit the importation of *Ae. aegypti* in new territories through the establishment of control measures at sea-ports and airports. These measures may have prevented the increase of mosquito populations, but no evidence of eradication of the vector was ever recorded as it was in South American or Mediterranean countries (40, 51, 52).

Our results indicate the presence of multiple clusters in the mosquito samples from the Pacific islands (40). Our *Ae. aegypti* samples are linked to *Ae. aegypti* originating from the Americas, South-East Asia and Australia (Figure 6 and Figure S1). The introduction of the Asian lineage in New Caledonia could be linked to i) whaling industry and the sandalwood commerce between China/Australia/Pacific (Fiji and New Caledonia) in the years 1800-1850 (53) and ii) the immigration of Asian

workers to New Caledonia during the years 1900-1940 for the mining industry (54). In French Polynesia the presence of the Asian lineage could be linked to a substantial immigration of Chinese people, with three waves of immigration : the first one in 1865, then from 1907 to 1914 and lastly from 1921 to 1925 (13). The presence of *Ae. aegypti* of the American origin in the Pacific could be associated with the whaling activity during the XIXth century, and to the presence of the US navy during World War II. From 1942 to 1945, New Caledonia was a support base and a key location for the US and Allied troops fighting in the Pacific War. The NC human population doubled during this period, and a dramatic increase in trade and economic activity took place. Furthermore, between the years 1880 and 1910, most importations into New Caledonia came from Australia, the United States and France with at least one ship calling at Noumea every two days (55). In Fiji, the link with the Australian cluster could be related to the sugar cane and sandalwood trade between the two countries (53). The principal commercial exchanges of Fiji, where a large proportion of the current population is of Indian origin, were with India, South-East Asia, Australia, the United States, and Europe (55). The same commerce pattern is valid for Tonga. It is important to note that although this *Ae. aegypti* migration through the Pacific started during the nineteenth century, it might still be a current phenomenon. Indeed, *Ae. aegypti* was first recorded in

New Caledonia's outer islands Mare and Lifou only in the 90's and on Isle of Pins in 2003 (56). In French Polynesia, *Ae. aegypti* was first recorded in the Austral Islands in 1984 (14). On another hand, *Ae. albopictus* is currently invading the Pacific region, it has been reported in Fiji in 1988 (57), in Tonga in 2011 (58) and in Vanuatu in 2012 (59) but not yet in French Polynesia and New Caledonia (8, 60).

The presence of mitochondrial pseudogenes was observed in Fiji mosquitoes (two samples for Suva and one for Lautoka) for CO1 mtDNA (Haplotype CO1-V and CO1-VII, Figure 5 and Table S2) with difficult distinction between a C and a T nucleotide. The presence of pseudogenes has already been demonstrated in *Ae. aegypti* nuclear genome. This genetic phenomenon, called heteroplasmy, was highly prevalent in previous studies (61, 62). Among all the populations studied, it is interesting to note that this heteroplasmy was found only in Fiji samples, where haplotype distribution from eastern and western Pacific overlap, thus suggesting that Fiji might act as a hub regarding *Ae. aegypti* diversity.

In general, the genetic diversity observed within the Pacific was lower than the genetic diversity observed in studies implemented in Africa (63) or South America (51). Comparing these works to our context, a decrease in diversity was commonly observed in other islands and especially in Martinique (64) or Dominica (51) in the Caribbean. The genetic diversity

seemed to be linked with the isolation of the island, and a low level of genetic exchanges between different islands was shown in French Polynesia (25, 64). These results were confirmed by the presence of high correlation in the Mantel test (Figure 2) and suggest that even short range mosquitoes like *Ae. aegypti* can disperse readily within an island, each island having its own diversity.

Our results also indicate a clear structure differentiation between New Caledonia samples and the mosquitoes of Central (FJ and TG) and East Pacific (FP) (Figure 3). It is interesting to note, that mosquito specimens collected on the same island (ie: Noumea/Poindimie and Lautoka/Suva) are more homogeneous compared to samples from different islands (ie: Ouvea, Havelu, Tubuai and Vaitahu) which are more isolated. As a fact, in 1958, *Ae. aegypti* was restricted to Noumea and its suburbs (65). The first mention of this species in Ouvea was reported in 1962 (6). Indeed, whereas travel between Noumea and Poindimie is easy by road, Ouvea has remained quite isolated from the main island, which is corroborated by the *Ae. aegypti*-free status of the other Loyalty islands until the end of the 1990s(66, 67).

The mosquitoes of Noumea, Suva and Papeete were more genetically mixed. New Caledonia, French Polynesia and Fiji have the largest economies in the South Pacific region (68), thus underlining the importance of the sea-ports in this specific

structure. Indeed, in New Caledonia, the Nickel industry represents 75% of the export of goods: mainly to Asia, Australia and Europe. For mosquitoes collected in central Pacific islands, a differentiation was observed between Lautoka (FJ) and Havelu (TG). The genetic link between Fiji and Tonga could be explained by the relative proximity of these two island countries and the volume of trade between them. Furthermore, the goods and services importation/exportation are promoted between English or French speaking countries (12).

Environmental conditions and ecosystems could have an impact on the structure of the *Ae. aegypti* population. Insecticides use both for agriculture and vector control can exert specific environmental constraints. Among the different island countries, insecticide use has been implemented in different ways. In New Caledonia, malathion (organophosphate) was used until the end of the 1980s when it was replaced by deltamethrin (pyrethroid). Malathion was reintroduced in 2005 due to the detection of mosquito resistance to pyrethroids and used until present day (69). In French Polynesia, only malathion was used before the year 2000. Malathion was then used alternatively with pyrethroids. In Tonga, malathion was used until the end of the twentieth century and was then replaced by pyrethroids. These different vector control strategies could have an impact on the genetic structure of the *Ae. aegypti*

population (64), (due to genetic bottlenecks) along with other environmental factors (climate, human influence...).

This is, to our knowledge, the first study carried out on a Pacific scale dealing with the genetic diversity and phylogeny of *Ae. aegypti*. The genetic specificity could have an impact on vector competence for the arbovirus especially for dengue virus (70-72). In the Pacific region, the arboviral outbreaks impacted island countries at different times (4). The genetic structure in the Pacific region indicates a western, central and eastern differentiation between the *Ae. aegypti* samples. Previous studies reported that the vector competence of *Ae. aegypti* for dengue virus is linked to the mosquito genetic factor and to the dengue virus strain (72, 73). Thus characterization of vector competence for arboviruses in Pacific island mosquitoes is also an important issue deserving investigation.

5. Acknowledgments

We thank Olivia O'Connor for her valuable suggestions during the project. We thank Subdivision Santé des Australes (Patricia Anania and Mathias Ellacott) and for assistance in mosquito sampling in Tubuai, the Heads of Units Drs Mike Kama, Eric Rafai (Fiji), Dr Reynold 'Ofanoa (Tonga) and all the Environmental Health Inspectors who participated in the field collection and laboratory rearing, particularly Mrs Kelera Oli and Alisi

Tokailagi, Mr Waqa Tikoisuva and Kareleli Voi (Fiji) and Mr Uatesoni Tu'Angalu and Siaola Mahe (Tonga). We thank Mrs Sela 'Akolo Fa'u for revision of the manuscript. We are grateful to Secretariat of the Pacific Community for the help in coordination and data access. We thank Nicolas Pocquet for scientific discussion on *Ae. aegypti*. We thank Evelyne Henriot, Yves Mermoud, José-Louis Barbançon for sharing information regarding the past colonization of New Caledonia. Sequencing and genotyping were performed on “La Plateforme du Vivant”, Noumea, New Caledonia.

This work was funded by the “Agence Française pour le Développement (AFD)” through the Pacific Fund (CZT102701R/n°1162, CNC194801X/n°1272, UO0209CSOLD988/n°1439) and by the Government of New Caledonia (CS123007063/n°1162).

6. Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MDR LG FMD, HB. Performed the experiments: EC. Analyzed the data: EC LM, MT. Contributed reagents/materials/analysis tools: EC MDR LG SK JM HB VR AF. Contributed to the writing of the manuscript: EC MDR LG LM FMD. All authors revised the manuscript.

7. References

1. Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*. 2010;85(2):328-45.

2. Singh N, Kiedrzyński T, Lepers C, Benyon EK. Dengue in the Pacific--an update of the current situation. *Pac Health Dialog*. 2005;12(2):111-9.
3. Cao-Lormeau V-M, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet*. 384(9954):1571-2.
4. Roth A MA, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, Guillaumot L, Souarès Y. . Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. . *Euro Surveill*. 2014;19(41):20929.
5. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, *et al*. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014: *Emerg Infect Dis*. 2015 Feb;21(2):381-2. doi: 10.3201/eid2102.141553.
6. Belkin JN. The mosquitoes of the South Pacific: Diptera, Culicidae. Berkeley, University of California Press 1962;Vol. 1.
7. Rao NP, Rai KS. Inter and intraspecific variation in nuclear DNA content in *Aedes* mosquitoes. *Heredity*. 1987;59(2):253-8.
8. Guillaumot L. Arboviruses and their vectors in the Pacific--status report. *Pac Health Dialog*. 2005;12(2):45-52.
9. Horwood P, Bande G, Dagina R, Guillaumot L, Aaskov J, Pavlin B. The threat of chikungunya in Oceania. *Western Pac Surveill Response J*. 2013;4(2):8-10.
10. Lounibos LP. Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*. 2002;47(1):233-66.
11. Paupy C, Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population density. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62(2):217-24.
12. Rallu J-L. Tendances récentes des migrations dans le Pacifique Sud. In: Espace, population, sociétés. Les populations du Pacifique - Populations of the Pacific. 1994-2:201-12.
13. Rallu J-L. Démographie des territoires français d'Océanie. In: *Revue française d'histoire*

- d'outre-mer. La France du Pacifique. 1989;76 (n°284-285, 3e et 4e trimestre 1989):45-62.
14. ORSTOM. Atlas de Polynésie Française. Editions de l'ORSTOM, Paris, France. 1993.
 15. Chungue E DX, Murgue B. Dengue in French Polynesia: Major features, surveillance, molecular epidemiology and current situation. *Pac Health Dialog*. 1998;5:154-62.
 16. Carrington LB, Simmons CP. Human to Mosquito Transmission of Dengue Viruses. *Frontiers in Immunology*. 2014;5:290.
 17. Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. *Am J Trop Med Hyg*. 1954;3(5):878-82.
 18. Perry WJ. The mosquitoes and mosquito-borne diseases on New Caledonia, an historic account; 1885-1946. *Am J Trop Med Hyg*. 1950;30(1):103-14.
 19. Chow CY. *Aedes aegypti* in the Western Pacific Region. *Bulletin of the World Health Organization*. 1967;36(4):544-6.
 20. Kuno G. Research on dengue and dengue-like illness in East Asia and the Western Pacific during the First Half of the 20th century. *Reviews in Medical Virology*. 2007;17(5):327-41.
 21. Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D'Ortenzio E, Thiberge JM, *et al*. Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(12):1036-41.
 22. Lardeux F, Riviere F, Sechan Y, Loncke S. Control of the *Aedes* vectors of the dengue viruses and *Wuchereria bancrofti*: the French Polynesian experience. *Ann Trop Med Parasitol*. 2002;96(2):S105-16.
 23. Nhan TX, Claverie A, Roche C, Teissier A, Colleuil M, Baudet JM, *et al*. Chikungunya virus imported into French polynesia, 2014: *Emerg Infect Dis*. 2014 Oct;20(10):1773-4. doi: 10.3201/eid2010.141060.
 24. Raju AK. Community Mobilization in *Aedes aegypti* Control Programme by Source Reduction in Peri-Urban District of Lautoka, Viti Levu, Fiji Islands. 2003; *Dengue Bulletin*(27):149-55.
 25. Failloux AB, Darius H, Pasteur N. Genetic differentiation of *Aedes aegypti*, the vector of dengue virus in French Polynesia. *J Am Mosq Control Assoc*. 1995;11(4):457-62.
 26. Slotman M, Kelly N, Harrington C, Kitthawee S, Jones W, Scott T, *et al*. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. *Mol Ecol Notes*. 2007;7:168 - 71.
 27. Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, *et al*. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2011;278(1717):2446-54.
 28. Lovin DD, Washington KO, deBruyn B, Hemme RR, Mori A, Epstein SR, *et al*. Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. *BMC Genomics*. 2009;10(590):1471-2164.
 29. Peakall R, Smouse PE. GenAEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*. 2012;28(19):2537-9.
 30. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. 2004;4(3):535-8.
 31. El Mousadik A, Petit RJ. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. *Theoret Appl Genetics*. 1996;92(7):832-9.
 32. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. *Journal of Heredity*. 1995;86(6):485-6.
 33. Belkhir K BP, Chikhi L, Raufaste N and Bonhomme F. (1996-2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).

34. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*. 2005;1:47-50.
35. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. *Genetics*. 2000;155(2):945-59.
36. Earl D, vonHoldt B. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genet Resour*. 2012;4(2):359-61.
37. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*. 2005;14(8):2611-20.
38. Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. *Mol Ecol Resour*. 2015;12(10):1755-0998.
39. Jensen JL, Bohonak, A.J., and Kelley, S.T. . Isolation by distance, web service. . *BMC Genetics* 6: 13 v323 <http://ibdwsdsu.edu/> 2005.
40. Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja Simon Z, *et al*. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012;12(6):1260-9.
41. da Costa-da-Silva AL, Capurro ML, Bracco JE. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti (Diptera: Culicidae)* from Peru. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005;100:539-44.
42. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999;41:95-8.
43. Tajima F. The Effect of Change in Population Size on DNA Polymorphism. *Genetics*. 1989;123(3):597-601.
44. Fu YX, Li WH. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 1993;133(3):693-709.
45. Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997;147(2):915-25.
46. Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003;19(18):2496-7.
47. Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999;16(1):37-48.
48. Fluxus Technology Ltd 2004-2015 NETWORK 4.6.1.3. <http://www.fluxus-engineering.com/shareneth.htm>.
49. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003;19(12):1572-4.
50. Perrier X, Flori, A. , Bonnot, F. Data analysis methods. Hamon, P, Seguin, M, Perrier, X, Glaszmann, J C Ed, Genetic diversity of cultivated tropical plants. 2003;Enfield, Science Publishers. Montpellier.: 43 - 76.
51. Monteiro FA, Schama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8(9):e3167.
52. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*--a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;1:11-7.
53. Shineberg D. They came for Sandalwood. A study of the sandalwood trade in the South-West Pacific, 1830-1865. 1967.
54. IRD. Atlas de la Nouvelle-Calédonie IRD Éditions, Marseille, France. 2012.
55. Survey. NZDoLa. Atlas of the South Pacific. Wellington New Zealand Government Printing Office. 1986.
56. Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. IPNC - Rapport technique Année 2003. www.institutpasteur.nc/rapports-dactivites/2003.
57. Laille M, Fauran P, Rodhain F. [The presence of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the Fiji Islands]. *Bull Soc Pathol Exot*. 1990;83(3):394-8.
58. Guillaumot L, Ofanoa R, Swillen L, Singh N, Bossin HC, Schaffner F. Distribution of *Aedes albopictus (Diptera, Culicidae)* in southwestern

- Pacific countries, with a first report from the Kingdom of Tonga. *Parasit Vectors*. 2012;5(247):1756-3305.
59. Guillaumot L. Entomological survey on Efate - Vanuatu to assess the statut of the mosquito *Aedes albopictus*. 2013;Doc. n°41/2013-IPNC-URE-EM/LG/DG, 7th of February 2013.
60. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveill*. 2014;19(41):20929.
61. Hlaing T, Tun-Lin W, Somboon P, Socheat D, Setha T, Min S, *et al.* Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genetics*. 2009;10(1):11.
62. Paduan Kdos S, Ribolla PE. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J Med Entomol*. 2008;45(1):59-67.
63. Paupy C, Brengues C, Ndiath O, Toty C, Hervé J-P, Simard F. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010;10(4):473-80.
64. Marcombe S, Paris M, Paupy C, Bringuier C, Yebakima A, Chandre F, *et al.* Insecticide-driven patterns of genetic variation in the dengue vector *Aedes aegypti* in Martinique Island. *PLoS One*. 2013;8(10).
65. Rageau J. La répartition géographique des moustiques en Nouvelle-Calédonie et dépendances. CPS. 1958;Document technique n°117.
66. Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. IPNC - Rapport technique Année 1996. www.institutpasteur.nc/rapports-dactivites/1996.
67. Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. IPNC - Rapport technique Année 1999. www.institutpasteur.nc/rapports-dactivites/1999.
68. ISEE. Bilan économique et social 2014 - Echanges extérieurs Institut de la Statistique et des Etudes Economiques Nouvelle-Calédonie. 2014.
69. Huerre M, Camprasse MA, Laille M. Problèmes posés par les épidémies de dengue. L'exemple des foyers d'Océanie. Situation mondiale actuelle et dans les DOM-TOM. *Médecine et Maladies Infectieuses*. 1995;25, Supplement 7(0):688-95.
70. Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, *et al.* Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol*. 2009;9(160):1471-2148.
71. Failloux AB, Vazeille M, Rodhain F. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *J Mol Evol*. 2002;55(6):653-63.
72. Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(1):249-77.
73. Tabachnick W. Genetics of Insect Vector Competence for Arboviruses. In: Harris K, editor. *Advances in Disease Vector Research*: Springer New York; 1994. p. 93-108.

Supplementary data

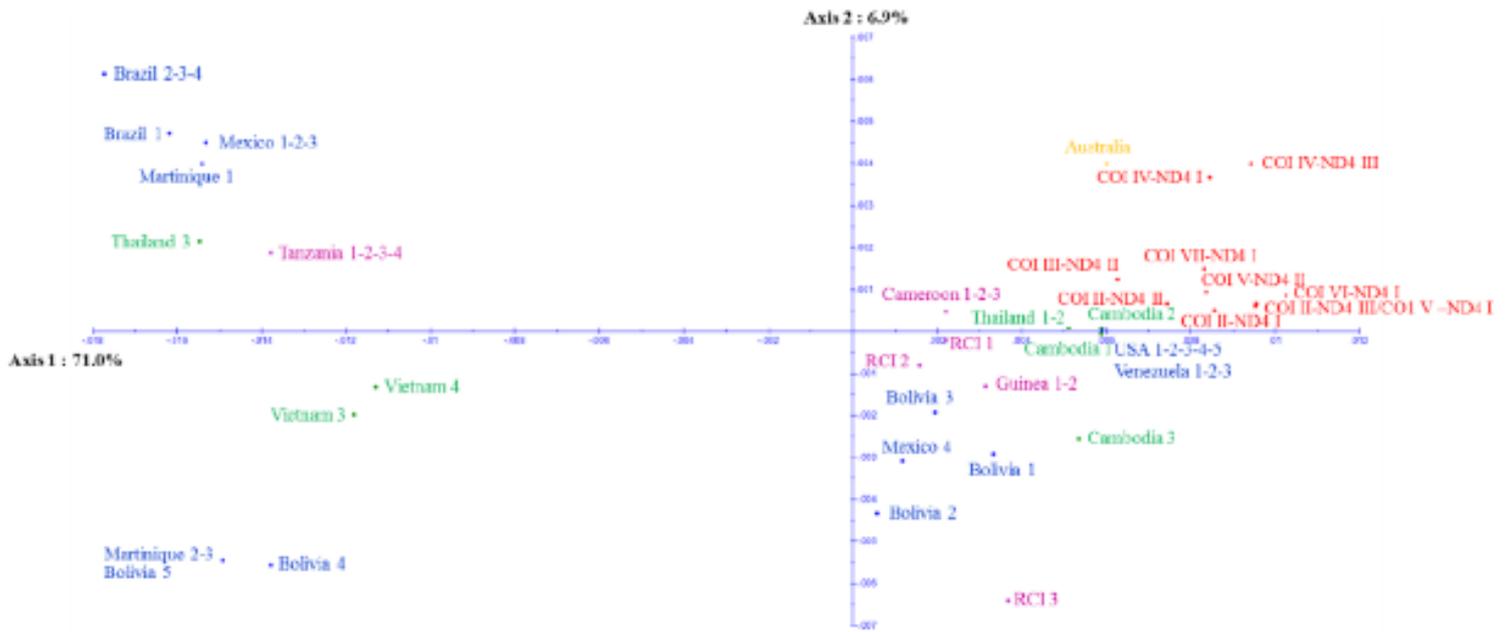


Figure S1: Factorial Correspondence Analysis of combined CO1-ND4 genes. The colour indicates the geographical sample origin: blue represents American samples, green Asian samples, purple African samples, yellow Australian samples and red Pacific samples. Both axis represent 77.9% of the variability in the dataset.

Table S1. Frequencies of CO1 and ND4 haplotypes for all sample sites and for each island.

Locality	N	CO1							N	ND4		
		I	II	III	IV	V	VI	VII		I	II	III
Poi-NC	30	-	0.50	-	0.50	-	-	-	30	0.57	-	0.43
Nou-NC	30	0.20	0.23	-	0.57	-	-	-	30	0.77	-	0.23
Ouv-NC	30	0.20	0.23	-	0.57	-	-	-	30	0.77	-	0.23
Lau-FJ	30	-	0.73	-	-	0.27	-	-	30	0.37	-	0.63
Suv-FJ	30	-	0.37	-	-	0.53	-	0.1	30	0.80	0.07	0.13
Hav-TG	30	0.37	-	0.63	-	-	-	-	30	0.37	0.63	-
Tub-FP	30	0.77	-	0.23	-	-	-	-	30	0.77	0.23	-
Pap-FP	30	0.60	-	0.20	-	-	0.20	-	30	0.80	0.20	-
Vai-FP	30	0.10	0.1	0.80	-	-	-	-	30	0.13	0.87	-
All samples	270	0.25	0.24	0.21	0.18	0.09	0.02	0.01	270	0.59	0.22	0.19

N Number of individual analyzed.

Roman numerals indicate the name of CO1 or ND4 haplotypes.

Table S2. MtDNA haplotype sequences for CO1 and ND4 across *Ae. aegypti* Pacific samples.

Haplotype	N	Polymorphic positions				
CO1						
		298	442	556	610	703
Haplotype I	67	T	T	G	G	A
Haplotype II	65	•	•	•	•	T
Haplotype III	56	•	C	•	•	T
Haplotype IV	49	•	•	•	A	T
Haplotype V	24	C	•	•	•	T
Haplotype VI	6	•	•	A	•	•
Haplotype VII	3	C	C	•	•	T
ND4						
		188	284			
Haplotype I	160	G	C			
Haplotype II	60	•	T			
Haplotype III	50	A	•			

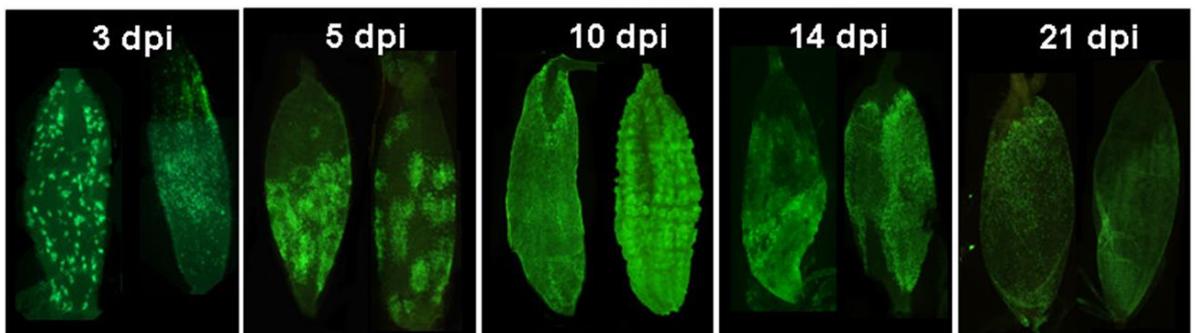
N corresponds to the number of sample belonging to this haplotype.

Table S3. MtDNA sequence informations of Pacific samples and reference sequences.

Geographical Area	Name	Number of specimens	Country	Accession Number	Reference		
CO1							
Pacific	Haplotype I	12	New Caledonia	KT313642	This study		
		11	Tonga	KT313643			
		44	French Polynesia	KT313644			
	Haplotype II	29	New Caledonia	KT313645			
		33	Fiji	KT313646			
	Haplotype III	3	French Polynesia	KT313647			
		19	Tonga	KT313648			
	Haplotype IV	37	French Polynesia	KT313649			
		49	New Caledonia	KT313650			
	Haplotype V	24	Fiji	KT313651			
	Haplotype VI	6	French Polynesia	KT313652			
	Haplotype VII	3	Fiji	KT313653			
	South-America		Australia			DQ026284	Beebe, et al, 2005
			Bolivia 1, 2			JQ926682	Paupy, et al, 2012
		Bolivia 3		JQ926683			
		Bolivia 4		JQ926681			
		Bolivia 5		JQ926676			
		Brazil 1, 2, 3, 4		JQ926703			
		Venezuela 1, 2, 3		JQ926701			
Central America		Mexico 1, 2, 3		JQ926698			
		Mexico 4		JQ926699			
Caribbean		Martinique 1		JQ926696			
		Martinique 2, 3		JQ926697			
North-America		USA 1, 2, 3, 4, 5		JQ926684			
South East Asia		Cambodia 1		JQ926688			
		Cambodia 2		JQ926689			
		Cambodia 3		JQ926690			
		Thailand 1, 2		JQ926691			
		Thailand 3		JQ926692			
		Vietnam 1, 2		JQ926685			
		Vietnam 3		JQ926686			
Africa		Vietnam 4		JQ926687			
		Republic of Côte d'Ivoire 1		JQ926693			
		Republic of Côte d'Ivoire 2		JQ926694			
		Republic of Côte d'Ivoire 3		JQ926695			
		Tanzania 1, 2, 3, 4		JQ926704			
		Cameroon 1, 2, 3		JQ926702			
		Guinea 1, 2		JQ926700			
ND4							
Pacific	Haplotype I	63	New Caledonia	KT313654	This study		
		35	Fiji	KT313655			
		11	Tonga	KT313656			
	Haplotype II	51	French Polynesia	KT313657			
		2	Fiji	KT313658			
	Haplotype III	19	Tonga	KT313659			
		39	French Polynesia	KT313660			
		27	New Caledonia	KT313661			
		23	Fiji	KT313662			
	South-America		Bolivia 1			JQ926708	
			Bolivia 2, 3			JQ926707	
			Bolivia 4, 5			JQ926705	
			Brazil 1			JQ926718	
			Brazil 2, 3, 4			JQ926719	
Central America		Venezuela		JQ926726			
		Mexico 1, 2, 3		JQ926713			
Caribbean		Mexico 4		JQ926714			
		Martinique 1		JQ926711			
North-America		Martinique 2, 3		JQ926712			
		USA 1, 2, 3, 4, 5		JQ926725			
South East Asia		Cambodia 1, 2, 3		JQ926722			
		Thailand 1, 2		JQ926720			
		Thailand 3		JQ926721			
		Vietnam 1, 2		JQ926723			
		Vietnam 3, 4		JQ926724			
Africa		Republic of Côte d'Ivoire 1, 2		JQ926709			
		Republic of Côte d'Ivoire 3		JQ926710			
		Tanzania 1, 2, 3, 4		JQ926715			
		Cameroon 1, 2, 3		JQ926716			
		Guinea 1, 2		JQ926717			

Chapitre 2 :

Etude de la compétence vectorielle d'*Aedes aegypti* pour le virus de la dengue 1



Adapté de Salazar *et al*, 2007

Chapitre 2 : Etude de la compétence vectorielle d'*Aedes aegypti* pour le virus de la dengue 1

2.1. Contexte de l'étude et démarche expérimentale

Le DENV est l'arbovirus ayant le plus circulé dans la région Pacifique et notamment en Nouvelle-Calédonie. Depuis la fin du 19^{ème} siècle c'est le sérotype 1 qui a été le plus recensé (Cao-Lormeau and Musso, 2014; Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2014). En Nouvelle-Calédonie, les épidémies de dengue touchent l'ensemble du territoire. Même si la ville de Nouméa rassemble le plus de cas, l'étude du taux d'incidence de la dengue montre un taux plus élevé dans la région nord-est de la Grande Terre (Teurlai *et al.*, 2015). Or la caractérisation génétique du vecteur calédonien *Ae. aegypti*, avec des échantillonnages réalisés dans cette zone de forte incidence, a démontré une différenciation faible du vecteur. Il était donc essentiel de savoir si la différenciation génétique des populations étudiées, à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie, pouvait influencer la transmission du DENV-1 par le vecteur local. L'objectif de cette deuxième partie de thèse est donc d'évaluer, pour la première fois, la compétence vectorielle de différentes populations d'*Ae. aegypti* de Nouvelle-Calédonie pour DENV-1. De plus, les échanges commerciaux et touristiques étant importants entre la Nouvelle-Calédonie et la Polynésie Française, et les épidémies d'arbovirus étant souvent dues à l'introduction du virus par le biais d'un voyageur d'une île à l'autre (Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2014), l'habilité de transmission de ce vecteur de Nouméa et de Papeete pour la même souche virale a été étudiée.

Pour déterminer la compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* de Nouvelle-Calédonie, trois populations ont été récoltées au stade immature (larves et nymphes) à Nouméa, Poindimié et Ouvéa, et une souche à Papeete à Tahiti, ces sites de collecte correspondant aux mêmes sites de collecte que pour l'étude de caractérisation génétique d'*Ae. aegypti* dans le Pacifique (Calvez *et al.*, 2016). Des femelles, de la génération F1, âgées de 5 à 7 jours ont été infectées avec une souche de DENV-1 - génotype I, isolée en Nouvelle-Calédonie en 2014 (GenBank KY553285). Les moustiques ont été gorgés pendant 20 minutes à 28°C avec un repas infectieux à 10⁶ FFU/mL. Les femelles gorgées ont été placées à 28°C et 80% d'humidité avec

un cycle jour/nuit de 12h :12h et elles ont été nourries avec une solution sucrée à 10% pendant la durée de l'étude. La collecte des salives a été réalisée à 7, 14 et 21 jours après infection. Les corps et têtes ont été analysés par RT-PCR en temps réel (Warrillow *et al.*, 2002) et les salives par immunofluorescence après inoculation sur cellules C6/36 afin de déterminer la présence de particules virales infectantes.

2.2. Résultats et conclusion

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal *Parasites and Vectors* : « **Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) populations from New Caledonia** » doi.org/10.1186/s13071-017-2319-x.

Les populations d'*Ae. aegypti* de Nouvelle-Calédonie testées ont montré des taux d'infection faibles à modérés (8% à 53%) et une diminution de l'infection a été observée chez les moustiques récoltés à Nouméa et Poindimié. Les taux de dissémination se sont révélés élevés pour toutes les populations (> 60%), cela indique que le DENV-1 arrive à franchir la barrière de la paroi intestinale de toutes les populations de moustiques testées. L'analyse des salives a démontré une efficacité de transmission faible pour l'ensemble des populations testées en Nouvelle-Calédonie (<13%). Ces résultats indiquent un passage limité du virus à travers la paroi des glandes salivaires. Dans notre étude, nous n'avons pas mesuré d'impact du génotype du moustique sur la compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* en Nouvelle-Calédonie pour cette souche de DENV-1.

La comparaison de la compétence vectorielle entre les populations d'*Ae. aegypti* de Nouméa et de Papeete a démontré un taux de dissémination homogène et un taux de transmission significativement supérieur pour la population de Tahiti. Des différences significatives ont aussi été observées pour l'efficacité de transmission, la population d'*Ae. aegypti* polynésienne étant plus apte à transmettre des particules infectieuses de DENV-1 que la population calédonienne. Les résultats d'efficacité de transmission de ces deux populations semblent indiquer que le génotype du moustique, à l'échelle de la région Pacifique, puisse ici avoir un impact pour les interactions *Ae. aegypti* X DENV-1/génotype I.

Ce travail montre pour la première fois que la compétence vectorielle du DENV-1 par le vecteur *Ae. aegypti* de Nouvelle-Calédonie et de Papeete semble faible à modérée. Cette étude étant réalisée dans un environnement contrôlé, les interactions G X G ont été privilégiées. Les résultats ont montré que pour les populations de Nouvelle-Calédonie d'*Ae. aegypti* étudiées, à 7, 14 et 21 dpi, les vecteurs semblent susceptibles à l'infection par le DENV-1 mais modérément compétente pour la transmission du virus. La comparaison de la compétence vectorielle, entre une population de vecteurs de Nouméa et Papeete, a mis en avant une meilleure capacité des moustiques polynésiens à transmettre le DENV-1 après 21 jours d'incubation. Ces résultats ont démontré que même si le vecteur calédonien est compétent pour le DENV-1, il ne faut pas pour autant négliger, dans l'évaluation du risque épidémique, l'importance d'autres facteurs influençant la capacité vectorielle (densité de vecteurs, la durée de vie des moustiques, la fréquence des contacts hôte/vecteurs, ...) et les facteurs environnementaux (température, humidité, ...) (Lefevre *et al.*, 2013). Ce travail indique également la nécessité d'approfondir les connaissances sur la compétence vectorielle du vecteur calédonien *Ae. aegypti* pour les virus circulants dans la région Pacifique et notamment pour les autres sérotypes du DENV et pour le ZIKAV qui s'est propagé rapidement à l'ensemble de la région Pacifique.

2.3. Article 2

Article 2: Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) populations from New Caledonia

Elodie Calvez¹, Laurent Guillaumot¹, Dominique Girault¹, Vaea Richard², Olivia O'Connor¹, Tuterarii Paoaafaite², Magali Teurlai¹, Nicolas Pocquet¹, Van-Mai Cao-Lormeau² and Myrielle Dupont-Rouzeyrol^{1*}

¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, ² Institut Louis Malardé

ABSTRACT

Background: Dengue virus (DENV) is the arbovirus with the highest incidence in New Caledonia and in the South Pacific region. In 2012–2014, a major DENV-1 outbreak occurred in New Caledonia. The only known vector of DENV in New Caledonia is *Aedes aegypti* but no study has yet evaluated the competence of New Caledonia *Ae. aegypti* populations to transmit DENV. This study compared the ability of field-collected *Ae. aegypti* from different locations in New Caledonia to transmit the DENV-1 responsible for the 2012–2014 outbreak. This study also aimed to compare the New Caledonia results with the vector competence of *Ae. aegypti* from French Polynesia as these two French countries have close links, including arbovirus circulation.

Methods: Three wild *Ae. aegypti* populations were collected in New Caledonia and one in French Polynesia. Female mosquitoes were orally exposed to DENV-1 (10⁶ FFU/ml). Mosquito bodies (thorax and abdomen), heads and saliva were analyzed to measure infection, dissemination, transmission rates and transmission efficiency, at 7, 14 and 21 days post-infection (dpi), respectively.

Results: DENV-1 infection rates were heterogeneous, but dissemination rates were high and homogenous among the three *Ae. aegypti* populations from New Caledonia. Despite this high DENV-1 dissemination rate, the transmission rate, and therefore the transmission efficiency, observed were low. *Aedes aegypti* population from New Caledonia was less susceptible to infection and had lower ability to transmit DENV-1 than *Ae. aegypti* populations from French Polynesia.

Conclusion: This study suggests that even if susceptible to infection, the New Caledonian *Ae. aegypti* populations were moderately competent vectors for DENV-1 strain from the 2012–2014 outbreak. These results strongly suggest that other factors might have contributed to the spread of this DENV-1 strain in New Caledonia and in the Pacific region.

Keywords: Dengue virus (DENV), *Aedes aegypti*, New Caledonia, Pacific region, Vector competence.

1. Background

Dengue fever is one of the most prevalent human vector-borne diseases in tropical and subtropical countries. A recent study estimates that 390 million dengue fever infections occur every year worldwide (1). Dengue virus (DENV) is a single-stranded, positive-sense RNA virus of the genus *Flavivirus*, separated in four serotypes (DENV-1 to DENV-4) themselves divided into genotypes (2). Infection by one of these serotypes confers specific and prolonged immunity against that serotype only (3). DENV is transmitted to humans through the bite of mosquitoes of the genus *Aedes*, subgenus *Stegomyia*.

Unlike countries in south-east Asia and Latin America where dengue is hyperendemic, dengue in the Pacific region is characterized by intermittent epidemics of varying severity. During the second half of the twentieth century, dengue epidemics in the Pacific were mainly caused by a single serotype/genotype introduced from another, hyperendemic country. The epidemiology of dengue, however, is heterogeneous; Small Pacific

Island Countries and Territories (PICTs) are affected by DENV transmission for a few months only, while larger PICTs, like New Caledonia (NC) or French Polynesia (FP), may experience active circulation of a single serotype/genotype for several years until the emergence of a new epidemic viral strain (4–8).

In the Pacific region, known vectors of DENV are *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* and other local species (9); *Ae. aegypti* is present throughout the region with the exception of a few isolated islands (10). The introduction of *Ae. aegypti* in the Pacific is relatively recent, starting in the late nineteenth century (9). Previous studies found differences in the genetic structure of Pacific populations of *Ae. aegypti* (11–13), with significant genetic differentiation between *Ae. aegypti* from NC compared to populations from other PICTs (13). In NC, a lower genetic differentiation was observed between the mosquitoes from the main island (Nouméa and Poindimié sampling sites) and the mosquitoes from Ouvéa, a smaller, distant island (13). This genetic

differentiation may impact the vector capacity of the mosquito (14, 15). Indeed, other studies showed that vector competence for DENV may be linked to the genetic background of the vector, such as genes related to the midgut escape barrier, notably the Quantitative Trait Loci (QTL) on the chromosome III (16–18).

New Caledonia is a French territory located in the tropical zone of the South Pacific Ocean. Dengue transmission in NC occurs mainly during the hot-and-rainy season (December to May). Epidemics have a 3–4 years cyclical pattern (4). Dengue epidemics usually last 2 years, with two peaks occurring during the two consecutive hot-and-rainy seasons and few cases reported during the interepidemic cool season. Since World War II, NC has experienced 13 epidemics, caused by all four DENV serotypes. Most of these epidemics occurred after the introduction of a new viral strain either directly from south-east Asia or after emerging in another PICT (19). When a new DENV serotype is introduced in NC, the previously circulating serotype is usually replaced within a few months. This pattern, however, is evolving. After causing severe epidemics in 2003–2004 and again in 2008–2009, DENV-1 unexpectedly re-emerged in 2012–2014 and caused the largest outbreak ever reported in NC (4). The spatial distribution of dengue cases on the main island showed that the East coast was more affected with higher reported

dengue incidence rates than the West coast (20). *Aedes aegypti* is the only mosquito species recognized as being able to transmit DENV in NC but, to date, no study has evaluated its competence to transmit.

In the present study, we aimed to test the susceptibility of *Ae. aegypti* populations from different locations in NC to DENV. We collected three *Ae. aegypti* populations based on DENV cases distribution in NC and performed vector competence assays with a DENV-1 strain isolated during the 2012–2014 outbreak. There are close economics and population exchanges between New Caledonia and French Polynesia and previous work highlighted similarities in arbovirus transmission between these two territories (21–23). In the present study, we therefore compared the vector competence obtained for *Ae. aegypti* from Nouméa, the largest city in New Caledonia, with the vector competence of *Ae. aegypti* from Papeete, the largest city in French Polynesia.

2. Methods

2.1. Mosquitoes

Mosquitoes were sampled at immature stages (larvae and pupae) in three sites in New Caledonia (Nouméa, Poindimié and Ouvéa; Fig. 1) (13) and in one site in French Polynesia (Papeete, Tahiti Island). Larvae and pupae were reared to adult forms

which were maintained at 28 °C and 80% humidity, a 12:12 h light-dark cycle and fed with a 10% sucrose solution. Females were blood-fed several times with guinea pig blood to obtain F1-generation eggs. For all infection assays, F1-eggs were hatched and adults were maintained as described above.

2.2. Viral strain

The viral strain used in this study was a DENV-1 genotype I isolated from a patient in New Caledonia in 2014 (GenBank KY553285). The virus stock was obtained after five passages of 5 days incubation at 28 °C on *Ae. albopictus* C6/36 cells in Leibovitz L15 medium (Sigma- Aldrich,

Saint-Louis, Missouri, USA) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK) and 10% of tryptose phosphate (Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK). The titration of the viral stock was performed using immunofluorescent assays with the anti-dengue virus complex antibody, clone D3-2H2-9-21 (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) and the Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG secondary antibody (Life technologies, Eugene, Oregon, USA) and the results calculated in FFU/ml (Focus Forming Unit).

2.3. Mosquito oral infections



Figure 1. Map showing *Ae. aegypti* sampling sites in New Caledonia, 2015. The three sample sites are represented by red dots. Breeding sites are indicated in parentheses.

Five to seven day-old, never blood-fed F1-females were starved for 24 h before infection. They were allowed to take an infectious blood meal through an artificial system with pig intestine membrane stretched over the Hemotek system (Discovery Workshops, Accrington, UK), containing a mix (2:1) of rabbit washed erythrocytes and viral suspension supplemented with adenosine triphosphate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) at 5 mM. The female mosquitoes were allowed access to the blood meal maintained at 37 °C for 20 min. The average concentration of DENV-1 in blood meals was 106 FFU/ml. After blood-feeding, fully engorged females were transferred into new containers and maintained at 28 °C and 80% humidity with a 12:12 h lightdark cycle and ad libitum access to 10% sucrose.

2.4. Dissemination and transmission analyses

At 7, 14 and 21 days post-infection (dpi) for NC populations and at 21 dpi for the FP population from Papeete (FP-Papeete), 30 mosquito females (except for Nouméa and Papeete at 21 dpi with 25 and 17 mosquitoes, respectively) were randomly collected and cold anesthetized. Legs and wings of each sampled mosquito were removed and the proboscis was inserted for 30 min into a filter tip ART (Thermo Scientific, San Diego, USA) containing 5 µl of FBS for salivation. The 5 µl harvested

were added to 45 µl of L-15 medium and preserved at -80 °C until analysis. The body and the head of each mosquito were placed in separate tubes and stored at -80 °C until use.

To determine infection and dissemination characteristic of the four mosquito populations, the head and the body of each mosquito were mechanically ground with ceramic beads (Roche, Auckland, New Zealand) in 350 µl of L-15 medium supplemented with 5% FBS, 10% tryptose phosphate and antibiotics/antifungals (100 units/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin and 0.25 µg/ml amphotericin B). Lysis was performed three times during 30 s at 3000 rpm and samples were then centrifuged at 5000 rpm for 5 min. For each sample, 140 µl of supernatant were used for RNA extraction with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Viral detection was performed using real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) by LightCycler 480 II (Roche, Auckland, New Zealand) and previously published primers and probe (24) and the SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

To determine mosquitoes' transmission ability, saliva samples were inoculated onto *Ae. albopictus* C6/36 cells in 96-well plates and incubated at 28 °C for

5 days. DENV infective particles were detected was achieved by immunofluorescent assays as described above.

2.5. Data analysis

The infection rate (number of positive bodies divided by the total number of mosquitoes tested), dissemination rate (number of infected heads divided by the number of infected bodies), transmission rate (number of infected saliva divided by the number of infected heads) and transmission efficiency (number of infected saliva divided by the total number of mosquitoes tested) were calculated for each *Ae. aegypti* population at each dpi. Data were statistically compared using Chi-square test or Fisher's exact test using R software (v. 3.3.1 (25)), considering P-values > 0.05 as non-significant.

3. Results

3.1. Fluctuant infection rate in NC *Ae. aegypti* population

At 7 dpi (Fig. 2a, Additional file 1: Table S1), infection rates ranged from 33 to 53% for the three NC populations with no significant difference measured. From 14 dpi, infection rates decreased significantly in *Ae. aegypti* mosquitoes from Poindimié (Fisher's exact test: $P = 0.0022$ at 14 dpi) and Nouméa (Fisher's exact test: $P = 0.0006$ and 0.0463 at 14 and 21 dpi, respectively) compared to the Ouvéa population.

3.2. High dissemination but low transmission in NC *Ae. aegypti* populations

Dissemination rates ranged from 60 to 100% at 7dpi for all NC mosquitoes tested, with Ouvéa mosquitoes showing significantly higher dissemination rates when compared to Poindimié (Fisher's exact test: $P = 0.046$) and Nouméa (Fisher's exact test: $P = 0.007$) (Fig. 2b, Additional file 1: Table S1). Although the number of infected mosquitoes obtained for Nouméa and Poindimié were low after 14 dpi, the dissemination rate seems more homogenous among the three NC populations (80–100% of dissemination). Infectious DENV-1 particles were detected in the saliva of tested *Ae. aegypti* mosquitoes from Nouméa and Ouvéa as early as 7 dpi and at 14 dpi for Poindimié (Fig. 2c, Additional file 1: Table S1). The transmission efficiencies of the three NC populations ranged from 3 to 13% (Fig. 2d, Additional file 1: Table S1).

3.3. Lower competence of NC-Nouméa *Ae. aegypti* for DENV-1 compared to PF-Papeete *Ae. aegypti*

Because NC and FP are both French territories in the Pacific region, they have long and close ties, including arbovirus circulation. We therefore compared the vector competence of both *Ae. aegypti* collected in the two capital cities, (Nouméa and Papeete). Regarding FP-Papeete

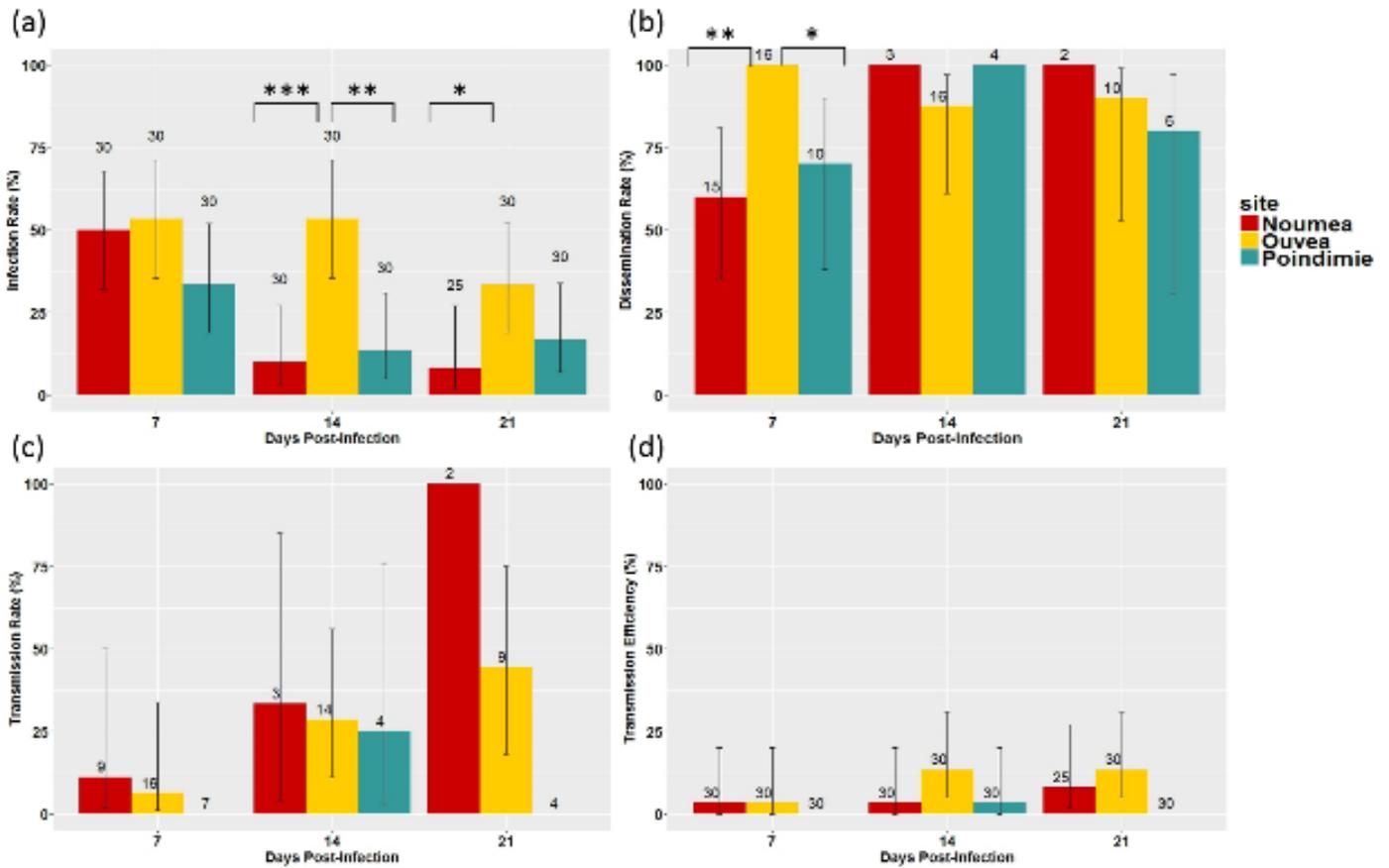


Figure 2. DENV vector competence results for NC mosquitoes (7, 14 and 21 dpi). DENV-1 infection rates (a), dissemination rates (b), transmission rates (c) and transmission efficiencies (d). Error bars represent 95% confidence intervals. Numbers of mosquitoes tested in each condition are indicated above each barplot. Significant differences are indicated by asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

mosquitoes, 47% were infected at 21 dpi compared to 8% observed in the NC-Nouméa population (Fisher's exact test: $P = 0.008$). In both Nouméa and Papeete populations, dissemination rate observed among the infected individuals reached 100% (Fig. 3, Additional file 1: Table S1). The DENV-1 transmission rate calculated exclusively among the mosquitoes in which the virus had disseminated was 75% ($n = 8$) for the FP-Papeete population. The transmission efficiency differed significantly between the FP-Papeete and NC-Nouméa populations, at 35% ($n = 17$)

and 8% ($n = 25$), respectively (Fisher's exact test: $P = 0.045$).

4. Discussion

Recent studies have characterized the vector competence of several populations of *Ae. aegypti* from the Pacific region for arboviruses, especially chikungunya and Zika viruses (26–28). The present study is the first to describe and compare the vector competence of three *Ae. aegypti* populations from NC for dengue virus serotype 1. DENV-1 has been the major circulating serotype in the Pacific region

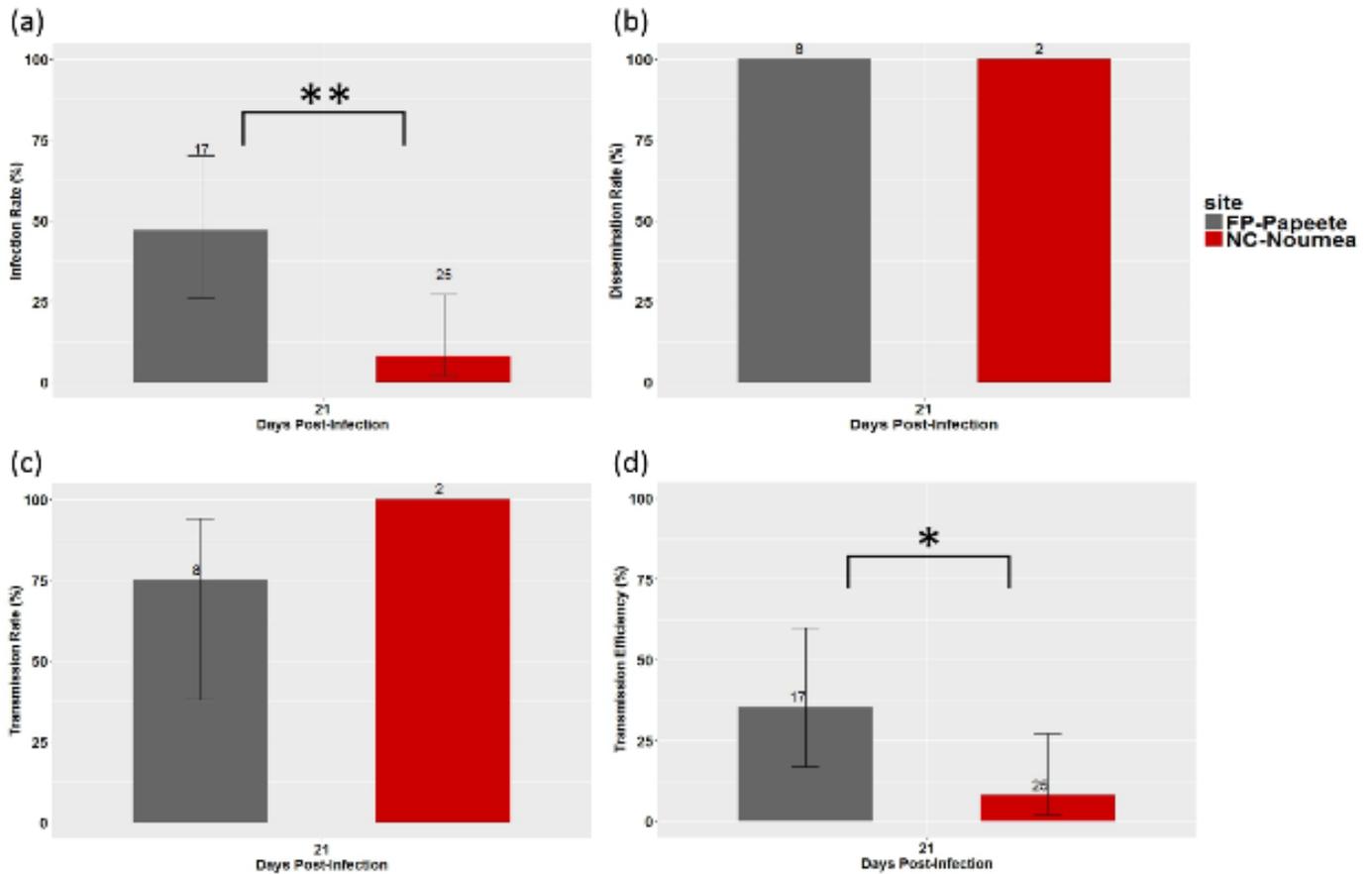


Figure 3. Comparison between *Ae. aegypti* population from Nouméa (NC) and Papeete (FP) (21 dpi). Comparison of DENV-1 infection rates (a), dissemination rates (b), transmission rates (c) and transmission efficiencies (d). Error bars represent 95% confidence intervals. Numbers of mosquitoes tested are indicated above each barplot. Significant differences are indicated by asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$).

over the past decade (4, 19). The DENV-1 strain used in this study belongs to the Asian genotype and was isolated in 2014 during the largest dengue fever outbreak reported in NC (4). This genotype, introduced in NC in 2012, subsequently spread to other PICTs (Vanuatu and FP) and is still circulating in NC and FP (O. O'Connor, personal communication). This ongoing circulation suggests efficient transmission of this DENV-1 strain by local vectors.

Our results confirm New Caledonian *Ae. aegypti* populations' ability to be infected by and subsequently to

disseminate DENV-1. Infection rates differ significantly between the Ouvéa population and the Nouméa and Poindimié populations, related to a decrease overtime for the latter two. This decrease in susceptibility to infection in these mosquitoes suggests that either: 1) survival rate could be lower in the infected than in the non-infected mosquitoes; or 2) *Ae. aegypti* from Nouméa and Poindimié could be more resistant to infection by this DENV-1 strain than mosquitoes from Ouvéa. The three NC populations were collected from different localities, but their

environments may have been different (13). The resident microbiota, which directly depends on the local ecosystem and lives in the breeding site, are known to influence the adult mosquito microbiome. Interestingly, the bacteria from that microbiome can modulate mosquitoes' viral susceptibility (29, 30). Regulation of host immunity is one possible mechanism by which the microbiome could influence mosquito susceptibility to regulate of innate immune responses, especially via the RNA interference pathways and strongly alter the viral replication capacity (31, 32). Moreover, the re-introduction of specific microbiome bacteria in the midgut of mosquitoes treated with antibiotics to remove their midgut flora has shown to decrease DENV infection rates, possibly through the activation of immune system factors (33). One can therefore hypothesize that a microbiome-dependent up-regulation of NC mosquitoes' immune responses could be the reason for our observed decrease in infection rates. As the microbiota in the breeding site can impact the adult mosquito microbiome (34), differences in the ecosystem may influence the mosquitoes' innate immune response (33, 35, 36) and the consequent vector competence. The microbiota could play a role in the modulation of DENV infection through a possibly basal-level stimulation of the antiviral immune system of mosquitoes (37). Several innate immune pathways are activated during arbovirus

infection, especially the Toll pathway, the Jak-STAT pathway and the mosquito RNAi. All these pathways are known to control arbovirus infection and transmission in the mosquitoes (31, 37–41). Thus, the up-regulation of these pathways in time could explain the lower DENV infection rate observed in NC mosquitoes.

Despite reasonable numbers of mosquitoes collected at each dpi (25–30 mosquitoes), unexpectedly low infection rates unfortunately resulted in small sample sizes for the estimation of dissemination and transmission rates. Our study, however, provides interesting data on dissemination and transmission of DENV-1 in NC mosquitoes. Although infection rates were modest, the dissemination of the virus in infected mosquitoes was high in the three NC populations. The dissemination rates obtained among NC populations were high and relatively homogenous, except at 7 dpi for which the population from Ouvéa had a higher dissemination rate. Transmission efficiencies were also similar between the three populations and they were surprisingly low, as observed in previous studies (42–44).

New Caledonia and French Polynesia are two overseas territories administrated by France and, consequently, have long-standing ties and close exchanges (e.g. economics, populations and travel). Previous work has

highlighted similarities in arbovirus transmission between these two territories and shown that the same DENV-1 strain circulates in both territories (4, 19, 22). We compared the ability of the *Ae. aegypti* population from Nouméa, the capital city of New Caledonia, with the ability of *Ae. aegypti* from Papeete, the capital city of French Polynesia, to transmit this DENV-1 strain. The results clearly demonstrate a lower susceptibility to infection and lower transmission efficiency in NC mosquitoes.

Several factors may influence vector competence of *Ae. aegypti*, notably host viremia, the genetic background of the *Ae. aegypti* populations tested and/or the virulence of the virus strain used (14, 15, 45). As shown in previous studies (46, 47), vector competence is a dose-response phenomenon. In this study, all mosquitoes were fed with a blood meal at the average concentration of 10^6 FFU/ml. As the same DENV-1 strain was used to infect these four mosquito populations, the vector's genetic characteristics are probably an important parameter in the observed difference in viral transmission. Variation in vector competence of *Ae. aegypti* has previously been observed between populations from different countries, but also within a country (42–44, 48). The mosquito populations tested here were collected in the same sampling sites used in a recently published study, which showed genetic differences between the Ouvéa *Ae. aegypti* population and the Nouméa and Poindimié

populations, and between the Nouméa and the Papeete population (13).

The known vector for dengue virus in New Caledonia is *Ae. aegypti*. In FP and the rest of the South Pacific region, however, other vectors are present, especially *Ae. polynesiensis* and *Ae. albopictus* (9, 10). Although the *Ae. aegypti* populations tested were susceptible to infection in the present study, they were unexpectedly low competence vectors for the strain of DENV-1 circulating since 2012. The prolonged circulation of DENV-1 in NC may therefore not be due solely to the vector-virus interaction, and highlights the importance of several other factors, such as vector density, mosquito lifespan, the number of susceptible individuals in the human population as well as frequency and intensity of host-vector contact. This work underscores the importance of maintaining both arboviruses and vector surveillance networks in the Pacific and the need to develop innovative and targeted vector control strategies in the region to prevent expansion of outbreaks (49, 50).

5. Conclusion

In the context of globalization of trade and travel, and as shown with chikungunya or the recent Zika outbreak that spread from the Pacific region to the Americas (51), improving our knowledge on Pacific region vectors and arboviruses' circulation is of major importance. This study describes, for the first time, the vector

competence of several populations of *Ae. aegypti* from NC for the DENV-1 strain currently circulating in this country and the rest of the Pacific. Studies are now needed to determine the vector competence of NC *Ae. aegypti* for other serotypes/genotypes of DENV and for other arboviruses circulating in the Pacific, to guide risk assessment strategies in NC and the rest of the Pacific region.

6. Abbreviations

DENV: Dengue virus; dpi: day post-infection; FBS: Fetal bovine serum; FFU: Focus Forming Unit; FP: French Polynesia; NC: New Caledonia; PICTs: Pacific Island Countries and Territories; QTL: Quantitative Trait Loci; RTPCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

7. Acknowledgments

We thank Morgane Pol and Sosiasi Kilama for mosquito sampling in New Caledonia. We thank Jérôme Marie and Mathias Ellacott for mosquito sampling in French Polynesia. We thank Cyrille Goarant and Mariko Matsui for the rabbit blood samples. We thank Julie Peter for technical support. We thank Julie Cagliero for discussions. We are very grateful to Arnaud Tarantola for the mapping and for critically revising the manuscript.

Funding

This work was funded by the “Agence Française pour le Développement” through the Pacific Fund (CZT102701R/n°1162,

CNC194801X/n°1272, UO0209CSOLD988/n°1439) and by the Government of New Caledonia (CS123007063/n°1162). Recipient for both grants: LG.

Availability of data and materials

The data supporting the conclusions of this article are included within the article. The raw data used or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' contributions

MDR, VMCL and LG designed the study; LG, NP and TP collected and reared the mosquitoes; EC, VR, DG and OOC performed the virus infection experiments; EC, DG, OOC and MDR performed the molecular and the cellular laboratory work; EC, OOC and MT performed the statistical analyses; EC, MDR and VMCL wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

This study follows the New Caledonia ethic regulations regarding animal experiments.

Consent for publication

Not applicable.

Publisher's Note

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

Received: 14 March 2017 Accepted: 1 August 2017

8. References

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, *et al.* The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496:504–7.
- Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3:376–96.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:480–96.
- Dupont-Rouzeyrol M, Aubry M, O'Connor O, Roche C, Gourinat AC, Guigon A, *et al.* Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001–2013. *Virology*. 2014;11:61.
- Descloux E, Cao-Lormeau VM, Roche C, De Lamballerie X. Dengue 1 diversity and microevolution, French Polynesia 2001–2006: connection with epidemiology and clinics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3:0000493.
- A-Nuegoonpipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, Endy T, Lowry K, Mai le Q, *et al.* Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. *Virology*. 2004;329:505–12.
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Musso D, Mallet HP, Dalipanda T, Dofai A, *et al.* Dengue virus type 3, South Pacific Islands, 2013. *Emerg Infect Diseases*. 2014;20:1034–6.
- Li DS, Liu W, Guigon A, Mostyn C, Grant R, Aaskov J. Rapid displacement of dengue virus type 1 by type 4, Pacific region, 2007–2009. *Emerg Infect Diseases*. 2010;16(1):123–5.
- Guillaumot L. Arboviruses and their vectors in the Pacific - status report. *Pacific Health Dialog*. 2005;12(2):45–52.
- Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Euro Surveill*. 2014;19(41):20929.
- Failloux AB, Darius H, Pasteur N. Genetic differentiation of *Aedes aegypti*, the vector of dengue virus in French Polynesia. *J Am Mosq Control Assoc*. 1995; 11(4):457–62.
- Paupy C, Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population density. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62(2):217–24.
- Calvez E, Guillaumot L, Millet L, Marie J, Bossin H, Rama V, *et al.* Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main Arbovirusvector in the Pacific. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:1.
- Tabachnick W. Genetics of insect vector competence for arboviruses. In: Harris K, editor. *Advances in disease vector research*, vol. 10. New York: Springer; 1994. p. 93–108.
- Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(1):249–77.
- Bennett KE, Beaty BJ, Black WC. Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to dengue 2 escape. *J Med Entomol*. 2005; 42(2):110–9.
- Bosio CF, Fulton RE, Salasek ML, Beaty BJ, Black WC. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*. 2000;156(2):687–98.
- Bennett KE, Flick D, Fleming KH, Jochim R, Beaty BJ, Black WC. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the

mosquito *Aedes aegypti*. Genetics. 2005;170(1):185–94.

19. Singh N, Kiedrzyński T, Lepers C, Benyon EK. Dengue in the Pacific – an update of the current situation. Pacific Health Dialog. 2005;12(2):111–9.

20. Teurlai M, Menkès CE, Cavarero V, Degallier N, Descloux E, Grangeon J-P, *et al.* Socio-economic and climate factors associated with dengue fever spatial heterogeneity: a worked example in New Caledonia. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(12):e0004211.

21. Cao-Lormeau VM. Tropical Islands as new hubs for emerging Arboviruses. Emerg Infect Dis. 2016; May;22(5):913–5. doi:10.3201/eid2205.150547.

22. Cao-Lormeau V-M, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. Lancet. 2014;384(9954):1571–2.

23. Rallu J-L. Tendances récentes des migrations dans le Pacifique Sud. In: Espace, population, sociétés. Les populations du Pacifique. 1994;2:201–12.

24. Warrilow D, Northill JA, Pyke A, Smith GA. Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. J Med Virol. 2002;66(4):524–8.

25. R Core Team. R. A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.

26. Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D'Ortenzio E, Thiberge JM, *et al.* Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific region). Vector Borne Zoonotic Dis. 2012;12(12):1036–41.

27. Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau V-M. Vector competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika virus. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(9):e0005024.

28. Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau V-M. Vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* populations from French Polynesia for chikungunya virus. PLoS Negl Trop Dis. 2016;10(5):e0004694.

29. Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, Deobagkar DN. *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. PLoS One. 2012;7(7):e40401.

30. Ramirez JL, Short SM, Bahia AC, Saraiva RG, Dong Y, Kang S, *et al.* *Chromobacterium Csp_P* reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. PLoS Pathog. 2014;10(10):e1004398.

31. Blair CD. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. Future Microbiol. 2011;6(3):265–77.

32. Sim S, Jupatanakul N, Dimopoulos G. Mosquito immunity against arboviruses. Viruses. 2014;6(11):4479–504.

33. Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, *et al.* Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(3):6.

34. Paupy C, Chantha N, Vazeille M, Reynes JM, Rodhain F, *et al.* Variation over space and time of *Aedes aegypti* in Phnom Penh (Cambodia): genetic structure and oral susceptibility to a dengue virus. Genet Res. 2003;82(3):171–82.

35. Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G. The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. Viruses. 2014;6(11):4294–313.

36. Dennison NJ, Jupatanakul N, Dimopoulos G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. Current Opinion in Insect Science. 2014;3:6–13.

37. Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. PLoS Pathog. 2008;4(7):e1000098.

38. Barletta ABF, Nascimento-Silva MCL, Talyuli OAC, Oliveira JHM, Pereira LOR, Oliveira PL, *et al.* Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. Parasit Vectors. 2017;10(1):103.

39. Blair CD, Olson KE. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses*. 2015;7(2):820–43.
40. Fragkoudis R, Attarzadeh-Yazdi G, Nash AA, Fazakerley JK, Kohl A. Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *J Gen Virol*. 2009;90(Pt 9):2061–72.
41. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(42):17841–6.
42. Diallo M, Ba Y, Faye O, Soumare M, Dia I, Sall A. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in west Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102:493–8.
43. Knox T, Kay B, Hall R, Ryan P. Enhanced vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Torres Strait compared with mainland Australia for dengue 2 and 4 viruses. *J Med Entomol*. 2003;40(6):950–6.
44. Vazeille M, Rosen L, Mouson L, Failloux A. Low oral susceptibility for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:203–8.
45. Lambrechts L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol*. 2011;27(3):111–4.
46. Nguyen NM, Thi hue Kien D, Tuan TV, Quyen NTH, Tran CNB, Vo Thi L, *et al*. Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(22):9072–7.
47. Whitehorn J, Kien DTH, Nguyen NM, Nguyen HL, Kyrylos PP, Carrington LB, *et al*. Comparative susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to dengue virus infection after feeding on blood of viremic humans: implications for public health. *J Infect Dis*. 2015;212(8):1182–90.
48. Bennett KE, Olson KE, Muñoz ML, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Higgs S, *et al*. 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*. 2002;67
49. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, *et al*. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S7–16.
50. McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(3):181–93.
51. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika virus. *N Engl J Med*. 2016;374(16):1552–63.

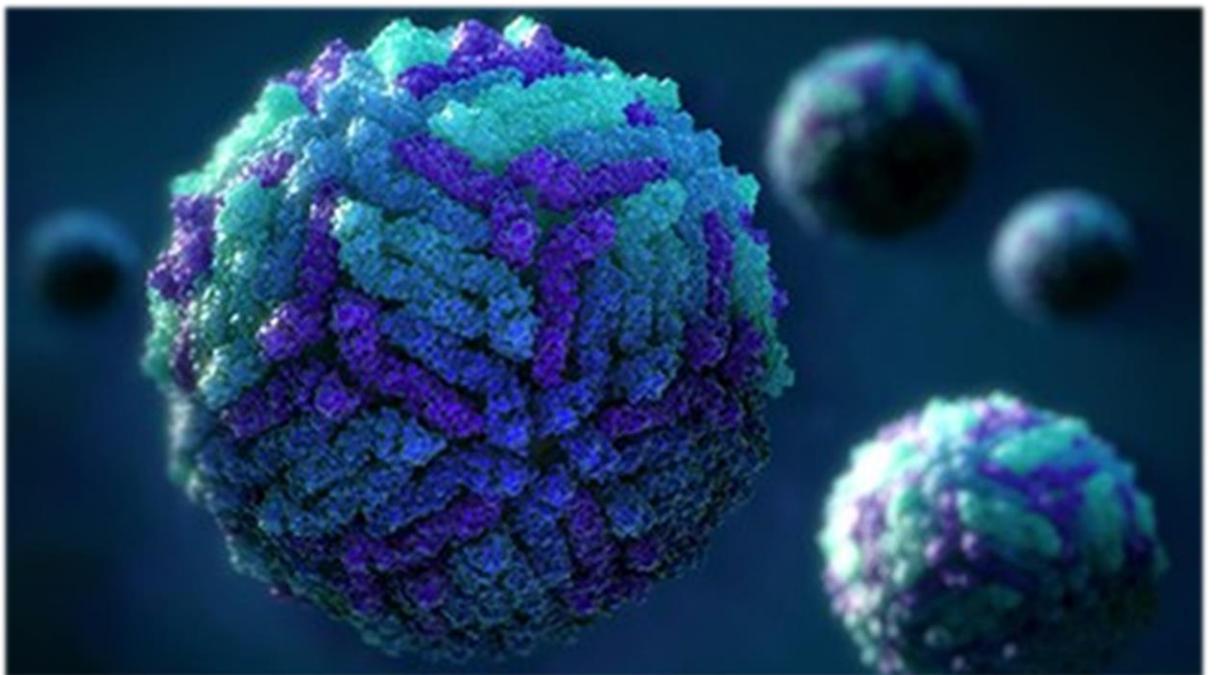
Additional file 1:

Table S1. Infection, dissemination, transmission rates and transmission efficiency at 7, 14 and 21 days post-infection (dpi).

		7 dpi	14 dpi	21dpi
Number of infected bodies / number of mosquitoes tested (% of infection)	NC -Nouméa	15/30 (50%)	3/30 (10%)	2/25 (8%)
	NC - Ouvéa	16/30 (53%)	16/30 (53%)	10/30 (33%)
	NC - Poindimié	10/30 (33%)	4/30 (13%)	5/30 (17%)
	FP - Papeete	–	–	8/17 (47%)
Number of infected heads / number of infected bodies (% of dissemination)	NC -Nouméa	9/15 (60%)	3/3 (100%)	2/2 (100%)
	NC - Ouvéa	16/16 (100%)	14/16 (87%)	9/10 (90%)
	NC - Poindimié	7/10 (70%)	4/4 (100%)	4/5 (80%)
	FP - Papeete	–	–	8/8 (100%)
Number of infected saliva / number of infected heads (% of transmission)	NC -Nouméa	1/9 (11%)	1/3 (33%)	2/2 (100%)
	NC - Ouvéa	1/16 (6%)	4/14 (29%)	4/9 (44%)
	NC - Poindimié	0/7 (0%)	1/4 (25%)	0/4 (0%)
	FP - Papeete	–	–	6/8 (75%)
Number of infected saliva / number of mosquitoes tested (% of efficiency)	NC -Nouméa	1/30 (3%)	1/30 (3%)	2/25 (8%)
	NC - Ouvéa	1/30 (3%)	4/30 (13%)	4/30 (13%)
	NC - Poindimié	0/30 (0%)	1/30 (3%)	0/30 (0%)
	FP - Papeete	–	–	6/17 (35%)

Chapitre 3 :

Etude de l'évolution moléculaire du virus Zika dans la région Pacifique



© John LIEBLER

Chapitre 3 : Etude de l'évolution moléculaire du virus Zika dans la région Pacifique

3.1. Contexte de l'étude et démarche expérimentale

La région Pacifique est composée de plus de 700 îles habitées regroupées en 17 Etats insulaires. Ces îles ont chacune des spécificités démographiques (immigration et habitudes de vie) et environnementales (température, humidité, relief, ...). Leurs biodiversités naturelles se reflètent aussi dans la diversité de vecteurs présents (Figure 18). Des études phylogéniques réalisées sur le DENV-1 ont démontré qu'en Polynésie Française il y a un lien entre la transmission en période endémique et l'apparition et la fixation de mutations génétiques spécifiques (Descloux *et al.*, 2009). Ces mutations pourraient être dues à une adaptation au vecteur. En effet dans cette étude, des mutations ont été observées entre des virus circulants dans des zones rurales, où *Ae. polynesiensis* est majoritaire, et des zones urbaines, où *Ae. aegypti* est le vecteur principal (Descloux *et al.*, 2009). Ces mutations observées à l'échelle d'un pays se retrouvent aussi à l'échelle mondiale. En effet, les sérotypes de DENV ont été sous-divisés en génotypes et classés souvent sur une base géographique (Araujo *et al.*, 2009; Rico-Hesse, 2003).

Les données phylogénétiques du ZIKAV démontrent une distinction en deux lignées : la lignée africaine et la lignée asiatique. La lignée africaine est elle-même subdivisée en deux groupes l'ouest et l'est africain (Faye *et al.*, 2014; Gong *et al.*, 2016; Lanciotti *et al.*, 2016). Les données sur le virus ayant circulé dans la région Pacifique et sud-américaine ont indiqué que le virus appartient à la lignée asiatique (Cao-Lormeau *et al.*, 2014b; Enfissi *et al.*, 2016; Lanciotti *et al.*, 2016; Lednicky *et al.*, 2016). Mais aucune étude n'a évalué les différences inter îles à l'échelle de la région Pacifique afin de déterminer, si comme le DENV-1, des adaptations ont pu avoir lieu pour le ZIKAV. L'objectif de cette troisième partie est donc d'étudier la phylogénie du ZIKAV ayant circulé dans la région Pacifique et en particulier en Nouvelle-Calédonie pour déterminer si un ou plusieurs variants sont à l'origine de la circulation du virus dans cette région.

Pour cela les génomes complets de 13 souches de ZIKAV, isolées en Nouvelle-Calédonie (7), en Polynésie Française (3), au Vanuatu (2) et aux Îles Cook (1), ont été analysés par séquençage haut-débit et comparés à une sélection de 72 génomes complets de la lignée asiatique, dont 20 ZIKAV de la sous-lignée Pacifique, disponibles sur GenBank, afin de déterminer la diversité et l'évolution de la population virale ayant circulée dans la région Pacifique.

3.2. Résultats et conclusion

Les résultats font l'objet d'une publication acceptée dans le journal *Emerging Microbes and Infections*.

Cette étude suggère que la souche ZIKAV qui a circulé en Polynésie Française a émergé en 2012. Elle confirme que la lignée asiatique s'est subdivisée en deux sous-lignées lors de l'épidémie de 2013-2016 : le groupe Pacifique et le groupe Amérique Latine, qui ont circulé indépendamment l'un de l'autre à partir de 2015 mais ont une même origine polynésienne. A l'échelle de la région Pacifique deux voies de dissémination du virus semblent apparaître, une première avec une diffusion de la Polynésie vers Fidji, Samoa américaine et les îles Cook et la deuxième, toujours de la Polynésie mais cette fois-ci vers la Nouvelle-Calédonie et le Vanuatu.

La récente épidémie de ZIKAV a montré la possibilité d'émergence des épidémies d'arboviroses dans les îles du Pacifique, avec la diffusion rapide du ZIKAV à l'échelle du Pacifique mais aussi à l'échelle mondiale. On observe la subdivision génétique en plusieurs groupes du ZIKAV de la lignée asiatique au cours de l'épidémie. Un premier groupe regroupant les virus isolés en Amérique Latine et un deuxième des virus isolés dans la région Pacifique. Plusieurs substitutions d'acides aminés ont été observées entre la lignée africaine et asiatique du ZIKAV, cinq substitutions pouvant entraîner des changements structurels majeurs de la protéine E (D683E, T777M et V763M), de la protéine M (S139N) et de la protéine NS5 (M/T2634V), ces mutations pouvant jouer un rôle dominant dans l'émergence d'une épidémie (Pettersson *et al.*, 2016). L'étude de la mutation D683E de la protéine E, par production de clones viraux de DENV-2 obtenu par mutagénèse portant cette mutation, a démontré une corrélation entre la séquence nucléotidique et l'augmentation de la capacité du virus à infecter les cellules de mammifères et la meilleure transmission par le vecteur *Ae. aegypti* (Erb

et al., 2010). L'étude de la mutation S139N, située sur une protéine transmembranaire, a démontré pour le DENV-2 que cette mutation peut influencer la maturation virale par acidification du pH (Pettersson *et al.*, 2016; Sirohi *et al.*, 2016). Une mutation entre les souches du Pacifique et d'Amérique du Sud a aussi été observée au niveau de l'acide aminé 2634 (M/T2634V), mais des études sont encore nécessaires pour déterminer l'impact de cette mutation sur l'épidémiologie de l'infection par le ZIKAV en Amérique du Sud (Pettersson *et al.*, 2016).

L'origine et le rôle des cinq mutations observées chez les souches isolées dans le Pacifique et leur lien avec l'émergence du ZIKAV dans la région Pacifique puis en Amérique du Sud reste encore à déterminer (Pettersson *et al.*, 2016). Ces mutations sont-elles dues à l'adaptation du ZIKAV à l'environnement spécifique de la région Pacifique, avec notamment une potentielle adaptation aux différents vecteurs (*Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. hensilli*, ...) ? Est-ce que ces mutations sont responsables du tropisme neurologique du ZIKAV ? Une étude récente semble en effet démontrer que la mutation S139N au niveau de la protéine prM contribuerait à l'augmentation de la virulence pour les cellules neuronales (Yuan *et al.*, 2017). De plus, est-ce que ces mutations ont pu impacter la transmission du ZIKAV par les vecteurs *Aedes* ?

Dans notre étude nous n'avons pas pu étudier de ZIKAV au-delà de l'année 2015 en Nouvelle-Calédonie. Or une circulation à bas-bruit de ZIKAV jusqu'en 2017 a été observé en Nouvelle-Calédonie et aux Samoa Américaine (source DASS-NC and <http://www.spc.int/phd/epidemics/>). Malheureusement les tentatives d'isolement viral ont été infructueuses. Il aurait été intéressant de savoir si la circulation en Nouvelle-Calédonie de ZIKAV depuis 2014 est due à une seule introduction ou à des réintroductions ? Si un variant viral a été sélectionné, cela a-t-il entraîné des mutations nucléotidiques et/ou protéiques spécifiques pouvant expliquer cette circulation prolongée ?

La diffusion du ZIKAV à l'échelle mondiale démontre la nécessité de mieux connaître les interactions entre les moustiques vecteurs et ce virus, le principal mode de transmission du Zika étant la pique par un moustique infecté. En effet la transmission du ZIKAV est également possible par voie sexuelle ou par transfusion sanguine mais ces cas restent minoritaires. Il est donc important, avec les données génétiques obtenues du ZIKAV, de déterminer dans un

second temps i) l'impact de ces différences génétiques du virus sur la transmission par le vecteur *Aedes aegypti*, ii) l'habilité des différents vecteurs du Pacifique à transmettre le ZIKAV.

3.3. Article 3

Article 3: Zika virus evolution in the edges of the Pacific Ocean.

Myrielle Dupont-Rouzeyrol ¹, Laure Diancourt ², **Elodie Calvez** ¹, Mathias Vandenbergert ², Olivia O'Connor ¹, Anita Teissier ³, Morgane Pol ¹, Maite Aubry ³, Oumar Faye ⁴, Douglas Tou ⁵, Van-Mai Cao-Lormeau ³, Valérie Caro ²

¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, ² Institut Pasteur, ³ Institut Louis Malardé, ⁴ Institut Pasteur de Dakar, ⁵ Rarotonga Hospital Laboratory

SUMMARY

Not requested for Letter to Editor.

Keywords: Zika virus, whole genome, phylogeny, Pacific

Over the past decade, arthropod-borne viruses (arboviruses) including dengue virus (DENV), chikungunya virus (CHIKV), and Zika virus (ZIKAV), have demonstrated their potential to pose major global public health problems. Several outbreaks caused by these viruses recently occurred in the Pacific region, probably resulting from multiple factors¹: the presence of competent mosquito vectors, environmental and demographical conditions favourable to mosquito proliferation and disease transmission, and

the increasing volume of travel between continental tropical areas where arboviruses are endemic and the Pacific, and between Pacific Island Countries and Territories (PICTs). In 2013, ZIKAV emerged in French Polynesia and subsequently spread to other PICTs¹. In 2015, ZIKAV appeared in Brazil and several other Latin American countries where it was associated with a dramatic increase in the number of cases of congenital abnormalities, including microcephaly, and neurological disorders²⁻⁴. Phylogenetic

analysis classified ZIKAV into two major genetic lineages, African and Asian, with the Asian lineage responsible for the current global expansion of ZIKAV². To date, except for French Polynesia, there are little data on ZIKAV Pacific strains^{5, 6}. In our study, by adding 13 new full ZIKAV genome sequences, isolated from different places in the Pacific region and at different periods of time, along with other published genomes, we provide for the first time a map of the whole ZIKAV Pacific sublineage, from the Western to the Eastern edges of the Pacific ocean.

The 13 ZIKAV strains used in this study were isolated from human patients in French Polynesia, New Caledonia, Cook Islands and Vanuatu between 2013 and 2015 (Supplementary Table S1). Full ZIKAV genomes were obtained by in-house high-throughput sequencing with the Ion Personal Genome Machine (PGM) sequencer (ThermoFisher Scientific). Briefly, viral RNA was extracted from serum, saliva swab, or cell culture supernatant (obtained by inoculating serum or breast-milk⁷ on Vero cells) with QIAmp Viral RNA Mini kit according to manufacturer's recommendations (Qiagen) (Supplementary Table S1). Treated with Turbo Dnase Enzyme

(Invitrogen), viral RNA was purified using Agencourt RNAClean XP beads (Beckman Coulter). cDNA synthesis was performed with SuperScript VILO cDNA synthesis kit according to manufacturer's recommendations (ThermoFisher Scientific). Libraries were prepared with Ion AmpliSeq Library 2.0 kit (Life Technologies). We designed two custom and specific ZIKAV panels (www.ampliseq.com; Ion AmpliSeq™ Designer), giving 39 amplicons covering all the genome of ZIKAV. Each library was barcoded using the Ion Xpress Barcode Adapter 17-32 kit (Life Technologies) and quantified with Ion Library Taqman quantification kit (ThermoFisher Scientific). Barcoded libraries were combined to a final concentration of 60 pM and loaded onto 316 (100 Mb output data) chips, using Ion Chef System (Life Technologies) and sequencing was carried out on the PGM System (Life Technologies). Data analysis was performed according to the sequencing depth provided by the genetic analyser. The genome for isolate Pf13/251013-18 was de novo assembled using CLC assembly cell (<http://www.clcbio.com/products/clc-assembly-cell/>) version 4 and standard parameters, yielding one contig (11155 bp). Genomes from samples NC-14-2743,

NC-14-7000 and CK-14-48/01 were assembled using a directed MIRA v4 assembly, using the Pf13/251013-18 as reference assembly. Finally, for the nine other samples, mapping of raw sequencing data was performed with Burrows Wheeler Alignment (BWA) on Pf13/251013-18 assembly, from which a consensus was derived (using SAMTOOLS package, version 0.1.19). The average assembled sequence length is 10666.7 bp (range 10454-11155 bp). Average sequencing depth was around 4000X. Evolutionary rates were estimated using Bayesian Evolutionary Analysis by Sampling Trees (BEAST) v1.8.4, on the 13 ZIKAV full genomes sequenced in this study and 72 additional sequences retrieved from GenBank (Alignment available upon request). The SRD06 codon-partitioned model was applied using the general time reversible (GTR) nucleotide substitution model with gamma distribution, a strict molecular clock with a continuous-time Markov chain (CTMC) prior, and a Bayesian skyline coalescent tree prior with a piecewise-constant demographic model. Both mixing of individual chains and sufficient effective sample size was ensured by running each data set eight times for 100M generations, sampling every 10k generations. After discarding 10% burn-in for each run, consensus files

for each data set were produced using LogCombiner and TreeAnnotator (BEAST packages). Consensus trees were viewed and validated using FigTree 1.3.1.

The 13 new full ZIKAV genome sequences obtained with this work are belonging to the Asian lineage (Figure 1). All the 13 ZIKAV strains are harbouring several amino acid substitutions including 139N, 683E, 777M, 763M which are specific to the ZIKAV strain initially isolated in French Polynesia (PF-251013-18; KX369547) and to all the ZIKAV Pacific strains genomes available as previously described⁵.

Phylogenetic analysis of ZIKAV full genomes from various locations confirms African and Asian as two distinct lineages (data not shown) with a last common ancestor around 1822 (95% highest posterior density interval [HPD], 1788 to 1838) and the emergence of Asian lineage around 1942 (95% HPD, from 1934 to 1950). Our analysis also suggests that the ancestor of the French Polynesian strains emerged roughly during the year 2012 (95% HPD, September 2011-September 2012).

For phylogenetic analysis, we first constructed phylogenetic trees with all

complete genomes (465 and 196) available in July 2017. However, for clarity and because topology of the tree was very comparable, the phylogenetic analysis presented in this study was reduced to the 13 ZIKAV full genomes sequenced and 72 additional sequences retrieved from GenBank (with a special focus on Pacific region sequences) (Figure 1). This analysis supports that the ZIKAV strains that caused the outbreaks in the Pacific and in Latin America⁶ evolved into two distinct sublineages (supported by a posterior probability value of 0.99) that circulated independently within the two areas from 2015 (Figure 1). The tree highlights the diversity over time commonly observed with such arbovirus, with a striking collocation of the strains according to the geographical origin of sampling. Interestingly the phylogenetic tree seems to reveal two distinct clusters within the Pacific sublineage supported by a posterior probability value of 0.93, although there are no striking amino-acids changes. A first cluster contains French Polynesian strains, including those that appear in the Latin American sublineage, and all strains from New Caledonia and Vanuatu. A second cluster contains other strains from French Polynesia and ZIKAV strains from Fiji, American Samoa and the Cook islands.

These observations suggest that ZIKAV dissemination throughout the Pacific region followed at least two distinct pathways. One is probably resulting from the existence of close links and regular flight connections between French Polynesia, New Caledonia and Vanuatu. This is also corroborated by epidemiological data from New Caledonia health authorities reporting 30 ZIKAV imported infections from French Polynesia by the end of 2013, followed by the detection of the first autochthonous ZIKAV cases in January 2014^{8,9}. The dissemination of arboviruses between French Polynesia, New Caledonia, and Vanuatu was already observed at several occasions by the past, notably for DENV-1 and DENV-4^{10, 11}. The second pathway of dissemination may have been driven by travel exchanges between French Polynesia and other PICTs; and between those PICTs.

Our study shows that whatever the island country in the Pacific, and whatever the year the ZIKAV strains were isolated (2013, 2014, 2015 and 2016), all viral strains cluster together with French Polynesia strains. The finding that all Pacific strains (except two French Polynesian strains) belong to the same Pacific sublineage supports that ZIKAV

dissemination throughout the Pacific region originated in French Polynesia without any further importation of ZIKAV from continental areas. This observation contrasts with data on the other arboviruses (CHIKV, DENV-1 and DENV-3) that circulated concomitantly to ZIKAV in the Pacific region¹²⁻¹⁴ and to what happened in the Americas with multiple introductions of ZIKAV from the Caribbean region and Central/South America in the USA¹⁵.

The Pacific region was at the beginning of the ZIKAV globalization. Our results suggest that the ZIKAV Pacific sublineage is certainly due to a single introduction in French Polynesia and subsequent spread to other PICTs. This work highlights the need for a better understanding of the patterns of introduction and dissemination of arboviruses in the Pacific region as it could help to mitigate future outbreaks.

Acknowledgments

This work was partially supported by the Action Concertées Inter Pasteuriennes (ZikAe project, ACIP A-15-2014), by French Government's Investissement d'Avenir Programme

(Labex Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases, IBEID, grant number ANR-10-LABX-62-IBEID), by the French Ministry for Foreign and International Affairs (ISID-Pacific program, Pacific Funds, grant N°063-14_2014/N°121-15_2016/N°030-16_2016) and by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under ZIKAlliance Grant Agreement no. 734548.

We thank Charlotte Balière, Meriadeg Le Gouil and Etienne Simon-Lorière from Institut Pasteur, Paris, for discussions, Mathieu Boimard from Life Technologies sequencing support.

Conflict of interests

None to declare

References

1. Cao-Lormeau VM, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet* 2014; 384: 1571-1572.
2. Petersen E, Wilson ME, Touch S, *et al.* Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *Int J Infect Dis* 2016; 44: 11-15.
3. Mlakar J, Korva M, Tul N, *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med* 2016; 374: 951-958.
4. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, *et al.* Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with

Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 2016; 387: 1531-1539.

5. Pettersson JH, Eldholm V, Seligman SJ, *et al.* How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? *mBio* 2016; 7.

6. Shi W, Zhang Z, Ling C, Carr MJ, Tong Y, Gao GF. Increasing genetic diversity of Zika virus in the Latin American outbreak. *Emerg Microbes Infect* 2016; 5: e68.

7. Dupont-Rouzeyrol M, Biron A, O'Connor O, Huguon E, Descloux E. Infectious Zika viral particles in breastmilk. *Lancet* 2016; 387: 1056.

8. Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, *et al.* Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 381-382.

9. Gourinat AC, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M. Detection of Zika virus in urine. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 84-86.

10. Li DS, Liu W, Guigon A, Mostyn C, Grant R, Aaskov J. Rapid displacement of dengue virus type 1

by type 4, Pacific region, 2007-2009. *Emerg Infect Dis* 2010; 16: 123-125.

11. Dupont-Rouzeyrol M, Aubry M, O'Connor O, *et al.* Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001-2013. *Viro J* 2014; 11: 61.

12. Cao-Lormeau VM, Roche C, Musso D, *et al.* Dengue virus type 3, South Pacific islands, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1034-1036.

13. A-Nuegoonpipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, *et al.* Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. *Virology* 2004; 329: 505-512.

14. Aubry M, Teissier A, Roche C, *et al.* Chikungunya outbreak, French polynesia, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015; 21: 724-726.

15. Grubaugh ND, Ladner JT, Kraemer MUG, *et al.* Genomic epidemiology reveals multiple introductions of Zika virus into the United States. *Nature* 2017; 546: 401-405.



Figure 1. Zika virus phylogeny of Asian/Pacific and Latin American virus isolates. For clarity, the tree displays all Pacific virus branches in blue and all Latin American virus branches in red. The 13 virus sequences obtained in this study are colored in red text. Blue bars represent highest posterior density interval (HPD 95%). Due to the relatively recent emergence of a high number of ZIKAV strains, the posterior probability support values are lower for Pacific lineages than in the phylogenetic tree that includes Malaysian and African lineages, giving stronger phylogenetic support (data not shown). Furthermore, in order to better interpret the phylogenetic analysis, the tree was produced by excluding the African and the Malaysian lineage by focusing on Pacific-representative sequences and by removing highly similar sequences.

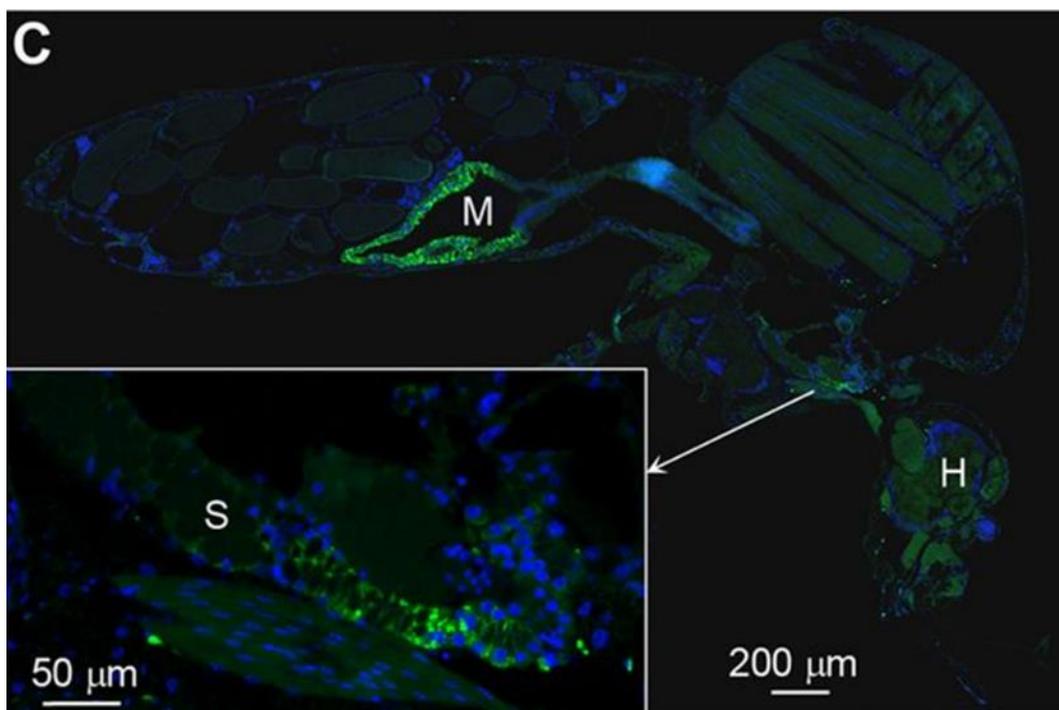
The sequences of the Pacific isolates obtained in this study have been submitted to GenBank in the form of Sequence Read Archives, under accession no. SRR5329238 and SRR5309448 to SRR5309458, and for strain Pf13/251013-18 as Genbank accession number KY766069.

Supplementary Table S1. Zika virus strains analyzed in the study

Isolate Genbank Identification	Sample origin	Geographical origin	Isolation date	Accession Number	Coverage relative to Pf13/251013-18 (%)
NC(imp FP)-13-22252	Cell supernatant	New Caledonia (imported French Polynesia)	2013	SRR5309458	0.938682
NC(imp FP)-13-22368	Cell supernatant	New Caledonia (imported French Polynesia)	2013	SRR5309457	0.921381
NC-14-843	Cell supernatant	New Caledonia	2014	SRR5309456	0.938861
NC-14-2743	Cell supernatant	New Caledonia	2014	SRR5309455	0.991215
NC-14-5026	Cell supernatant	New Caledonia	2014	SRR5309454	0.938861
NC-14-5132	Cell supernatant	New Caledonia	2014	SRR5309452	0.938682
NC-15-1852	Cell supernatant	New Caledonia	2015	SRR5309451	0.937517
NC-15-2391	Cell supernatant	New Caledonia	2015	SRR5309450	0.939220
NC-14-7000	Cell supernatant	New Caledonia	2015	SRR5309453	0.987808
NC(imp VU)-15-615	Serum	New Caledonia (imported Vanuatu)	2015	SRR5309449	0.937517
NC(imp VU)-15-876	Serum	New Caledonia (imported Vanuatu)	2015	SRR5309448	0.937517
CK-14-48/01	Saliva swab	Cook Island	2014	SRR5329238	0.985119
Pf13/251013-18	Cell supernatant	French Polynesia	2013	KY766069	1.0

Cell supernatant was obtained by inoculating serum or breast-milk (NC-15-2391) on mammalian VERO cells. The sequences of the Pacific isolates obtained in this study have been submitted to GenBank in the form of Sequence Read Archives, under accession no. SRR5329238 and SRR5309448 to SRR5309458, and for strain Pf13/251013-18 as Genbank accession number KY766069. Genome coverage values relative to Isolate Pf13/251013-18 are mentioned.

Chapitre 4 : Influence de la souche virale Zika sur la transmission par le vecteur *Aedes aegypti* de Nouvelle-Calédonie



Setoh *et al*, 2017

Chapitre 4 : Influence de la souche virale Zika sur la transmission par le vecteur *Aedes aegypti* de Nouvelle-Calédonie

4.1. Contexte de l'étude et démarche expérimentale

L'émergence du virus du ZIKAV en Polynésie Française en 2013 et sa rapide diffusion à l'ensemble de la région Pacifique et à l'échelle mondiale a démontré l'importance de mieux caractériser ce virus et en particulier ses interactions avec son vecteur principal. Les résultats de différentes études phylogénétiques du ZIKAV ont démontré une différenciation entre les souches isolées en Afrique et en Asie et plus récemment une différenciation entre les souches de la lignée asiatique ayant circulées dans le Pacifique et en Amérique (Faye *et al.*, 2014; Lanciotti *et al.*, 2016; Pettersson *et al.*, 2016). Précédemment des études sur la transmission du DENV, du CHIKV, du virus West-Nile et plus récemment du ZIKAV ont mis en évidence que des différences génétiques du virus peuvent avoir un impact sur la transmission par différents vecteurs *Aedes* (Agarwal *et al.*, 2016; Ciota *et al.*, 2017; Diagne *et al.*, 2015; Dupont-Rouzeyrol *et al.*, 2012; Fansiri *et al.*, 2013; Moudy *et al.*, 2007; Pompon *et al.*, 2017; Tsetsarkin *et al.*, 2007; Weger-Lucarelli *et al.*, 2016). L'objectif de cette quatrième partie est donc d'évaluer si les différences génétiques du ZIKAV (lignée asiatique versus lignée africaine) ont un impact sur la transmission du virus par le vecteur calédonien *Ae. aegypti*.

Pour cette étude une population d'*Ae. aegypti* a été récoltée à Nouméa au stade immature (larves et nymphes) et élevée en laboratoire pour l'obtention d'une génération F2. Les femelles, âgées de 5 à 7 jours, ont été infectées avec différentes souches du ZIKAV : trois souches isolées en Nouvelle-Calédonie appartenant à la lignée Asie/Pacifique (en 2014 et 2015), une souche isolée en Guyane appartenant à la lignée Asie/Amérique (en 2016) et trois souches isolées en Afrique (en 1947, 1991 et 2002). Les moustiques femelles ont été gorgées avec un repas infectieux à 10^7 TCID₅₀/mL pendant 20 minutes à 28°C. Les femelles gorgées ont été placées à 28°C et 80% d'humidité, avec un cycle jour/nuit de 12: 12h et elles ont été nourries avec une solution sucrée à 10%. La collecte des salives a été réalisée à 6, 9, 14 et 21 jours après infection. Les corps et têtes ont été analysés par étude de l'effet cytopathique et

les salives par la détermination du titre viral pfu (plaque-forming unit) après inoculation sur cellules VERO et coloration, après 7 jours d'incubation, au cristal violet (Chouin-Carneiro *et al.*, 2016).

4.2. Résultats et conclusion

Les résultats de cette étude font l'objet d'une publication en cours de soumission.

La population d'*Ae. aegypti* testée a montré des différences significatives pour la transmission du ZIKAV et en particulier entre la lignée asiatique et africaine. Tout d'abord pour les virus isolés en Nouvelle-Calédonie et en Guyane, aucune différence significative n'a été notée au niveau des taux d'infection, de dissémination et de la transmission. Cependant une légère augmentation de la transmission semble être observée au niveau des points tardifs. En effet à 21 jours post-infection, l'efficacité de transmission passe de 0%, pour les souches isolées en début d'épidémie, à 4% pour la souche isolée en fin d'épidémie en Nouvelle-Calédonie et à 12% pour la souche isolée en Guyane. Ces premiers résultats semblent indiquer que les faibles différences génétiques des souches de ZIKAV des sous-lignées Pacifique et Amérique, n'ont pas d'impact sur la transmission par le vecteur calédonien *Ae. aegypti*. De plus, malgré un titre infectieux élevé (10^7 TCID₅₀/mL), la diffusion de ces souches est limitée par le passage de la paroi intestinale et des glandes salivaires.

Les résultats de la transmission du ZIKAV de la lignée africaine chez *Ae. aegypti* ont montré plus de divergence au sein de cette lignée. Sur les trois souches testées, deux souches (AF-1947-MR766 et AF-1991-HD78788) montraient une capacité d'infection, de dissémination et de transmission moyenne à élevée pour le moustique calédonien, avec des efficacités de transmission de plus de 40% pour le virus AF-1947-MR766 et de plus de 37% pour AF-1991-HD78788 dès 9 jours post-infection. La troisième souche, AF-2002-ArD 522, semble avoir plus de difficultés à traverser les parois de l'intestin et des glandes salivaires que les deux précédentes.

La comparaison de la quantité de particules virales infectantes dans la salive des moustiques qui présentaient des efficacités de transmission positives, a ensuite été réalisée. Ces résultats ont montré une plus grande concentration de particules virales dans les salives

des moustiques infectés avec les virus AF-1947-MR766 et AF-1991-HD78788, qui montraient une forte efficacité de transmission.

Ce travail évalue pour la première fois l'efficacité de transmission du vecteur *Ae. aegypti* calédonien pour différentes souches de ZIKAV. Comme pour l'étude de compétence vectorielle pour le DENV-1, l'environnement était contrôlé, les différences observées semblent donc être dues aux interactions G x G. De même que pour l'étude de la transmission du DENV-1, la barrière intestinale et la barrière des glandes salivaires semblent limiter la diffusion du ZIKAV dans le vecteur (Calvez *et al.*, 2017). Ces résultats indiquent aussi que les souches ayant circulé en Nouvelle-Calédonie et en Guyane sont faiblement transmises, d'autres facteurs, notamment liés au vecteur et à l'environnement, sont donc à prendre en considération pour expliquer la diffusion rapide de ce ZIKAV de la lignée asiatique. En effet, au-delà de la notion d'ajustement de l'estimation du risque en Nouvelle-Calédonie s'il y avait introduction d'un virus de la lignée africaine sur le territoire, ce travail montre la nécessité de mieux caractériser les interactions entre le vecteur calédonien mais aussi de la région Pacifique pour le ZIKAV, car elles semblent fortement liées aux interactions G x G.

4.3. Article 4

Article 4: *Aedes aegypti* from the Pacific region, transmit more efficiently African lineage Zika viruses than Asian/Pacific/American lineage. (en cours de soumission)

Elodie Calvez¹, Olivia O'Connor¹, Morgane Pol¹, Dominique Rousset², Oumar Faye³, Vincent Richard¹, Arnaud Tarantola¹ and Myrielle Dupont-Rouzeyrol¹

¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, ² Institut Pasteur de la Guyane, ³ Institut Pasteur de Dakar

SUMMARY

Zika virus (ZIKAV) is a Flavivirus transmitted to human by *Aedes* mosquitoes. ZIKAV is divided into two phylogenetic lineages: African and Asian. The aim of this study is to measure the impact of seven ZIKAV strains belonging to both lineages on *Ae. aegypti* vector competence. We demonstrate that *Ae. aegypti* from New Caledonia (NC) is a low-competent vector for Asian ZIKAV. Furthermore, the capacity of ZIKAV transmission by NC *Ae. aegypti* from NC is significantly greater for the viral isolates belonging to the African lineage compared to Asian ones. This study confirms the role of *Ae. aegypti* in the ZIKAV transmission during the outbreak that occurred in NC in 2014-2015. It also demonstrates the capacity of different ZIKAV strains belonging to both lineages to infect and replicate in NC *Ae. aegypti*. Our data emphasizes the importance of studying the interaction between vectors and their arbovirus according to the geographic context.

Zika virus (ZIKAV; family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) was first isolated in the eponymous Ugandan forest in 1947 (Dick et al., 1952). Since its first isolation, ZIKAV was sporadically detected in Africa and Asia, recently emerged in the Pacific region and spread to Latin America (Petersen et al., 2016), causing major outbreaks. ZIKAV is transmitted to humans by the bite of mosquitoes belonging to the

Aedes genus (Chouin-Carneiro et al., 2016; Diagne et al., 2015; Diallo et al., 2014; Duffy et al., 2009; Ledermann et al., 2014; Richard et al., 2016). During this recent epidemic, ZIKAV infection was associated with a dramatic increase in the number of cases of congenital abnormalities including microcephaly and neurological disorders (Cao-Lormeau et al., 2016; Cauchemez et al., 2016; Igor et al., 2016; Molko et al.,

2017; Schuler-Faccini et al., 2016). Previous phylogenetic studies highlighted the presence of two distinct lineages for ZIKAV: African and Asian, with the Asian lineage responsible for the current global expansion of ZIKAV (Faye et al., 2014; Lanciotti et al., 2016; Ye et al., 2016). Among the Asian lineage, two sublineages have been identified, the Pacific and the American (Enfissi et al., 2016; Pettersson et al., 2016).

This recent explosive epidemic of ZIKAV is driven by complex and poorly understood factors. Among the possible factors involved, characteristics of the virus – especially genetic and affecting vector transmission - may at least partially account for the rapid spread of ZIKAV (Agarwal et al., 2016; Anderson and Rico-Hesse, 2006; Armstrong and Rico-Hesse, 2001; Schuffenecker et al., 2006; Tsetsarkin et al., 2007; Vazeille et al., 2003). It is now well established that vector competence of *Aedes aegypti* for dengue virus (DENV) is likely governed to a large extent by mosquito-virus genetic interactions with the outcome of infection depending on the specific combination of mosquito-virus genotype (Calvez et al., 2017; Fansiri et al., 2013; Lambrechts, 2011; Lambrechts et al., 2009; Pongsiri et al., 2014). This has also

been demonstrated for other arboviruses such as chikungunya virus (Agarwal et al., 2016; Dupont-Rouzeyrol et al., 2012; Tsetsarkin et al., 2007) or West Nile virus (Moudy et al., 2007). Recent studies have tested the impact of ZIKAV virus genetics on vector competence with varying results. (Ciota et al., 2017; Diagne et al., 2015; Pompon et al., 2017; Weger-Lucarelli et al., 2016). So far, however, none of these studies has studied seven ZIKAV strains in parallel belonging to both Asian/Pacific, Asian/American and African lineages with field-collected *Ae. aegypti*. The genetic divergence between the Asian and African lineages of ZIKAV is low, less than 12% at the nucleotide level (Haddow et al., 2012). This low genetic divergence may suffice to impact mosquito-virus genetic interactions and, consequently, the vector's ability to transmit ZIKAV strains belonging to different lineages.

New Caledonia (NC) is a French territory in the western part of the South Pacific region. A Zika outbreak occurred in 2014-2015 with more than 1,500 confirmed cases (Dupont-Rouzeyrol et al.; Gourinat et al., 2015). In NC, since 1880s and the first dengue epidemic, *Ae. aegypti* is considered as the main arbovirus vector (Guillaumot, 2005; Perry, 1950). Previous

vector competence studies documented this mosquito's ability to transmit dengue (Calvez et al., 2017) and chikungunya viruses (Dupont-Rouzeyrol et al., 2012).

The aims of this study are to determine the ability of the *Ae. aegypti* from NC to transmit ZIKAV and to measure the potential of different ZIKAV strains belonging to the two genetic lineages to be transmitted by NC *Ae. aegypti*.

For this purpose, four Asian ZIKAV strains belonging to the Pacific sublineage (New Caledonia) or the American sublineage (French Guiana) and three strains belonging to the African lineage (Uganda and Senegal) were used (Table 1). We thus performed experimental infections using the seven ZIKAV strains in order to assess the ability of NC *Ae. aegypti* to transmit Asian and African ZIKAV and measured the impact of ZIKAV lineage and

genetic divergence on *Ae. aegypti* vector competence.

Experimental infections were performed with F2 generation of *Ae. aegypti* field-collected in New Caledonia. For each ZIKAV strains, female mosquitoes were orally exposed to an infectious blood meal at 10⁷ TCID₅₀/mL. Vector competence indices were estimated at 6, 9, 14 and 21 days post-infection (dpi) by detection of the infectious viral particles via plaque-forming unit assay on Vero cells (seven days of incubation, 37°C, 5% of CO₂) (see Supplemental Experimental Procedures). All indices were statistically compared using Fisher's exact test (nonparametric test), considering P-values > 0.05 non-significant. The number of infectious ZIKAV particles in mosquito saliva were compared using Kruskal-Wallis test (nonparametric test).

Table 1. Zika virus strains information. Passage were conducted with VERO cells (a), AP-61(b) cells or C636 cells (c).

ZIKAV strain	Sample name	Country	Year of collection	Host origin	Passage history	Genbank Accession Number
NC-2014-843	NC-843	New Caledonia	February 2014	Human	P3 (a)	SRR5309456
NC-2014-5132	NC-5132	New Caledonia	April 2014	Human	P4 (a)	SRR5309451
NC-2015-2391	NC-2391	New Caledonia	July 2015	Human	P4 (a)	SRR5309449
SA-2016-18246	SA-18246	French Guiana	January 2016	Human	P12 (c, a)	KU758873
AF-1947-MR766	AF-MR766	Uganda	April 1947	Monkey	P27 (b, c, a)	KY989511
AF-1991-HD78788	AF-HD	Senegal	February 1991	Human	Unknown (b, c, a)	KF383039
AF-2002-ArD 165 522	AF-ArD	Senegal	October 2002	<i>Aedes vittatus</i>	P8 (b, c, a)	KF383029

In order to first evaluate the vector competence of the NC *Ae. aegypti* for ZIKAV Asian/Pacific sublineage, we infected female mosquitoes with ZIKAV strains isolated in NC in 2014 and 2015 (Table 1). The proportion of mosquitoes infected was globally high and homogenous after 14 dpi (between 83% for NC-5132 and 93% for NC-843). The dissemination rate was moderate (< 69%) for all ZIKAV strains (Table 2). The infection, at 9 dpi, and the dissemination rates, at 14 dpi, appeared to be significantly higher for the strain NC-2391 than NC-5132 ($p < 0.001$ and $p = 0.02$ respectively). Infectious viral particles were found in the saliva only for

the strain NC-2391 but as early as 6 dpi. Transmission efficiencies were lower than 10% at each dpi tested (Figure 1A). In fact, the ability of the NC *Ae. aegypti* to transmit ZIKAV of the Asian/Pacific sublineage was low for all strains studied.

To further evaluate the NC vector ability to transmit ZIKAV belonging to the Asian lineage, we infected the mosquitoes with a ZIKAV strain isolated in French Guiana, in 2016, belonging to the American ZIKAV expansion (Table 1). *Ae. aegypti* infection and dissemination rates between Pacific and American sublineage were equivalent. At 9 dpi the infection rate of the SA-18246 strain seemed to be higher than

Table 2. Percentages of infection, dissemination and transmission at 6, 9, 14 and 21 days post-infection for the ZIKAV belonging to the Asian lineage.

	Virus	6 dpi	9 dpi	14 dpi	21dpi
% of infection)	NC-2014-843	57% (17/30)	63% (19/30)	93% (28/30)	93% (28/30)
(Number of infected bodies / number of mosquitoes tested)	NC-2014-5132	NT	35% (9/26)	83% (25/30)	NT
	NC-2015-2391	73% (22/30)	83% (25/30)	86% (25/29)	87% (39/45)
	SA-2016-18246	67% (20/30)	87% (26/30)	90% (26/29)	96% (24/25)
	NC-2014-843	47% (8/17)	32% (6/19)	32% (9/28)	50% (14/28)
% of dissemination	NC-2014-843	47% (8/17)	32% (6/19)	32% (9/28)	50% (14/28)
(Number of infected heads / number of infected bodies)	NC-2014-5132	NT	33% (3/9)	20% (5/25)	NT
	NC-2015-2391	45% (10/22)	24% (6/25)	56% (14/25)	64% (25/39)
	SA-2016-18246	40% (8/20)	12% (3/26)	69% (18/26)	63% (15/24)
	NC-2014-843	0% (0/8)	0% (0/6)	0% (0/9)	0% (0/14)
% of transmission	NC-2014-843	0% (0/8)	0% (0/6)	0% (0/9)	0% (0/14)
(Number of infected saliva / number of infected heads)	NC-2014-5132	NT	0% (0/3)	0% (0/5)	NT
	NC-2015-2391	10% (1/10)	17% (1/6)	14% (2/14)	8% (2/25)
	SA-2016-18246	0% (0/8)	0% (0/3)	0% (0/18)	20% (3/15)
	NC-2014-843	0% (0/8)	0% (0/3)	0% (0/18)	20% (3/15)

All vector competence indices were determined by inoculation on VERO cells to detect ZIKAV infectious particles. NT indicates that females were not tested for these analysis points.

for strain NC-5132 ($p < 0.001$) and at 14 dpi the SA-18246 dissemination rate was higher than for NC-843 ($p = 0.014$) or NC-5132 ($p = 0.001$). Infectious viral particles were detected in the saliva only at 21 dpi for SA-18246. As for the Pacific sublineage, the transmission efficiency of the American sublineage was low (12%) (Figure 1A). No significant differences in transmission efficiencies were observed between Asian/American and Asian/Pacific ZIKAV sublineages, although infectious particles were detected in the saliva from 6 days pi for the Pacific sublineage compared to 21 days pi for the American one.

In parallel, we determined the ability of our vector to transmit ZIKAV belonging to the African lineage. For this purpose, infection with three strains of

ZIKAV isolated in Uganda and in Senegal were performed (Table 1). The proportion of infected mosquitoes was high and homogenous during the 21 days of the analysis (between 77% and 100% of infection) (Table 3). ZIKAV dissemination throughout the mosquito body was moderate to high (50% to 100% dissemination). Among the three strains tested, ZIKAV AF-ArD (isolated in Senegal in 2002) disseminated less than the two others with significant differences observed at each dpi. The transmission efficiencies indicated higher transmission capacity for the strain AF-HD (isolated in Senegal in 1991) and AF-MR766 (isolated in Uganda in 1947) (Figure 1). Indeed, for these last two ZIKAV strains, more than 44% of the mosquitoes were able to

Table 3. Percentages of infection, dissemination and transmission at 6, 9, 14 and 21 days post-infection for the ZIKAV belonging to the African lineage.

	Virus	6 dpi	9 dpi	14 dpi	21dpi
% of infection	AF-1947-MR766	NT	100% (30/30)	100% (30/30)	100% (30/30)
(Number of infected bodies / number of mosquitoes tested)	AF-1991-HD78788	90% (27/30)	77% (23/30)	97% (29/30)	95% (20/21)
	AF-2002-ArD 165 522	100% (30/30)	100% (30/30)	96% (28/30)	93% (28/30)
	% of dissemination	AF-1947-MR766	NT	90% (27/30)	73% (22/30)
(Number of infected heads / number of infected bodies)	AF-1991-HD78788	81% (22/27)	96% (22/23)	100% (29/29)	80% (16/20)
	AF-2002-ArD 165 522	50% (15/30)	63% (19/30)	57% (16/28)	61% (17/28)
	% of transmission	AF-1947-MR766	NT	48% (13/27)	50% (11/22)
(Number of infected saliva / number of infected heads)	AF-1991-HD78788	18% (4/22)	50% (11/22)	72% (21/29)	81% (13/16)
	AF-2002-ArD 165 522	7% (1/15)	11% (2/19)	13% (2/16)	18% (3/17)

All vector competence indices were determined by inoculation on Vero cells to detect ZIKAV infectious particles. NT indicates that females were not tested on these days.

transmit ZIKAV at 9 dpi and significant differences were found compared to the AF-ArD strain.

When analyzing all the experimental infections, our results suggest that our local *Ae. aegypti* transmits more easily ZIKAV strains belonging to the African lineage. Significant transmission efficiency differences were shown

MR766 and AF-HD) from 9 dpi (Chi-square test, $p < 0.05$) (Figure 1A). Finally, we quantified the number of infectious viral particles by saliva. Higher ZIKAV titers were found in the saliva of mosquitoes infected with the African lineage strains AF-MR766 and AF-HD (Figure 1B) and significant differences were found between these two strains and the three others (AF-ArD, NC-2391 and SA-18246) from 9 dpi (Kruskal-

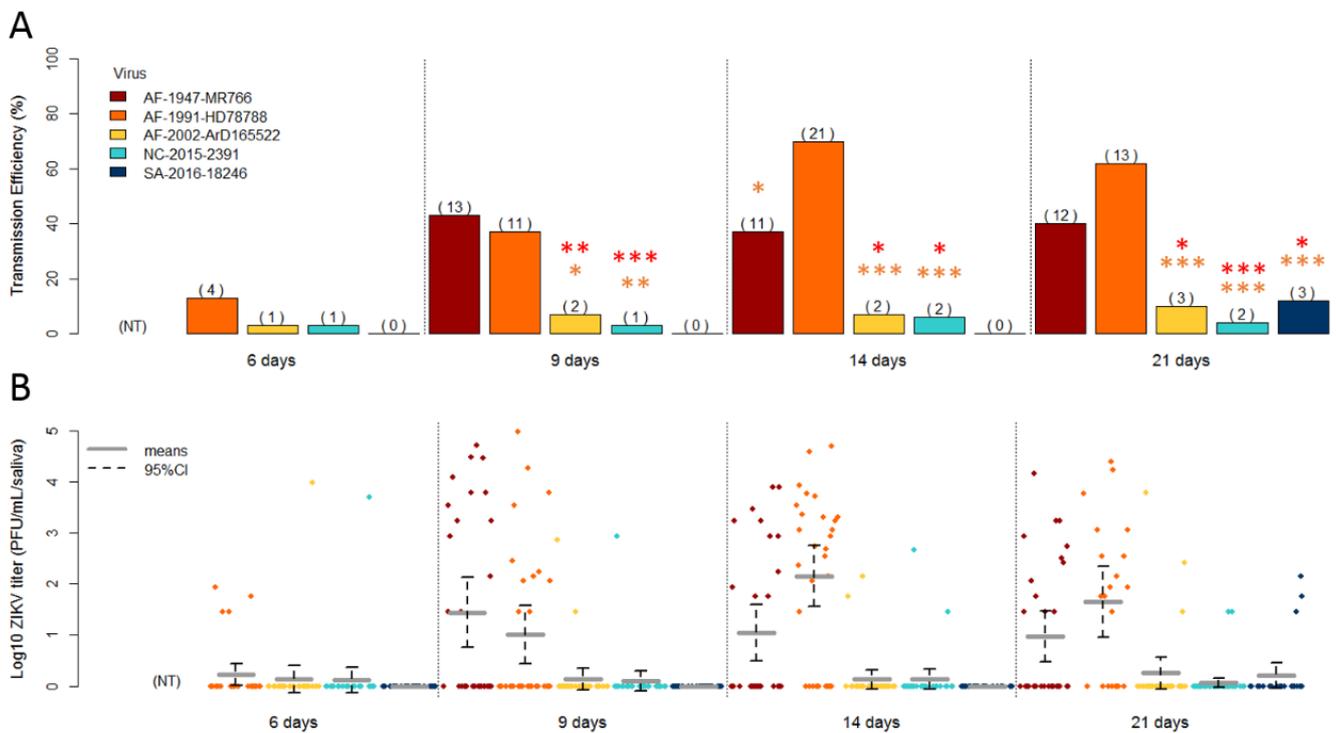


Figure 1. Comparison of transmission of Zika virus strains by *Aedes aegypti* from New Caledonia. (A) Transmission efficiency of ZIKAV by NC *Ae. aegypti* at 6, 9, 14 and 21 days post-infection. The number of positive mosquitoes are indicated above each barplot. Statistically significant differences are indicated by asterisks (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$), in red for differences with the strain AF-1947-MR766 and in orange for the differences with the strain AF-1991-HD78788.

(B) Saliva viral loads of each ZIKAV strain at 6, 9, 14 and 21 days post-infection. The bars refer to the confidence interval of the mean for each ZIKAV strain.

For clarity, only infected populations displaying ZIKAV-positive saliva are shown.

between the four Asian lineage ZIKAV and the two strains of the African lineage (AF-

Wallis test, $p < 0.05$). Interestingly, mosquitoes displaying higher transmission

efficiency also had higher viral titers in their saliva (Figure 1B).

A mosquito is considered as a vector if it is able to transmit a pathogen. Vector competence is determined by the ability of a virus to replicate and disseminate through the body of a mosquito before reaching its salivary glands, thus enabling transmission upon subsequent blood feeding. Our study shows that the NC *Ae. aegypti* is a competent vector for ZIKAV as viral particles were found in its saliva and as early as 6 days pi. We also demonstrated that NC *Ae. aegypti* vector competence for ZIKAV greatly depends on the ZIKAV strain considered.

In our experiment, NC *Ae. aegypti* were better infected by and better disseminated ZIKAV belonging to African lineages compared to Asian lineage. This suggests the influence of a midgut escape barrier. Furthermore, we observed a low transmission rate that suggests the role of a salivary gland barrier in transmission of ZIKAV by this population of *Ae. aegypti*. This salivary gland escape barrier had an effect although the infectious blood-meal provided was at a high titer (10^7 TCID₅₀/mL). Such efficient escape barriers

may have limited the transmission of Asian ZIKAV in our vector. ZIKAV transmission by *Aedes* mosquitoes was laboratory-estimated with several vector populations across the world (Europe, Asia, America and Pacific) with the Asian lineage. Overall, these studies globally demonstrated a low level of transmission, as we observed (Chouin-Carneiro et al., 2016; Costa-da-Silva et al., 2017; Di Luca et al., 2016; Jupille et al., 2016; Ledermann et al., 2014; Li et al., 2017; Richard et al., 2016; Roundy et al., 2017; Weger-Lucarelli et al., 2016). The ZIKAV isolated during the 2013-2016 outbreak seemed to be able to infect and replicate in vectors' bodies but the salivary glands appear to be a main barrier to transmission in *Ae. aegypti* mosquitoes.

Previous studies on dengue or chikungunya viruses have shown that specific virus mutations can modulate the vector's ability to transmit. Recent analyses of genome evolution between Pacific/American sublineages (Pettersson et al., 2016) have identified amino acids substitutions specific to the American sublineage. However, these viral genetic differences did not affect *Ae. aegypti* vector competence in our experimental conditions. We observed no increase in transmission between ZIKAV strains

isolated at the beginning (2014-2015 in New Caledonia) or at the end (2016 in French Guiana) of the recent ZIKAV outbreak. Indeed, the level of ZIKAV transmission remained low with no significant difference, contrary to a recent study by Pompon et al. (Pompon et al., 2017). In this study, significant differences were observed in transmission efficiency of Asian *Ae. aegypti* for a ZIKAV strain from Brazil and a strain from French Polynesia. The greater transmission of the Brazilian strain was correlated with a higher virus titer in the vector body and in the saliva at 10 dpi. This results are in agreement with previous studies showing the impact of the viral titer on escape ZIKAV escape of the midgut barrier (Franz et al., 2015; Hardy et al., 1983).

This mosquito-virus interaction was highlighted with the higher ZIKAV transmission observed for *Ae. aegypti* from NC with the African lineage. These results are in accordance with other studies, on average with higher transmission of ZIKAV belonging to the African lineage by *Aedes* mosquitoes (Roundy et al., 2017; Weger-Lucarelli et al., 2016), except with the *Aedes* mosquitoes from Senegal, where low dissemination and no transmission were reported for the two *Ae. aegypti*

populations tested (Diagne et al., 2015). In the latter study, ZIKAV strains AF-MR766, AF-HD and AF-ArD, were used with the same blood meal titer as in our study to assess ZIKAV vector competence of several F1 generation *Aedes* species from Senegal. Both these studies emphasized the fact that - for a given virus strain - different geographic origins, leading to genetic differentiation within the same vector species (here *Ae. aegypti*) could impact virus transmission (Tabachnick, 2013). Finally, in our study one ZIKAV strain of the African lineage (AF-ArD) was transmitted less well than the two others. This strain was isolated from *Aedes vittatus* in 2002 in Senegal. Although the vector competence results obtained may be due to interactions between the specific virus and vector genotypes, ZIKAV AF-ArD is the only strain isolated from an arthropod (as opposed to mammals for all others) and the only recent strain in the African lineage. Whatever way these observations might have influenced the experimental infections results should be investigated.

A determining factor in arbovirus transmission is the amount of virus excreted in the vector's saliva and potentially inoculated upon blood feeding. The transmitted dose is an essential

parameter of the arbovirus replication dynamics in the vertebrate host which could affect the pathogenesis of the infection (Althouse and Hanley, 2015). We found significant differences in the ZIKAV titration of the collected positive saliva from NC *Ae. aegypti*: the AF-MR766 and AF-HD saliva titers were higher than for the other ZIKAV strains. Significant differences were observed after 9 dpi and indicated better transmission of these two ZIKAV strains according to both the fraction of competent vector and the amount of infectious viral particles in the saliva (Figure 1). These results can guide the risk assessment for potential emergence of ZIKAV from the African lineage in NC.

Our study shows that *Ae. aegypti* from NC is a competent ZIKAV vector. Among the different ZIKAV strains tested, *Ae. aegypti* from NC better transmits African ZIKAV strains. As African ZIKAV strains have not been associated with outbreaks to date, these results are at odds with the recent ZIKAV expansion. The emergence of Asian ZIKAV lineage may be linked to other factors such as changing patterns of human migrations and urbanization rather than vector competence solely. This ZIKAV emergence profile draws a parallel with the recent

chikungunya virus outbreak with the Asian lineage responsible of outbreaks in the Pacific region and in the Americas (Aubry et al., 2015; Weaver, 2014). In both instances, the Asian region and the Asian lineage were at the origin of these diseases' spread. With the geographical expansion of arbovirus vectors, intensification of the exchanges contribute to the dissemination of arboviruses in subtropical and temperate areas (Khormi and Kumar, 2014). Our results underline the need to study the specific interactions between each vector and arboviruses in each geographical context.

Acknowledgements

We thank Catherine Inizan for participating to ZIKAV stock production and for revising the manuscript. We thank Cyrille Goarant for the rabbit blood samples.

This work was supported by the Actions Concertées Inter Pasteuriennes (ZikAe project, ACIP A-15-2014) and by the European Union's Horizon 2020 Research and Innovation Programme under ZIKAlliance Grant Agreement no. 734548.

Author contributions

MDR and EC conceived and designed the experiments. EC and OOC performed the virus infection experiments. EC performed the cellular laboratory work. EC and VR analyzed the data. EC, OOC, MP, DR, OF contributed to reagents/materials/analysis tools. EC and MDR wrote the paper. AT corrected the manuscript. All authors reviewed the manuscript.

References

- (2016). R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Agarwal, A., Sharma, A.K., Sukumaran, D., Parida, M., and Dash, P.K. (2016). Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*. *Virology*. 497, 59-68.
- Althouse, B.M., and Hanley, K.A. (2015). The tortoise or the hare? Impacts of within-host dynamics on transmission success of arthropod-borne viruses. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 370(1675), 20140299. DOI: 10.1098/rstb.2014.0299.
- Anderson, J.R., and Rico-Hesse, R. (2006). *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 75(5), 886-892.
- Armstrong, P.M., and Rico-Hesse, R. (2001). Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 1. DOI: 10.1089/153036601316977769.
- Aubry, M., Teissier, A., Roche, C., Richard, V., Yan, A.S., Zisou, K., Rouault, E., Maria, V., Lastère, S., Cao-Lormeau, V.-M., et al. (2015). Chikungunya Outbreak, French Polynesia, 2014. *Emerging Infectious Diseases*. 21(4), 724-726. DOI: 10.3201/eid2104.141741.
- Calvez, E., Guillaumot, L., Girault, D., Richard, V., O'Connor, O., Paoaafaite, T., Teurlai, M., Pocquet, N., Cao-Lormeau, V.-M., and Dupont-Rouzeyrol, M. (2017). Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia. *Parasites & Vectors*. 10(1), 381. DOI: 10.1186/s13071-017-2319-x.
- Cao-Lormeau, V.M., Blake, A., Mons, S., Lastere, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., et al. (2016). Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. 387(10027), 1531-1539.
- Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., Salje, H., Van Kerkhove, M.D., Abadie, V., Garel,

- C., et al. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. *The Lancet*. 387(10033), 2125-2132. DOI: 10.1016/s0140-6736(16)00651-6.
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., Dupont-Rouzeyrol, M., Lourenço-de-Oliveira, R., and Failloux, A.-B. (2016). Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 10(3), e0004543. DOI: 10.1371/journal.pntd.0004543.
- Ciota, A.T., Bialosuknia, S.M., Zink, S.D., Brecher, M., Ehrbar, D.J., Morrissette, M.N., and Kramer, L.D. (2017). Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. *Emerg Infect Dis*. 23(7), 161633.
- Costa-da-Silva, A.L., Ioshino, R.S., Araujo, H.R., Kojin, B.B., Zanotto, P.M., Oliveira, D.B., Melo, S.R., Durigon, E.L., and Capurro, M.L. (2017). Laboratory strains of *Aedes aegypti* are competent to Brazilian Zika virus. *PLoS One*. 12(2).
- Di Luca, M., Severini, F., Toma, L., Boccolini, D., Romi, R., Remoli, M.E., Sabbatucci, M., Rizzo, C., Venturi, G., Rezza, G., et al. (2016). Experimental studies of susceptibility of Italian *Aedes albopictus* to Zika virus. *Euro Surveill*. 21(18), 1560-7917.
- Diagne, C.T., Diallo, D., Faye, O., Ba, Y., Gaye, A., Dia, I., Weaver, S.C., Sall, A.A., and Diallo, M. (2015). Potential of selected Senegalese *Aedes spp.* mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect Dis*. 15(492), 015-1231.
- Diallo, D., Sall, A.A., Diagne, C.T., Faye, O., Ba, Y., Hanley, K.A., Buenemann, M., Weaver, S.C., and Diallo, M. (2014). Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS One*. 9(10).
- Dick, G.W., Kitchen, S.F., and Haddow, A.J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 46(5), 509-520.
- Duffy, M.R., Chen, T.-H., Hancock, W.T., Powers, A.M., Kool, J.L., Lanciotti, R.S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., et al. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*. 360(24), 2536-2543. DOI: doi:10.1056/NEJMoa0805715.
- Dupont-Rouzeyrol, M., Caro, V., Guillaumot, L., Vazeille, M., D'Ortenzio, E., Thiberge, J.M., Baroux, N., Gourinat, A.C., Grandadam, M., and Failloux, A.B. (2012). Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 12(12), 1036-1041.
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M., and Rousset, D. (2016). Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*. 387(10015), 227-228. DOI: 10.1016/s0140-6736(16)00003-9.

- Fansiri, T., Fontaine, A., Diancourt, L., Caro, V., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J.H., Jarman, R.G., Ponlawat, A., and Lambrechts, L. (2013). Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. *PLoS genetics*. 9(8), 1.
- Faye, O., Freire, C.C., Iamarino, A., de Oliveira, J.V., Diallo, M., Zanotto, P.M., and Sall, A.A. (2014). Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis*. 8(1).
- Franz, A.W.E., Kantor, A.M., Passarelli, A.L., and Clem, R.J. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*. 7(7), 3741-3767. DOI: 10.3390/v7072795.
- Guillaumot, L. (2005). Arboviruses and their vectors in the Pacific--status report. *Pac Health Dialog*. 12(2), 45-52.
- Haddow, A.D., Schuh, A.J., Yasuda, C.Y., Kasper, M.R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R.B., and Weaver, S.C. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis*. 6(2), 28.
- Hardy, J.L., Houk, E.J., Kramer, L.D., and Reeves, W.C. (1983). Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol*. 28, 229-262.
- Igor, A.D.P., Ana Paula, P.B.P., Cristiane, W.C., Mariana, K., Monaise, M.O.S., Lance, A.W., Mitermayer, G.R., Uriel, K., and Guilherme, S.R. (2016). Time Lags between Exanthematous Illness Attributed to Zika Virus, Guillain-Barré Syndrome, and Microcephaly, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Disease journal*. 22(8), 1438. DOI: 10.3201/eid2208.160496.
- Jupille, H., Seixas, G., Mousson, L., Sousa, C.A., and Failloux, A.B. (2016). Zika Virus, a New Threat for Europe? *PLoS Negl Trop Dis*. 10(8).
- Khormi, H.M., and Kumar, L. (2014). Climate change and the potential global distribution of *Aedes aegypti*: spatial modelling using GIS and CLIMEX. *Geospat Health*. 8(2), 405-415.
- Lambrechts, L. (2011). Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol*. 27(3), 111-114.
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R.G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J.H., Jarman, R.G., and Scott, T.W. (2009). Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol*. 9(160), 1471-2148.
- Lanciotti, R.S., Lambert, A.J., Holodniy, M., Saavedra, S., and Signor Ldel, C. (2016). Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015 (*Emerg Infect Dis*. 2016 May;22(5):933-5. doi: 10.3201/eid2205.160065.).
- Ledermann, J.P., Guillaumot, L., Yug, L., Saweyog, S.C., Tided, M., Machieng, P., Pretrick, M., Marfel, M., Griggs, A., Bel, M., et

- al. (2014). *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Negl Trop Dis.* 8(10).
- Li, C.-x., Guo, X.-x., Deng, Y.-q., Xing, D., Sun, A.-j., Liu, Q.-m., Wu, Q., Dong, Y.-d., Zhang, Y.-m., Zhang, H.-d., et al. (2017). Vector competence and transovarial transmission of two *Aedes aegypti* strains to Zika virus. *Emerg Microbes Infect.* 6, e23. DOI: 10.1038/emi.2017.8.
- Molko, N., Simon, O., Guyon, D., Biron, A., Dupont-Rouzeyrol, M., and Gourinat, A.C. (2017). Zika virus infection and myasthenia gravis: report of 2 cases. *Neurology.* 88(11), 1097-1098.
- Moudy, R.M., Meola, M.A., Morin, L.L., Ebel, G.D., and Kramer, L.D. (2007). A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by *Culex* mosquitoes. *Am J Trop Med Hyg.* 77(2), 365-370.
- Perry, W.J. (1950). The mosquitoes and mosquito-borne diseases on New Caledonia, an historic account; 1885-1946. *Am J Trop Med Hyg.* 30(1), 103-114.
- Petersen, L.R., Jamieson, D.J., Powers, A.M., and Honein, M.A. (2016). Zika Virus. *New England Journal of Medicine.* 374(16), 1552-1563. DOI: doi:10.1056/NEJMra1602113.
- Pettersson, J.H., Eldholm, V., Seligman, S.J., Lundkvist, A., Falconar, A.K., Gaunt, M.W., Musso, D., Nougairede, A., Charrel, R., Gould, E.A., et al. (2016). How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? *MBio.* 7(5), 01239-01216.
- Pompon, J., Morales-Vargas, R., Manuel, M., Huat Tan, C., Vial, T., Hao Tan, J., Sessions, O.M., Vasconcelos, P.D.C., Ng, L.C., and Misse, D. (2017). A Zika virus from America is more efficiently transmitted than an Asian virus by *Aedes aegypti* mosquitoes from Asia. *Sci Rep.* 7(1), 017-01282.
- Pongsiri, A., Ponlawat, A., Thaisomboonsuk, B., Jarman, R.G., Scott, T.W., and Lambrechts, L. (2014). Differential susceptibility of two field *Aedes aegypti* populations to a low infectious dose of dengue virus. *PLoS One.* 9(3).
- Richard, V., Paoaafaite, T., and Cao-Lormeau, V.M. (2016). Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis.* 10(9).
- Roundy, C.M., Azar, S.R., Rossi, S.L., Huang, J.H., Leal, G., Yun, R., Fernandez-Salas, I., Vitek, C.J., Paploski, I.A., Kitron, U., et al. (2017). Variation in *Aedes aegypti* Mosquito Competence for Zika Virus Transmission. *Emerg Infect Dis.* 23(4), 625-632.
- Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M.-C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J.-M., Pettinelli, F., et al. (2006). Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean

Outbreak. PLOS Medicine. 3(7), e263. DOI: 10.1371/journal.pmed.0030263.

Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E.M., Feitosa, I.M., Horovitz, D.D., Cavalcanti, D.P., Pessoa, A., Doriqui, M.J., Neri, J.I., Neto, J.M., Wanderley, H.Y., et al. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 65(3), 59-62.

Tabachnick, W.J. (2013). Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. Int J Environ Res Public Health. 10(1), 249-277.

Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., McGee, C.E., and Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. PLoS Pathog. 3(12).

Vazeille, M., Rosen, L., Mouson, L., and Failloux, A. (2003). Low oral susceptibility for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. Am J Trop Med Hyg. 68, 203 - 208.

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), e2921. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002921.

Weger-Lucarelli, J., Ruckert, C., Chotiwan, N., Nguyen, C., Garcia Luna, S.M., Fauver, J.R., Foy, B.D., Perera, R., Black, W.C., Kading, R.C., et al. (2016). Vector Competence of American

Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. PLoS Negl Trop Dis. 10(10).

Ye, Q., Liu, Z.-Y., Han, J.-F., Jiang, T., Li, X.-F., and Qin, C.-F. (2016). Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. Infection, Genetics and Evolution. 43, 43-49. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.05.004>

Supplemental Experimental Procedures

Mosquito collection

Mosquitoes were sampled at the immature stage (larvae and pupae) in Noumea from an artificial breeding site during the hot season. Larvae and pupae were reared to adult stage and female were blood-fed several times with guinea pig blood to obtain F1 and F2 generation eggs. For oral infection, F2-eggs were hatched and adults were maintained at 28°C and 80% of humidity under 12:12h light-dark cycle with an ad libitum access to 10% sucrose solution.

Viral strain

Seven ZIKAV strains were used in this study (Table 1). Three strains were isolated from patients in New Caledonia during the 2014-2015 outbreak, two at the beginning of the outbreak in February and

April 2014 (NC-2014-843 and NC-2014-5132 respectively) and one at the end in July 2015 (NC-2015-2391). The ZIKAV strain from the sub-American sublineage was obtained from a patient blood sample in French Guiana in January 2016 (SA-2016-18246). Three strains were collected in Africa, the MR766 strain was isolated from a rhesus macaque in Zika Forest in Uganda in 1947 (Diagne et al., 2015; Faye et al., 2014). The second strain HD78788 was isolated from a patient in Senegal in 1991 (Diagne et al., 2015; Faye et al., 2014). The third strain ArD 165 522 was collected from an *Aedes vittatus* in Senegal in 2002 (Diagne et al., 2015; Faye et al., 2014). The final viral stock was prepared with a passage on mammalian VERO cells in DMEM medium (Gibco) with 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco) for 3-5 days at 37°C and 5% of CO₂. Supernatants were collected and stored at -80°C. For each viral stock, viral titer was determined by serial 10-fold dilutions on VERO cells and expressed in TCID₅₀/mL.

Mosquito oral infections

Five to seven days-old females, not previously blood fed, were starved for 24 hours before infection. They were allowed to take an infectious blood meal, through an artificial system with pig intestine membrane containing 2 ml of rabbit washed erythrocytes and 1 ml of viral suspension supplemented with adenosine triphosphate (Sigma-Aldrich) at 5 mM as a phagostimulant. The ZIKAV final concentration in the blood meal was 10⁷ TCID₅₀/mL. After the blood-meal fully engorged females were transferred into new containers and maintained at 28°C and 80% of humidity and 12:12h light-dark cycle with a 10% sucrose ad libitum access.

Infection, dissemination and transmission analysis

For each virus tested, 20-30 females were analyzed at 6, 9, 14, 21 days post-infection (dpi). For each mosquito, abdomen and thorax were analyzed to determine infection rate, head for dissemination rate and saliva for transmission rate. For each salivation the females were cold anesthetized and had their legs and wings removed. The proboscis of each of them was inserted into a filter tip ART (Molecular BioProducts) containing 5 µl of fetal bovine serum (FBS)

for salivation during 20 minutes. The body and the head were individually ground in 250µL of DMEM medium supplemented with 2% FBS, lysis was carried during 30 seconds at 6,000 rpm and the samples were centrifuged at 10,000g during 10 minutes at 4°C. The supernatants were stored at -80°C before analysis. For viral detection, head and body samples were inoculated onto VERO cells in 96-well plates, incubated at 37°C and 5% of CO₂ during 7 days and stained with a solution of crystal violet (0.2% in 10% formaldehyde and 20% ethanol). The viral particles detection was determined by the presence of CPE (cytopathic effect). The saliva were inoculated, directly after the salivation, onto VERO cells in 6-wells plates under an agarose overlay at 2% and incubated at 37°C and 5% of CO₂ during 7 days and processed as previously. Titers of saliva were expressed as Plaque Forming unit pfu/saliva.

Statistical analysis

Statistical analysis were performed with R v. 3.3.1 (R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) (2016). All rates were statistically compared using Chi-square test or Fisher's exact test, considering P-values > 0.05 non-significant.

The number of infectious ZIKAV particles in mosquito saliva were compared using Kruskal-Wallis test.

Partie 3 : Discussion générale et perspectives

Discussion générale et perspectives

Depuis plusieurs années, et en particulier suite à l'épidémie mondiale de Zika qui a sévi entre 2013 et 2016, la région Pacifique apparaît comme une nouvelle zone d'émergence pour les arboviroses (Cao-Lormeau, 2016). En effet cette région illustre parfaitement les conséquences de l'augmentation des échanges régionaux et internationaux, liés au tourisme et au commerce et qui permettent une circulation accrue des arbovirus par le biais d'hôtes infectés. Ainsi, depuis dix ans, l'accroissement des échanges entre les différentes îles du Pacifique, auparavant isolées géographiquement, favorise la propagation à l'échelle régionale d'arboviroses dues aux virus de la dengue, du chikungunya et du Zika, et ce dans des zones jusqu'à présent relativement préservées (Cao-Lormeau and Musso, 2014; Roth *et al.*, 2014). Or, à ce jour, nous disposons de très peu d'informations sur les moustiques vecteurs et leurs capacités à transmettre des arbovirus. Ces données sont pourtant nécessaires pour mieux comprendre l'incidence particulière des arboviroses. C'est dans ce cadre que ce travail de thèse a été réalisé, avec un intérêt particulier pour l'étude des interactions virus / vecteur (Figure 28).

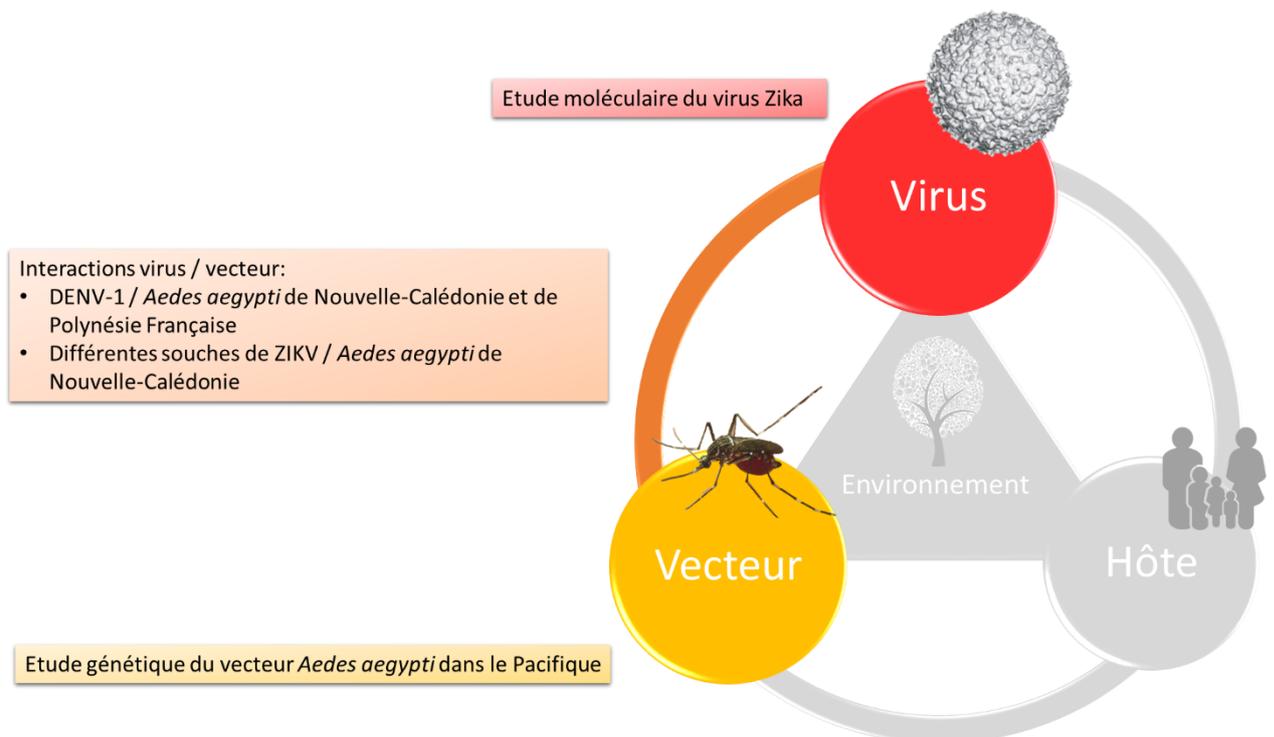


Figure 28. Résumé des objectifs de ce travail de thèse.

Les résultats présentés dans ce manuscrit décrivent pour la première fois les interactions à l'échelle régionale entre le vecteur *Ae. aegypti* et le DENV-1 (Article 2) mais aussi, à l'échelle plus locale de la Nouvelle-Calédonie, entre ce même vecteur et le ZIKAV (Article 4).

1. Etude de la compétence vectorielle d'*Aedes aegypti* dans le Pacifique

1.1. Le rôle des barrières physiologiques dans la réponse du moustique à l'infection

Dans les conditions expérimentales utilisées, les interactions entre les arbovirus et *Ae. aegypti* de cette région du monde ont mis en évidence le rôle clé des barrières physiologiques du moustique (Figure 29) dans la transmission du DENV-1 et du ZIKAV, notamment par l'analyse des différents indicateurs de l'infection (présence du virus dans l'intestin), de la dissémination (échappement de la barrière intestinale, le virus est alors présent dans la tête et les pattes) et de la transmission virale (présence du virus dans la salive) décrits dans les Articles 2 et 4 de ce manuscrit.

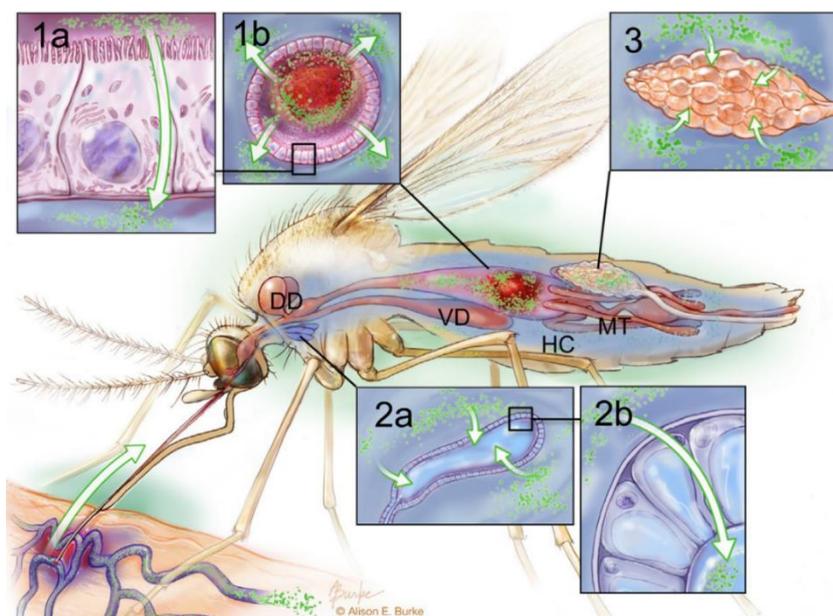


Figure 29. Les barrières à la transmission des arbovirus chez le moustique. Le passage du virus depuis les villosités apicales de la lumière de l'intestin vers la périphérie basolatérale adjacente est schématisé en 1b, avec un zoom sur le passage du virus à travers l'épithélium intestinal en 1a. Le passage du virus dans les glandes salivaires est présenté en 2, avec une infection des cellules épithéliales depuis le côté basal vers le côté apical pour que les virus puissent rejoindre la lumière du canal salivaire (2a), un zoom sur ce passage est présenté en 2b. L'infection virale des ovaires est représentée en 3. De Kenney *et al.*, 2014.

De précédentes études ont montré que l'infection des cellules de l'épithélium intestinal du moustique est une étape déterminante de la transmission des Flavivirus (Bosio *et al.*, 2000; Franz *et al.*, 2015; Gubler *et al.*, 1979). Les mêmes observations ont été faites lors des études présentées dans ce manuscrit. Nous avons en effet pu observer que même si l'infection des moustiques *Ae. aegypti* de Nouvelle-Calédonie et de Tahiti par le DENV-1 est faible à modérée, la dissémination virale est importante et les virus ayant infecté les cellules intestinales ne sont donc pas arrêtés lors de leur passage à travers le pôle basal de ces cellules (Article 2). A l'inverse, bien que les taux d'infection du vecteur *Ae. aegypti* calédonien par les différentes souches de ZIKAV soient hauts, les taux de dissémination sont plus hétérogènes et significativement différents entre les souches de ZIKAV de la lignée africaine et asiatique (Article 4). Il semble donc que le tropisme du DENV-1 et du ZIKAV pour les cellules épithéliales de l'intestin du moustique soit différent, non seulement en fonction des virus considérés, mais aussi en fonction des souches d'un virus donné. En effet le DENV-1 semble avoir des difficultés à infecter les cellules épithéliales alors que pour le ZIKAV, c'est la sortie de l'épithélium intestinal qui semble être limitante pour certaines des souches étudiées (Figure 30).

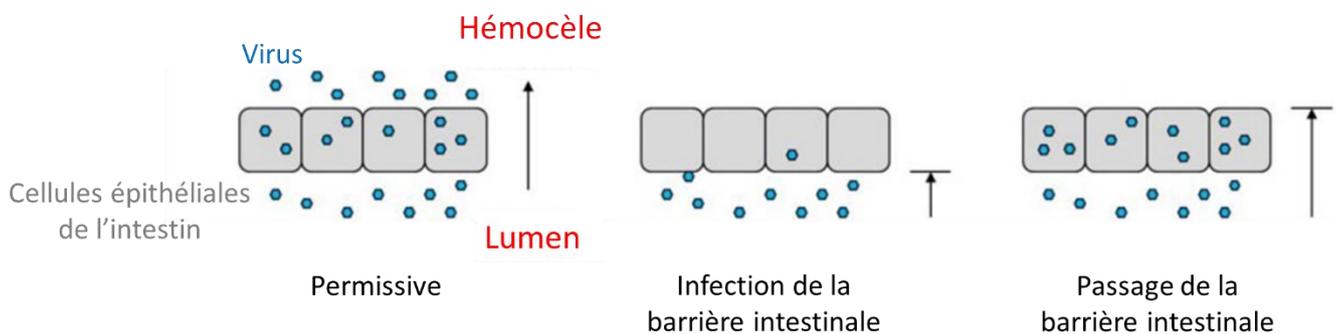


Figure 30. Représentation schématique de la perméabilité des cellules épithéliales intestinales.

Adaptée de Franz *et al.*, 2015.

L'intestin du moustique est le site initial de l'infection par le virus, il est donc essentiel de mieux comprendre les interactions entre ces virus et les cellules épithéliales de l'intestin du vecteur *Ae. aegypti*. L'évaluation de la proportion de virus capables d'infecter les cellules de l'épithélium qui intervient avant la formation complète de la membrane péritrophique, environ 12 heures après la prise du repas infectieux (Perrone and Spielman, 1988), permettrait peut-être de mieux comprendre les faibles taux d'infection par le DENV-1 génotype I observé dans notre étude. Des études réalisées sur le virus West-Nile, le virus de l'encéphalite équine de l'Est, le virus de l'encéphalite équine vénézuélienne ou le virus de

l'encéphalite de Saint Louis ont montré que seulement 20 à 30% des cellules de l'intestin, des moustiques positifs pour l'infection, étaient infectées par les virus, ce qui illustre que l'infection de l'épithélium intestinal est la première barrière à la transmission des arbovirus (Scholle *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2008; Whitfield *et al.*, 1973).

L'infection de l'épithélium de l'intestin par les arbovirus est médiée par des récepteurs membranaires qui, par la reconnaissance spécifique du domaine III de la protéine de l'enveloppe des Flavivirus, permettraient leur entrée dans la cellule durant l'infection (Mercado-Curiel *et al.*, 2008; Smith, 2012). Plusieurs protéines et glycoprotéines ont été identifiées comme récepteurs cellulaires (Franz *et al.*, 2015). L'utilisation d'anticorps contre par exemple les protéines 70 kDa et 95 kDa des cellules C6/36 a par ailleurs permis de montrer que la neutralisation de ces protéines empêchait l'entrée du virus West-Nile dans les cellules, alors que cela n'avait pas d'effet pour le virus de l'encéphalite japonaise ou pour le DENV, soulignant ainsi la spécificité de ces récepteurs (Chu *et al.*, 2005). Les protéines 67 kDa et 80 kDa ont également été identifiées comme permettant la reconnaissance du DENV chez les cellules épithéliales d'*Ae. aegypti* et les cellules C6/36 (Mercado-Curiel *et al.*, 2006; Munoz *et al.*, 1998).

Les résultats présentés dans ce manuscrit indiquent également que le passage du virus dans les glandes salivaires, par le franchissement de la lame basale de la glande salivaire et la réplication dans les cellules épithéliales, semble limité pour le DENV-1 et le ZIKAV chez le vecteur *Ae. aegypti* de la région Pacifique. Les mécanismes par lesquels le virus arrive à franchir la barrière épithéliale des glandes salivaires et peut se retrouver dans la lumière de celles-ci sont encore mal connus (Franz *et al.*, 2015). Grâce à la microscopie électronique en transmission, une étude de la réplication du CHIKV dans les glandes salivaires du moustique a permis de mettre en évidence que la réplication de ce virus n'induit pas d'effet cytopathique 6 jours post-infection (Vega-Rúa *et al.*, 2015). A l'inverse, une étude de la transmission du virus Sindbis par le vecteur *Ae. albopictus* a montré que, 10 jours post-infection, la présence du virus induit une augmentation de l'apoptose des cellules épithéliales des glandes salivaires infectées (Kelly *et al.*, 2012). Ces résultats indiquent que les mécanismes de réponse cellulaire à l'infection des glandes salivaires ne sont pas le même en fonction du virus, et que cette réponse peut impacter la transmission de l'arbovirus par le vecteur. En Polynésie Française, plusieurs protéines ont été identifiées comme potentiels récepteurs au niveau de l'épithélium

des glandes salivaires (Cao-Lormeau, 2009). Dans cette étude, des extraits protéiques de glandes salivaires d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. polynesiensis* ont été mis en contact avec des souches virales correspondantes à chaque sérotype du DENV afin de déterminer quelles protéines du vecteur étaient capables d'interagir avec les différentes souches de DENV (Virus Overlay Protein Binding Assay). Cette étude a permis de montrer que quatre protéines provenant des extraits de glandes salivaires étaient capables de se lier à ces souches virales. Néanmoins les extraits utilisés contenaient l'ensemble des cellules de l'épithélium des glandes salivaires et des protéines sécrétées dans la salive suite à l'infection. Il reste donc à déterminer la localisation de ces protéines dans l'épithélium des glandes salivaires et à tester l'éventuel rôle de ces interactions lors du passage du DENV à travers de l'épithélium des glandes salivaires du moustique.

L'utilisation d'anticorps primaires monoclonaux spécifiques de protéines virales couplée à celle d'anticorps secondaires fluorescents, ainsi qu'une observation en microscopie confocale permettraient une quantification précise de la localisation tissulaire, mais aussi cellulaire, des virus dans des moustiques infectés, dans des vecteurs chez lesquels il y a eu dissémination du virus, ainsi que dans des moustiques capables de transmettre le virus. Ces données pourraient ainsi permettre d'évaluer la capacité des arbovirus à passer au travers de l'épithélium intestinal et à franchir la barrière des glandes salivaires chez les *Ae. aegypti* des populations de Nouvelle-Calédonie ou de la région Pacifique. L'identification des récepteurs des épithéliums de l'intestin et des glandes salivaires apparaît également essentielle dans l'étude de la transmission des arbovirus. Une étude des données bibliographiques (en cristallographie etc...) permettrait d'identifier les protéines candidates, et des expériences de co-immunoprécipitation pourraient mettre en évidence des interactions physiques entre ces protéines candidates et les protéines virales. Le blocage ou l'activation forcée, via l'utilisation d'anticorps ou de molécules antagonistes/agonistes, faciliterait la caractérisation du rôle de ces potentielles interactions lors de l'infection virale, et ce en présence de différents arbovirus, et ce qui mettrait ainsi en évidence d'éventuelles spécificités vis-à-vis d'un virus. Une étude par microscopie électronique de l'épithélium des glandes salivaires après l'infection par un virus donné donnerait aussi des informations sur la physiologie des cellules de l'épithélium au cours de l'infection.

1.2. Des relations complexes entre virus et vecteurs

La réémergence du ZIKAV en Polynésie Française, associée à la présence dans le Pacifique de plusieurs espèces d'*Aedes* connues comme étant de potentiels vecteurs d'arbovirus, ont permis la circulation du ZIKAV dans plusieurs îles de la région Pacifique (Guillaumot, 2005; Ledermann *et al.*, 2014; Richard *et al.*, 2016; Roth *et al.*, 2014). Des travaux réalisés dans le cadre de ce travail doctoral sur la compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. polynesiensis* à l'échelle régionale ont montré que ces deux vecteurs sont compétents pour le ZIKAV, même si les taux de transmission sont faibles, sans différences significatives entre les espèces ou les populations de vecteurs testées. Les résultats obtenus dans cette étude étant encore préliminaires, ils n'ont pas été développés dans ce manuscrit.

Lors de l'étude sur l'évolution génétique du ZIKAV (Article 3), plusieurs substitutions nucléiques ont été observées dans le génome viral des souches de ZIKAV de la lignée asiatique. Les mutations présentes au niveau de la protéine de l'enveloppe (D683E, T777M et V763M) ont été observées dans les génomes de ZIKAV isolés après l'épidémie survenue à Yap en 2007 qui a eu lieu avant la réémergence du virus en Polynésie Française (Pettersson *et al.*, 2016). L'hypothèse que ces substitutions soient dues à une circulation prolongée du ZIKAV dans la région Pacifique ou en Asie reste encore à explorer.

Un autre facteur pouvant influencer l'évolution génétique des virus est lié au passage du virus chez le vecteur. Cette hypothèse a en effet été soulevée dans une étude de l'évolution génétique du DENV-1 en Polynésie Française (Descloux *et al.*, 2009). Dans cette étude, la transmission par *Ae. aegypti* ou *Ae. polynesiensis* de ce virus semble avoir entraînée la sélection de variants génétique différents de ce virus. De même, l'évolution génétique du ZIKAV pourrait être due à différents facteurs liés à l'hôte, mais aussi au moustique et notamment à la transmission par les différents vecteurs présents dans la région Pacifique et en Asie. En effet, différentes études ont démontré que le passage des barrières physiologiques tel que la barrière de l'intestin ou celle des glandes salivaires module, d'une part, la transmission vectorielle et, d'une autre part, diminue la diversité virale par des phénomènes de goulots d'étranglement. Ce phénomène est principalement observé après le passage des glandes salivaires qui sélectionne des variants plus facilement transmis par une espèce de vecteur donnée, avec donc un potentiel épidémique plus important pour ces virus

sélectionnés et mieux adaptés aux vecteurs locaux (Ciota *et al.*, 2012; Sim *et al.*, 2015; Stapleford *et al.*, 2014; Vega-Rua *et al.*, 2015). L'étude de ces variants par une approche de « deep sequencing », en différenciant les zones anatomiques des vecteurs (corps, tête, salive) pourrait permettre de déterminer la diversité génétique de la population virale contenue chez les moustiques, en fonction des zones anatomiques considérées pour une même espèce, mais aussi en fonction de l'espèce vectrice considérée.

2. L'impact du microbiome et de l'environnement sur la transmission des arbovirus

Dans la discussion du second article de ce manuscrit, nous avons évoqué d'autres paramètres pouvant avoir un impact important dans la transmission des arbovirus, tels que le microbiome ou l'immunité innée du moustique. En effet, lors de l'étude de compétence vectorielle d'*Ae. aegypti* pour le DENV-1, nous avons observé que le taux d'infection de deux des populations testées, celles de Nouméa et de Poindimié, diminuait au cours du temps. Le taux de survie ne diminuant pas de façon significative pour ces deux populations, nous avons soulevé l'hypothèse d'un possible rôle du microbiome et/ou de l'immunité innée de ces populations d'*Ae. aegypti* sur la diminution de l'infection par le DENV-1. La diminution progressive des taux d'infection pourrait être due au temps nécessaire au déclenchement des systèmes de défense dont dispose le moustique.

Plusieurs études ont montré que le microbiome spécifique du moustique peut impacter la transmission, notamment celle du DENV (Apte-Deshpande *et al.*, 2012; Ramirez *et al.*, 2014; Ramirez *et al.*, 2012). L'utilisation d'antibiotiques lors de l'élevage des larves, afin d'inhiber le microbiome du moustique, permettrait d'évaluer l'impact de celui-ci sur la transmission des arbovirus par le vecteur *Ae. aegypti* local. Il est intéressant de noter que le microbiome du moustique est modulé par des facteurs environnementaux qui peuvent être biotiques, tels que la compétition avec d'autres insectes ou par le type de faune et de flore se trouvant à proximité des sites de pontes, mais aussi abiotiques, tels que la température ou l'humidité (Minard *et al.*, 2013; Zouache *et al.*, 2011). La Nouvelle-Calédonie est connue pour la richesse de sa flore, avec près de 3200 espèces, ainsi que pour son haut taux d'endémisme végétal (8 plantes sur 10 sont endémiques). Cette richesse florale étant due à la multiplicité

des substrats du sol et à la variabilité du climat de l'île (Morat, 1993). L'étude du microbiome de ces populations, par deep-sequencing notamment, serait une première approche pour évaluer la diversité bactérienne de ces populations, et avoir une idée de l'impact des conditions environnementales sur la composition de ce microbiome.

L'immunité innée du moustique, représentée par des voies de signalisation cellulaire, telles que les voies Toll, Jak-STAT et ARNi qui sont décrites dans l'introduction de ce manuscrit, est connue pour réguler la transmission des arbovirus (Barletta *et al.*, 2017; Blair, 2011; Blair and Olson, 2015; Fragkoudis *et al.*, 2009; Souza-Neto *et al.*, 2009; Xi *et al.*, 2008). La voie ARNi, qui inhibe la traduction via des petits ARN interférents, altère notamment la réplication virale dans le vecteur (Blair, 2011; Sim *et al.*, 2014). Une récente étude a permis de mettre en avant le rôle de certains récepteurs de la voie Jak-STAT et de démontrer une potentielle spécialisation antivirale de cette voie dans l'infection par différents arbovirus (Jupatanakul *et al.*, 2017). L'étude des voies de signalisation de l'immunité innée dans les populations d'*Ae. aegypti* en Nouvelle-Calédonie pourrait permettre de mieux comprendre les différences de taux d'infection observées, notamment avec le DENV-1. En effet, l'immunité innée du moustique est connue pour être régulée par l'environnement, mais aussi, de manière intéressante, par le microbiome, qui joue notamment un rôle dans son activation basale (Dennison *et al.*, 2014; Jupatanakul *et al.*, 2014; Ramirez *et al.*, 2012; Xi *et al.*, 2008). Les différentes études proposées ci-dessus pourraient ainsi fournir des informations sur la composition du microbiome, le fonctionnement du système immunitaire inné, les interactions existantes entre ces deux paramètres et leurs influences sur la transmission des arbovirus. Ces données permettraient de mieux caractériser les populations calédoniennes d'*Ae aegypti* et de mieux comprendre les taux d'infection observés.

L'environnement est aussi un paramètre majeur de la transmission des arbovirus, avec notamment des facteurs comme la température et les précipitations qui ont un rôle direct sur le développement du moustique. La température est un facteur essentiel de la transmission des arbovirus, en impactant la dissémination et la transmission virale et en modulant la période d'incubation extrinsèque (Gloria-Soria *et al.*, 2017; Kenney and Brault, 2014; Lambrechts *et al.*, 2011; Vega-Rua *et al.*, 2015; Zouache *et al.*, 2014). En Nouvelle-Calédonie, des études ont montré un lien entre la température et les épidémies de dengue observées sur le territoire entre 1995 et 2012 (Descloux *et al.*, 2012; Teurlai *et al.*, 2015). La Nouvelle-

Calédonie est un territoire où les saisons fraîches et sèches et les saisons chaudes et humides, sont marquées par des différences de températures oscillant entre 16 et 24°C en hiver (avril à septembre), avec des fluctuations importantes entre la journée et la nuit, et des températures allant de 23 à 30°C en été (octobre à mars) (source météo France). Les expériences de compétence vectorielle présentées dans ce manuscrit ont été réalisées en environnement contrôlé (à 28°C). Il semble important, afin de mieux caractériser la transmission des arbovirus en Nouvelle-Calédonie, de réaliser des études de compétence vectorielle en tenant compte de ces fluctuations journalières et saisonnières de température pour évaluer leurs impacts sur la transmission virale par le vecteur *Ae. aegypti* calédonien.

3. Le rôle de l'intensification des échanges sur la dissémination des arbovirus et de leurs vecteurs

L'étude des différents paramètres décrit précédemment est essentielle pour augmenter les connaissances sur les épidémies d'arboviroses en Nouvelle-Calédonie et dans la région pacifique, mais il est aussi important de se replacer dans le contexte géopolitique qui caractérise notre zone d'étude. En effet, l'augmentation des échanges entre les différentes îles du Pacifique et le reste du monde, en particulier avec l'Asie et l'Australie, entraîne un accroissement de la circulation des arbovirus, et augmente le risque d'introduction de nouveaux vecteurs. Les résultats, obtenus dans le premier article présenté dans ce manuscrit, démontrent bien que l'introduction d'*Ae. aegypti* dans la région Pacifique est à mettre en corrélation avec les différentes vagues d'immigration humaine en provenance d'Asie et des échanges entre les îles du Pacifique, les échanges commerciaux avec l'Asie et l'Australie, et à des événements géopolitiques d'ampleurs comme la seconde guerre mondiale.

Ae. aegypti n'est pas le seul vecteur à s'être rapidement propagé à l'échelle du Pacifique. *Ae. albopictus* envahit les îles de cette région depuis les années 1970 et sa présence est confirmée dans 5 des 17 pays et territoires du Pacifique Sud (Guillaumot *et al.*, 2012). L'état des lieux de l'aire de répartition d'*Ae. albopictus* dans la région Pacifique étant réalisé lors de missions d'investigations en lien avec des épidémies d'arboviroses, on peut raisonnablement penser que ce vecteur est présent sur d'autres îles de la région.

La Nouvelle-Calédonie n'est pas épargnée par l'introduction de nouvelles espèces vectrices et, si *Ae. albopictus* n'a jamais été détecté pour le moment sur le territoire, les introductions d'*Aedes scutellaris* en 2016, vecteur du DENV (Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, 2016; Moore *et al.*, 2007) et d'*Anopheles bancroftii* en 2017, potentiel vecteur de *plasmodium* (Pol *et al.*, en cours de soumission) (Cooper *et al.*, 2009; Hii *et al.*, 2000) en sont les exemples les plus récents. Ces introductions multiples et récentes sont un bel exemple des conséquences possibles de la mondialisation des échanges et démontrent bien l'importance, dans un contexte insulaire, de la surveillance entomologique aux points d'entrées internationaux que sont les aéroports et les ports.

La surveillance de la circulation des arbovirus est aussi un enjeu majeur pour la région Pacifique, là encore du fait de l'augmentation des échanges régionaux et internationaux. La circulation du DENV, du CHIKV et du ZIKV a déjà démontré la rapide propagation des épidémies à l'échelle régionale et mondiale. D'autres arbovirus circulent ou ont circulé dans la région Pacifique comme c'est notamment le cas du virus Ross River et du virus de l'encéphalite japonaise. Le virus Ross River est ainsi régulièrement détecté en Australie depuis 1959 (Knape *et al.*, 2016). Il a aussi été responsable d'une épidémie qui a touché une grande partie de la région Pacifique, notamment la Nouvelle-Calédonie, Fidji, les îles Cook, les Samoa américaines, entre 1979 et 1980 (Harley *et al.*, 2001). Il semblerait cependant que le virus Ross River ait circulé dans la région, en Polynésie Française, à Samoa et à Fidji, depuis cette première épidémie comme démontré par les récentes enquêtes de séroprévalence (Aubry *et al.*, 2015; Aubry *et al.*, 2017a; Klapsing *et al.*, 2005; Lau *et al.*, 2017). Dans la région Pacifique, plusieurs vecteurs potentiels de ce virus sont présents, comme par exemple *Aedes vigilax*, *Aedes notoscriptus* ou *Culex annulirostris* (Guillaumot, 2005). Le virus de l'encéphalite japonaise, détecté en Papouasie-Nouvelle-Guinée et en Australie en 1995 (Erlanger *et al.*, 2009), semble pouvoir être transmis dans la région Pacifique principalement par les moustiques *Culex tritaeniorhynchus*, *Culex annulirostris* et *Culex sitiens* (Guillaumot, 2005). D'autres arbovirus ont été détectés en Australie, c'est le cas du virus de l'encéphalite de la Murray Vallée ou du virus West Nile, tous les deux transmis par *Culex annulirostris* (Russell and Dwyer, 2000). A l'heure actuelle, aucun cas de fièvre jaune n'a été détecté dans la région Pacifique, mais l'épidémie actuelle en particulier en Amérique du Sud et en Afrique représente un réel risque d'émergence pour la région en présence des vecteurs potentiels que sont *Ae.*

aegypti, *Ae. notoscriptus* et *Ae. albopictus* (Couto-Lima *et al.*, 2017; Grobbelaar *et al.*, 2016; van den Hurk *et al.*, 2011; Woodall and Yuill, 2016). Ainsi, la surveillance épidémiologique et les recommandations des autorités sanitaires sont des éléments indispensables pour éviter l'introduction, dans la région Pacifique et en Nouvelle-Calédonie, d'arbovirus jusqu'alors non détectés. L'introduction au sein d'une population immunologiquement naïve peut en effet avoir des conséquences désastreuses, cela a d'ailleurs été le cas lors de l'épidémie de Zika en Amérique du Sud.

4. Conclusion

L'émergence du virus Zika et sa rapide propagation à l'échelle de la région Pacifique, puis à l'échelle mondiale, a démontré qu'à l'heure actuelle il est encore difficile de contrôler la propagation des arbovirus. Cela met en avant la nécessité d'optimiser les systèmes de surveillance vectorielle et épidémiologique à l'échelle locale et régionale dans le but de détecter le plus précocement possible toute épidémie.

Enfin, la lutte contre les épidémies liées aux arbovirus ne peut plus uniquement être basée sur les techniques classiques de lutte anti-vectorielle. Le développement accru des résistances aux insecticides associé à la difficulté de développement de certains vaccins, comme par exemple celui dirigé contre les différents sérotypes du DENV, implique aujourd'hui de développer de nouvelles méthodes de lutte dirigées contre les vecteurs ou contre les arbovirus. L'une de ces nouvelles stratégies est basée sur l'utilisation de *Wolbachia* dans le but de limiter la répllication virale chez *Ae. aegypti*. Cette méthode est déjà déployée en Asie du sud-est, en Amérique du sud et en Australie (World Mosquito Program™) et est envisagée en Nouvelle-Calédonie. L'utilisation de contrôle génétique des vecteurs est également une voie à envisager, en tenant compte des règles d'éthiques liées à ce type de projet et des problèmes de communication pouvant être rencontrés auprès des populations locales (Aliota *et al.*, 2016b; Aliota *et al.*, 2016c; Alphey, 2014; Alphey, 2016; Esvelt *et al.*, 2014; Joubert and O'Neill, 2017).

Il est donc essentiel de comprendre les mécanismes menant à l'émergence d'une épidémie d'arbovirose dans la région Pacifique, comme partout ailleurs dans le monde. Pour cela il convient d'identifier les facteurs à prendre en compte, de récolter des données

permettant d'étudier leurs influences sur l'arbovirose considérée mais aussi de caractériser les interactions existant entre tous ces paramètres.

Un facteur clé à prendre en compte lors de l'émergence d'une arbovirose, et qui a été le point central de ce travail de thèse, est la compétence vectorielle. Il s'agit d'un paramètre bien défini, qui décrit l'aptitude d'un arthropode à ingérer un pathogène, en assurer la multiplication et/ou le développement et le transmettre à un hôte vertébré. Dans notre contexte, les trois acteurs centraux de la compétence vectorielle sont donc le virus, le moustique et l'homme. La multiplication des études de compétence montre que la relation virus/vecteur est non seulement complexe mais également soumise à une évolution rapide et locale de ces acteurs.

Ainsi, le génome du virus est soumis à une évolution rapide et complexe, et les outils disponibles aujourd'hui permettent d'ailleurs de se rendre compte de l'important polymorphisme génétique viral qui existe. La complexité de ces interactions vient aussi de l'homme et du moustique qui disposent chacun de leurs modes de défense immunitaire, ayant leurs spécificités de régulation et de mécanistique. L'importance du statut immunitaire, lors d'une épidémie d'arbovirose, est surtout flagrante pour l'homme qui possède l'immunité acquise des vertébrés. En effet, une population naïve pour un virus donné ne réagira pas de la même façon qu'une population régulièrement exposée à ce virus. Et le moustique, de son côté, dispose, comme on l'a vu, de nombreuses barrières pour bloquer la transmission des virus. Les interactions entre ces trois acteurs ajoutent un niveau de complexification supplémentaire notamment au niveau des interactions G x G entre le virus et le vecteur, qui sont, elles même, influencées par les mécanismes immunitaires, microbiotiques, ou d'autres aspects de la physiologie du vecteur qui auront été affectés par l'infection.

Enfin, la compétence vectorielle est elle-même un des facteurs permettant d'évaluer la capacité vectorielle qui, elle, prend en compte les autres paramètres influant sur l'habilité d'un moustique à transmettre un virus à l'homme. Parmi ces paramètres, tels que la densité de vecteurs, la probabilité de survie du vecteur au-delà de la PIE, etc., on comprend que l'environnement représente une clé supplémentaire permettant de mieux comprendre les épidémies causées par les arbovirus. En effet, on s'aperçoit de plus en plus que tous les mécanismes et systèmes physiologiques du moustique et de l'homme (immunité, microbiome, physiologie de manière générale), et certains des déterminants essentiels de la

compétence vectorielle, sont eux même contrôlés par les facteurs environnementaux (température, humidité, faune, flore etc...).

Les mécanismes menant à une épidémie d'arbovirose sont complexes et multifactoriels. Pour cela, il paraît crucial de combiner, à toute étude épidémiologique, un volet de recherche fondamentale, et ce afin de considérer les acteurs et leurs interactions dans leur ensemble et à toutes les échelles auxquelles ils peuvent être étudiés, tout en prenant en compte l'environnement local et régional dans lequel l'étude est menée.

Bibliographie

- Aaskov, J. G., Mataika, J. U., Lawrence, G. W., Rabukawaqa, V., Tucker, M. M., Miles, J. A. and Dalglish, D. A. (1981). An epidemic of Ross River virus infection in Fiji, 1979. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**, 1053-1059.
- Agarwal, A., Sharma, A. K., Sukumaran, D., Parida, M. and Dash, P. K. (2016). Two novel epistatic mutations (E1:K211E and E2:V264A) in structural proteins of Chikungunya virus enhance fitness in *Aedes aegypti*. *Virology*, **497**, 59-68.
- Alibert, A., Pfannstiel, A. and Grangeon, J. (2011). Chikungunya outbreak in New Caledonia in 2011 Status report as at 22 August 2011. *Inform'Action*, **34**.
- Aliota, M. T., Peinado, S. A., Osorio, J. E. and Bartholomay, L. C. (2016a). *Culex pipiens* and *Aedes triseriatus* Mosquito Susceptibility to Zika Virus. *Emerg Infect Dis.* 2016 Oct;22(10):1857-9. doi: 10.3201/eid2210.161082. Epub 2016 Oct 15.
- Aliota, M. T., Peinado, S. A., Velez, I. D. and Osorio, J. E. (2016b). The wMel strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Scientific Reports*, **6**.
- Aliota, M. T., Walker, E. C., Uribe Yepes, A., Dario Velez, I., Christensen, B. M. and Osorio, J. E. (2016c). The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **10**, e0004677.
- Alphey, L. (2014). Genetic control of mosquitoes. *Annual Review of Entomology*, **59**, 205-224.
- Alphey, L. (2016). Can CRISPR-Cas9 gene drives curb malaria? *Nature Biotechnology*, **34**, 149-150.
- Amraoui, F., Atyame-Nten, C., Vega-Rua, A., Lourenco-de-Oliveira, R., Vazeille, M. and Failloux, A. B. (2016). *Culex* mosquitoes are experimentally unable to transmit Zika virus. *Euro Surveillance*, **21**, 1560-7917.
- Appassakij, H., Khuntikij, P., Kemapunmanus, M., Wutthanasungsan, R. and Silpapojakul, K. (2013). Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? *Transfusion*, **53**, 2567-2574.
- Apte-Deshpande, A., Paingankar, M., Gokhale, M. D. and Deobagkar, D. N. (2012). *Serratia odorifera* a Midgut Inhabitant of *Aedes aegypti* Mosquito Enhances Its Susceptibility to Dengue-2 Virus. *PLoS One*, **7**, e40401.
- Araujo, J. M., Nogueira, R. M., Schatzmayr, H. G., Zanotto, P. M. and Bello, G. (2009). Phylogeography and evolutionary history of dengue virus type 3. *Infection, Genetics and Evolution*, **9**, 716-725.

- Armstrong, P. M. and Rico-Hesse, R. (2001). Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, **1**, 159-168.
- Aubry, M., Finke, J., Teissier, A., Roche, C., Brout, J., Paulous, S., Despres, P., Cao-Lormeau, V. M. and Musso, D. (2015). Silent Circulation of Ross River Virus in French Polynesia. *International Journal of Infectious Diseases*, **37**, 19-24.
- Aubry, M., Roche, C., Dupont-Rouzeyrol, M., Aaskov, J., Viallon, J., Marfel, M., Lalita, P., Elbourne-Duituturaga, S., Chanteau, S., Musso, D., Pavlin, B. I., Harrison, D., Kool, J. L. and Cao-Lormeau, V. M. (2012). Use of serum and blood samples on filter paper to improve the surveillance of Dengue in Pacific Island Countries. *Journal of clinical virology*, **55**, 23-29.
- Aubry, M., Teissier, A., Huart, M., Merceron, S., Vanhomwegen, J., Roche, C., Vial, A.-L., Teururai, S., Sicard, S., Paulous, S., Desprès, P., Manuguerra, J.-C., Mallet, H.-P., Musso, D., Deparis, X. and Cao-Lormeau, V.-M. (2017a). Ross River Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. *Emerging Infectious Disease journal*, **23**, 1751.
- Aubry, M., Teissier, A., Huart, M., Merceron, S., Vanhomwegen, J., Roche, C., Vial, A.-L., Teururai, S., Sicard, S., Paulous, S., Desprès, P., Manuguerra, J.-C., Mallet, H.-P., Musso, D., Deparis, X. and Cao-Lormeau Van-Mai. (2017b). Zika Virus Seroprevalence, French Polynesia, 2014–2015. *Emerging Infectious Disease journal*, **23**, 669.
- Aubry, M., Teissier, Y., Mapotoeke, M., Teissier, A., Giard, M., Musso, D. and Cao-Lormeau, V. M. (2017c). High risk of dengue type 2 outbreak in French Polynesia, 2017. *Euro Surveillance*, **22**, 1560-7917.
- Barletta, A. B. F., Nascimento-Silva, M. C. L., Talyuli, O. A. C., Oliveira, J. H. M., Pereira, L. O. R., Oliveira, P. L. and Sorgine, M. H. F. (2017). Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. *Parasites & Vectors*, **10**, 103.
- Barzon, L., Pacenti, M., Berto, A., Sinigaglia, A., Franchin, E., Lavezzo, E., Brugnaro, P. and Palu, G. (2016). Isolation of infectious Zika virus from saliva and prolonged viral RNA shedding in a traveller returning from the Dominican Republic to Italy, January 2016. *Euro Surveillance*, **21**, 1560-7917.
- Belkin, J. N. (1962). The mosquitoes of the South Pacific: Diptera, Culicidae. *Berkeley, University of California Press.* , **Vol. 1**.

- Bennett, K. E., Beaty, B. J. and Black, W. C. t. (2005a). Selection of D2S3, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to Dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to Dengue 2 escape. *Journal of Medical Entomology*, **42**, 110-119.
- Bennett, K. E., Flick, D., Fleming, K. H., Jochim, R., Beaty, B. J. and Black, W. C. t. (2005b). Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, **170**, 185-194.
- Bennett, K. E., Olson, K. E., Muñoz, M. L., Fernandez-Salas, I., Farfan-Ale, J. A., Higgs, S., Black, W. C. and Beaty, B. J. (2002). Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **67**.
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, G. R., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J. and Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, **496**, 504-507.
- Black, W. C., Bennett, K. E., Gorrochótegui-Escalante, N., Barillas-Mury, C. V., Fernández-Salas, I., de Lourdes Muñoz, M. a., Farfán-Alé, J. A., Olson, K. E. and Beaty, B. J. (2002). Flavivirus Susceptibility in *Aedes aegypti*. *Archives of Medical Research*, **33**, 379-388.
- Blair, C. D. (2011). Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future microbiology*, **6**, 265-277.
- Blair, C. D. and Olson, K. E. (2015). The Role of RNA Interference (RNAi) in Arbovirus-Vector Interactions. *Viruses*, **7**, 820-843.
- Boigard, H., Alimova, A., Martin, G. R., Katz, A., Gottlieb, P. and Galarza, J. M. (2017). Zika virus-like particle (VLP) based vaccine. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **11**, e0005608.
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., Moureau, G., Neyts, J., Owens, R. J., Ren, J., Selisko, B., Speroni, S., Steuber, H., Stuart, D. I., Unge, T. and Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Research*, **87**, 125-148.

- Bolling, G. B., Weaver, C. S., Tesh, B. R. and Vasilakis, N. (2015). Insect-Specific Virus Discovery: Significance for the Arbovirus Community. *Viruses*, **7**.
- Bosio, C. F., Fulton, R. E., Salasek, M. L., Beaty, B. J. and Black, W. C. t. (2000). Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, **156**, 687-698.
- Bosio, C. F., Harrington, L. C., Jones, J. W., Sithiprasasna, R., Norris, D. E. and Scott, T. W. (2005). Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Thailand using mitochondrial DNA. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **72**, 434-442.
- Boyer, S., Toty, C., Jacquet, M., Lempérière, G. and Fontenille, D. (2012). Evidence of Multiple Inseminations in the Field in *Aedes albopictus*. *PLoS One*, **7**, e42040.
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Moyes, C. L., Farlow, A. W., Scott, T. W. and Hay, S. I. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, e1760.
- Brault, A. C., Foy, B. D., Myles, K. M., Kelly, C. L. H., Higgs, S., Weaver, S. C., Olson, K. E., Miller, B. R. and Powers, A. M. (2004). Infection patterns of o'nyong nyong virus in the malaria-transmitting mosquito, *Anopheles gambiae*. *Insect Molecular Biology*, **13**, 625-635.
- Brown, J. E., Evans, B. R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., Zhao, H., Caccone, A. and Powell, J. R. (2014). Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow Fever mosquito. *Evolution*, **68**, 514-525.
- Brown, J. E., McBride, C. S., Johnson, P., Ritchie, S., Paupy, C., Bossin, H., Lutomiah, J., Fernandez-Salas, I., Ponlawat, A., Cornel, A. J., Black, W. C., Gorrochotegui-Escalante, N., Urdaneta-Marquez, L., Sylla, M., Slotman, M., Murray, K. O., Walker, C. and Powell, J. R. (2011). Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **278**, 2446-2454.
- Calvez, E., Guillaumot, L., Girault, D., Richard, V., O'Connor, O., Paoaafaite, T., Teurlai, M., Pocquet, N., Cao-Lormeau, V.-M. and Dupont-Rouzeyrol, M. (2017). Dengue-1 virus

- and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia. *Parasites & Vectors*, **10**, 381.
- Calvez, E., Guillaumot, L., Millet, L., Marie, J., Bossin, H., Rama, V., Faamoe, A., Kilama, S., Teurlai, M., Mathieu-Daude, F. and Dupont-Rouzeyrol, M. (2016). Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **10**.
- Cao-Lormeau, V.-M. and Musso, D. (2014). Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet*, **384**, 1571-1572.
- Cao-Lormeau, V.-M., Roche, C., Aubry, M., Teissier, A., Lastere, S., Daudens, E., Mallet, H.-P., Musso, D. and Aaskov, J. (2011). Recent Emergence of Dengue Virus Serotype 4 in French Polynesia Results from Multiple Introductions from Other South Pacific Islands. *PLoS One*, **6**, e29555.
- Cao-Lormeau, V. M. (2009). Dengue viruses binding proteins from *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* salivary glands. *Virology*, **6**, 6-35.
- Cao-Lormeau, V. M. (2016). *Tropical Islands as New Hubs for Emerging Arboviruses*. *Emerg Infect Dis*. 2016 May;22(5):913-5. doi: 10.3201/eid2205.150547.
- Cao-Lormeau, V. M., Blake, A., Mons, S., Lastere, S., Roche, C., Vanhomwegen, J., Dub, T., Baudouin, L., Teissier, A., Larre, P., Vial, A. L., Decam, C., Choumet, V., Halstead, S. K., Willison, H. J., Musset, L., Manuguerra, J. C., Despres, P., Fournier, E., Mallet, H. P., Musso, D., Fontanet, A., Neil, J. and Ghawche, F. (2016). Guillain-Barre Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet*, **387**, 1531-1539.
- Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Musso, D., Mallet, H. P., Dalipanda, T., Dofai, A., Nogareda, F., Nilles, E. J. and Aaskov, J. (2014a). Dengue virus type 3, South Pacific Islands, 2013. *Emerging Infectious Disease journal*, **20**, 1034-1036.
- Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A. L., Mallet, H. P., Sall, A. A. and Musso, D. (2014b). *Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013*. *Emerg Infect Dis*. 2014 Jun;20(6):1085-6. doi: 10.3201/eid2006.140138.
- Carrington, L. B., Seifert, S. N., Armijos, M. V., Lambrechts, L. and Scott, T. W. (2013). Reduction of *Aedes aegypti* vector competence for dengue virus under large temperature fluctuations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **88**, 689-697.

- Cauchemez, S., Besnard, M., Bompard, P., Dub, T., Guillemette-Artur, P., Eyrolle-Guignot, D., Salje, H., Van Kerkhove, M. D., Abadie, V., Garel, C., Fontanet, A. and Mallet, H.-P. (2016). Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: a retrospective study. *The Lancet*, **387**, 2125-2132.
- Chepkorir, E., Lutomiah, J., Mutisya, J., Mulwa, F., Limbaso, K., Orindi, B., Ng'ang'a, Z. and Sang, R. (2014). Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Kilifi and Nairobi for dengue 2 virus and the influence of temperature. *Parasites & Vectors*, **7**, 435.
- Chevillon, C., Briant, L., Renaud, F. and Devaux, C. (2008). The Chikungunya threat: an ecological and evolutionary perspective. *Trends Microbiol*, **16**, 80-88.
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., Dupont-Rouzeyrol, M., Lourenço-de-Oliveira, R. and Failloux, A.-B. (2016). Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **10**, e0004543.
- Chu, J. J., Leong, P. W. and Ng, M. L. (2005). Characterization of plasma membrane-associated proteins from *Aedes albopictus* mosquito (C6/36) cells that mediate West Nile virus binding and infection. *Virology*, **339**, 249-260.
- Chungue E, D. X., Murgue B. (1998). Dengue in French Polynesia: Major features, surveillance, molecular epidemiology and current situation. *Pacific Health Dialog*, **5**, 154-162.
- Ciota, A. T., Bialosuknia, S. M., Zink, S. D., Brecher, M., Ehrbar, D. J., Morrisette, M. N. and Kramer, L. D. (2017). Effects of Zika Virus Strain and *Aedes* Mosquito Species on Vector Competence. *Emerging Infectious Disease journal*, **23**, 161633.
- Ciota, A. T., Ehrbar, D. J., Van Slyke, G. A., Payne, A. F., Willsey, G. G., Viscio, R. E. and 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.
- Cooper, R. D., Waterson, D. G. E., Frances, S. P., Beebe, N. W., Pluess, B. and Sweeney, A. W. (2009). Malaria vectors of Papua New Guinea. *International Journal for Parasitology*, **39**, 1495-1501.
- Couto-Lima, D., Madec, Y., Bersot, M. I., Campos, S. S., Motta, M. A., Santos, F. B. D., Vazeille, M., Vasconcelos, P., Lourenco-de-Oliveira, R. and Failloux, A. B. (2017). Potential risk

- of re-emergence of urban transmission of Yellow Fever virus in Brazil facilitated by competent *Aedes* populations. *Scientific Reports*, **7**, 017-05186.
- da Costa-da-Silva, A. L., Capurro, M. L. and Bracco, J. E. (2005). Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, **100**, 539-544.
- Dennison, N. J., Jupatanakul, N. and Dimopoulos, G. (2014). The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Current Opinion in Insect Science*, **3**, 6-13.
- Descloux, E., Cao-Lormeau, V. M., Roche, C. and De Lamballerie, X. (2009). Dengue 1 diversity and microevolution, French Polynesia 2001-2006: connection with epidemiology and clinics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **3**, 0000493.
- Descloux, E., Mangeas, M., Menkes, C. E., Lengaigne, M., Leroy, A., Tehei, T., Guillaumot, L., Teurlai, M., Gourinat, A.-C., Benzler, J., Pfannstiel, A., Grangeon, J.-P., Degallier, N. and De Lamballerie, X. (2012). Climate-Based Models for Understanding and Forecasting Dengue Epidemics. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, e1470.
- Diagne, C. T., Diallo, D., Faye, O., Ba, Y., Gaye, A., Dia, I., Weaver, S. C., Sall, A. A. and Diallo, M. (2015). Potential of selected Senegalese *Aedes spp.* mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infectious Diseases*, **15**, 015-1231.
- Diallo, D., Sall, A. A., Diagne, C. T., Faye, O., Ba, Y., Hanley, K. A., Buenemann, M., Weaver, S. C. and Diallo, M. (2014). Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. *PLoS One*, **9**.
- Diallo, M., Ba, Y., Faye, O., Soumare, M. and Dia and Sall, A. (2008). Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in west Africa. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **102**, 493 - 498.
- Dick, G. W. (1952). Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **46**, 521-534.
- Dick, G. W., Kitchen, S. F. and Haddow, A. J. (1952). Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, **46**, 509-520.

- Dohm, D. J., O'Guinn, M. L. and Turell, M. J. (2002). Effect of environmental temperature on the ability of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae) to transmit West Nile virus. *Journal of Medical Entomology*, **39**, 221-225.
- Domingo, E. (1992). Genetic variation and quasi-species. *Current Opinion in Genetics & Development*, **2**, 61-63.
- Domingo, E. and Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, **51**, 151-178.
- Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Perez, A., Garcia-Arriaza, J. and Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, **299**, 51-82.
- Donald, C. L., Kohl, A. and Schnettler, E. (2012). New Insights into Control of Arbovirus Replication and Spread by Insect RNA Interference Pathways. *Insects*, **3**, 511-531.
- Dubrulle, M., Mousson, L., Moutailler, S., Vazeille, M. and Failloux, A.-B. (2009). Chikungunya Virus and *Aedes* Mosquitoes: Saliva Is Infectious as soon as Two Days after Oral Infection. *PLoS One*, **4**, e5895.
- Duffy, M. R., Chen, T.-H., Hancock, W. T., Powers, A. M., Kool, J. L., Lanciotti, R. S., Pretrick, M., Marfel, M., Holzbauer, S., Dubray, C., Guillaumot, L., Griggs, A., Bel, M., Lambert, A. J., Laven, J., Kosoy, O., Panella, A., Biggerstaff, B. J., Fischer, M. and Hayes, E. B. (2009). Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine*, **360**, 2536-2543.
- Dupont-Rouzeyrol, M., Aubry, M., O'Connor, O., Roche, C., Gourinat, A. C., Guigon, A., Pyke, A., Grangeon, J. P., Nilles, E., Chanteau, S., Aaskov, J. and Cao-Lormeau, V. M. (2014). Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001-2013. *Virology*, **11**, 61.
- Dupont-Rouzeyrol, M., Caro, V., Guillaumot, L., Vazeille, M., D'Ortenzio, E., Thiberge, J. M., Baroux, N., Gourinat, A. C., Grandadam, M. and Failloux, A. B. (2012). Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne Zoonotic Dis*, **12**, 1036-1041.
- Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Calvez, E., Daires, M., John, M., Grangeon, J. P. and Gourinat, A. C. (2015). *Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014*. *Emerg Infect Dis*. 2015 Feb;21(2):381-2. doi: 10.3201/eid2102.141553.

- Dutra, H. L., Rocha, M. N., Dias, F. B., Mansur, S. B., Caragata, E. P. and Moreira, L. A. (2016). Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe*, **19**, 771-774.
- Duvallet, G., Fontenille, D., Robert, V. and eds. (2017). *Entomologie médicale et vétérinaire*. IRD Editions-Quae, Marseille-Versailles, pp. 687.
- Eleftherianos, I., Atri, J., Accetta, J. and Castillo, J. C. (2013). Endosymbiotic bacteria in insects: guardians of the immune system? *Frontiers in Physiology*, **4**.
- Enfissi, A., Codrington, J., Roosblad, J., Kazanji, M. and Rousset, D. (2016). Zika virus genome from the Americas. *The Lancet*, **387**, 227-228.
- Erb, S. M., Butrapet, S., Moss, K. J., Luy, B. E., Childers, T., Calvert, A. E., Silengo, S. J., Roehrig, J. T., Huang, C. Y. and Blair, C. D. (2010). Domain-III FG loop of the dengue virus type 2 envelope protein is important for infection of mammalian cells and *Aedes aegypti* mosquitoes. *Virology*, **406**, 328-335.
- Erlanger, T. E., Weiss, S., Keiser, J., Utzinger, J. and Wiedemayer, K. (2009). Past, Present, and Future of Japanese Encephalitis. *Emerging Infectious Diseases*, **15**, 1-7.
- Esvelt, K. M., Smidler, A. L., Catteruccia, F. and Church, G. M. (2014). Concerning RNA-guided gene drives for the alteration of wild populations. *Elife*, **17**, 03401.
- Etienne, C., Santos, T. D. and Espinal, M. A. (2017). Keynote Address (November 2016): Zika Virus Disease in the Americas: A Storm in the Making. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **97**, 16-18.
- Failloux, A. B., Darius, H. and Pasteur, N. (1995). Genetic differentiation of *Aedes aegypti*, the vector of dengue virus in French Polynesia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **11**, 457-462.
- Failloux, A. B., Vazeille, M. and Rodhain, F. (2002). Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. *Journal of Molecular Evolution*, **55**, 653-663.
- Fansiri, T., Fontaine, A., Diancourt, L., Caro, V., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., Jarman, R. G., Ponlawat, A. and Lambrechts, L. (2013). Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. *PLoS Genet*, **9**, 1.

- Faragher, S. G., Marshall, I. D. and Dalgarno, L. (1985). Ross River virus genetic variants in Australia and the Pacific Islands. *The Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, **63**, 473-488.
- Faye, O., Freire, C. C., Iamarino, A., de Oliveira, J. V., Diallo, M., Zanotto, P. M. and Sall, A. A. (2014). Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**.
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Misse, D., Pages, F., Fusai, T., Rogier, C. and Almeras, L. (2011). Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasites & Vectors*, **4**, 1756-3305.
- Forrester, N. L., Palacios, G., Tesh, R. B., Savji, N., Guzman, H., Sherman, M., Weaver, S. C. and Lipkin, W. I. (2012). Genome-Scale Phylogeny of the *Alphavirus* Genus Suggests a Marine Origin. *J Virol*, **86**, 2729-2738.
- Fragkoudis, R., Attarzadeh-Yazdi, G., Nash, A. A., Fazakerley, J. K. and Kohl, A. (2009). Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *Journal of General Virology*, **90**, 2061-2072.
- Franz, A. W. E., Kantor, A. M., Passarelli, A. L. and Clem, R. J. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, **7**, 3741-3767.
- Friebe, P. and Harris, E. (2010). Interplay of RNA elements in the dengue virus 5' and 3' ends required for viral RNA replication. *J Virol*, **84**, 6103-6118.
- Gallian, P., Cabie, A., Richard, P., Paturol, L., Charrel, R. N., Pastorino, B., Leparac-Goffart, I., Tiberghien, P. and de Lamballerie, X. *Zika virus in asymptomatic blood donors in Martinique*. Blood. 2017 Jan 12;129(2):263-266. doi: 10.1182/blood-2016-09-737981. Epub 2016 Nov 8.
- Gallian, P., Leparac-Goffart, I., Richard, P., Maire, F., Flusin, O., Djoudi, R., Chiaroni, J., Charrel, R., Tiberghien, P. and de Lamballerie, X. (2017). Epidemiology of Chikungunya Virus Outbreaks in Guadeloupe and Martinique, 2014: An Observational Study in Volunteer Blood Donors. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **11**, e0005254.
- Garrett-Jones, C. and 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.
- Gay, N., Rousset, D., Huc, P., Matheus, S., Ledrans, M., Rosine, J., Cassadou, S. and Noel, H. (2016). Seroprevalence of Asian Lineage Chikungunya Virus Infection on Saint Martin

- Island, 7 Months After the 2013 Emergence. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **94**, 393-396.
- Gloria-Soria, A., Armstrong, P. M., Powell, J. R. and Turner, P. E. (2017). Infection rate of *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue virus depends on the interaction between temperature and mosquito genotype. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **284**.
- Go, Y. Y., Balasuriya, U. B. R. and Lee, C.-k. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clinical and Experimental Vaccine Research*, **3**, 58-77.
- Gong, Z., Gao, Y. and Han, G.-Z. (2016). Zika Virus: Two or Three Lineages? *Trends Microbiol*, **24**, 521-522.
- Goo, L., Dowd, K. A., Smith, A. R. Y., Pelc, R. S., DeMaso, C. R. and Pierson, T. C. (2016). Zika Virus Is Not Uniquely Stable at Physiological Temperatures Compared to Other Flaviviruses. *MBio*, **7**, e01396-01316.
- Gourinat, A. C., O'Connor, O., Calvez, E., Goarant, C. and Dupont-Rouzeyrol, M. (2015). Detection of Zika virus in urine. *Emerging Infectious Disease journal*, **21**, 84-86.
- Grange, L., Simon-Lorriere, E., Sakuntabhai, A., Gresh, L., Paul, R. and Harris, E. (2014). Epidemiological Risk Factors Associated with High Global Frequency of Inapparent Dengue Virus Infections. *Frontiers in Immunology*, **5**, 280.
- Grobbelaar, A. A., Weyer, J., Moolla, N., Jansen vanVuren, P., Moises, F. and Paweska, J., T. . (2016). Resurgence of Yellow Fever in Angola, 2015–2016. *Emerging Infectious Disease journal*, **22**, 1854.
- Gubio, S. C., Antonio, C. B. and Silvia, I. S. (2015). Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Disease journal*, **21**, 1885.
- Gubler, D. (1997). Epidemic dengue/dengue haemorrhagic fever: a global public health problem in the 21st century. *Dengue Bulletin*, **21**, 1 - 15.
- Gubler, D. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clinical Microbiology Reviews*, **11**, 480 - 496.
- Gubler, D. and Clark, G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging Infectious Disease journal*, **1**, 55 - 57.

- Gubler, D., Nalim, S., Tan, R., Saipan, H. and Sulianti Saroso, J. (1979). Variation in susceptibility to oral infection with dengue viruses among geographic strains of *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **28**, 1045 - 1052.
- Gubler, D. J. (2002). The Global Emergence/Resurgence of Arboviral Diseases As Public Health Problems. *Archives of Medical Research*, **33**, 330-342.
- Guillaumot, L. (2005). Arboviruses and their vectors in the Pacific--status report. *Pacific Health Dialog*, **12**, 45-52.
- Guillaumot, L., Ofanoa, R., Swillen, L., Singh, N., Bossin, H. C. and Schaffner, F. (2012). Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in southwestern Pacific countries, with a first report from the Kingdom of Tonga. *Parasites & Vectors*, **5**, 1756-3305.
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H. S., Martinez, E., Nathan, M. B., Pelegriño, J. L., Simmons, C., Yoksan, S. and Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nature Reviews Microbiology*, **8**.
- Haddow, A. D., Schuh, A. J., Yasuda, C. Y., Kasper, M. R., Heang, V., Huy, R., Guzman, H., Tesh, R. B. and Weaver, S. C. (2012). Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, 28.
- Hadinegoro, S. R., Arredondo-García, J. L., Capeding, M. R., Deseda, C., Chotpitayasunondh, T., Dietze, R., Hj Muhammad Ismail, H. I., Reynales, H., Limkittikul, K., Rivera-Medina, D. M., Tran, H. N., Bouckenooghe, A., Chansinghakul, D., Cortés, M., Fanouillere, K., Forrat, R., Frago, C., Gailhardou, S., Jackson, N., Noriega, F., Plennevaux, E., Wartel, T. A., Zambrano, B. and Saville, M. (2015). Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *New England Journal of Medicine*, **373**, 1195-1206.
- Halstead, S. B. (1979). In vivo enhancement of dengue virus infection in rhesus monkeys by passively transferred antibody. *The Journal of Infectious Diseases*, **140**, 527-533.
- Halstead, S. B. (1980). Dengue haemorrhagic fever — a public health problem and a field for research. *Bulletin of the World Health Organization*, **58**, 1-21.
- Halstead, S. B. (1988). Pathogenesis of dengue: challenges to molecular biology. *Science*, **239**, 476-481.

- Halstead, S. B. and O'Rourke, E. J. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *The Journal of Experimental Medicine*, **146**, 201-217.
- Hammon, W. M., Rudnick, A. and Sather, G. E. (1960). Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science*, **131**, 1102-1103.
- Hardy, J. L., Houk, E. J., Kramer, L. D. and Reeves, W. C. (1983). Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annual Review of Entomology*, **28**, 229-262.
- Harley, D., Sleight, A. and Ritchie, S. (2001). Ross River virus transmission, infection, and disease: a cross-disciplinary review. *Clinical Microbiology Reviews*, **14**, 909-932.
- Harrington, L. C., Fleisher, A., Ruiz-Moreno, D., Vermeulen, F., Wa, C. V., Poulson, R. L., Edman, J. D., Clark, J. M., Jones, J. W., Kitthawee, S. and Scott, T. W. (2014). Heterogeneous Feeding Patterns of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*, on Individual Human Hosts in Rural Thailand. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**, e3048.
- Helinski, M. E., Valerio, L., Facchinelli, L., Scott, T. W., Ramsey, J. and Harrington, L. C. (2012). Evidence of polyandry for *Aedes aegypti* in semifield enclosures. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **86**, 635-641.
- Henchal, E. A. and Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*, **3**, 376-396.
- Hennessey, M., Fischer, M. and Staples, J. E. (2016). Zika Virus Spreads to New Areas - Region of the Americas, May 2015-January 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **65**, 55-58.
- Hii, J. L., Smith, T., Mai, A., Ibam, E. and Alpers, M. P. (2000). Comparison between *anopheline* mosquitoes (Diptera: Culicidae) caught using different methods in a malaria endemic area of Papua New Guinea. *Bulletin of Entomological Research*, **90**, 211-219.
- Hillyer, J. F. (2010). Mosquito immunity. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **708**, 218-238.
- Ho, B. C., Ewert, A. and Chew, L.-M. (1989). Interspecific Competition Among *Aedes aegypti*, *Ae. albopictus*, and *Ae. triseriatus* (Diptera: Culicidae): Larval Development in Mixed Cultures. *Journal of Medical Entomology*, **26**, 615-623.

- Huber, K., Ba, Y., Dia, I., Mathiot, C., Sall, A. A. and Diallo, M. (2008). *Aedes aegypti* in Senegal: genetic diversity and genetic structure of domestic and sylvatic populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **79**, 218-229.
- Huerre, M., Camprasse, M. A. and Laille, M. (1995). Problèmes posés par les épidémies de dengue. L'exemple des foyers d'Océanie. Situation mondiale actuelle et dans les DOM-TOM. *Médecine et Maladies Infectieuses*, **25, Supplement 7**, 688-695.
- Hurrelbrink, R. J. and McMinn, P. C. (2003). Molecular Determinants of Virulence: The Structural and Functional Basis for *Flavivirus* Attenuation. *Advances in Virus Research*, **60**, 1-42.
- Igor, A. D. P., Ana Paula, P. B. P., Cristiane, W. C., Mariana, K., Monaise, M. O. S., Lance, A. W., Mitermayer, G. R., Uriel, K. and Guilherme, S. R. (2016). Time Lags between Exanthematous Illness Attributed to Zika Virus, Guillain-Barré Syndrome, and Microcephaly, Salvador, Brazil. *Emerging Infectious Disease journal*, **22**, 1438.
- Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. (2003). IPNC - Rapport technique Année 2003, www.institutpasteur.nc/rapports-dactivites/.
- Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. (2016). IPNC - Rapport d'activité 2016, www.institutpasteur.nc/rapports-dactivites/.
- James, A. A. (1994). Molecular and biochemical analyses of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, **vol. 92**, 133-150.
- Jones, A., Lowry, K., Aaskov, J., Holmes, E. C. and Kitchen, A. (2010). Molecular evolutionary dynamics of Ross River virus and implications for vaccine efficacy. *Journal of General Virology*, **91**, 182-188.
- Joubert, D. A. and O'Neill, S. L. (2017). Comparison of Stable and Transient Wolbachia Infection Models in *Aedes aegypti* to Block Dengue and West Nile Viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **11**, e0005275.
- Jupatanakul, N., Sim, S., Angleró-Rodríguez, Y. I., Souza-Neto, J., Das, S., Poti, K. E., Rossi, S. L., Bergren, N., Vasilakis, N. and Dimopoulos, G. (2017). Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **11**, e0005187.
- Jupatanakul, N., Sim, S. and Dimopoulos, G. (2014). The Insect Microbiome Modulates Vector Competence for Arboviruses. *Viruses*, **6**, 4294-4313.

- Karabatsos, N. (1985). International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates, American Society of Tropical Medicine and Hygiene for The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses, San Antonio, Texas.
- Katzelnick, L. C., Fonville, J. M., Gromowski, G. D., Arriaga, J. B., Green, A., James, S. L., Lau, L., Montoya, M., Wang, C., VanBlargan, L. A., Russell, C. A., Thu, H. M., Pierson, T. C., Buchy, P., Aaskov, J. G., Muñoz-Jordán, J. L., Vasilakis, N., Gibbons, R. V., Tesh, R. B., Osterhaus, A. D. M. E., Fouchier, R. A. M., Durbin, A., Simmons, C. P., Holmes, E. C., Harris, E., Whitehead, S. S. and Smith, D. J. (2015). Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*, **349**, 1338-1343.
- Kelly, E. M., Moon, D. C. and Bowers, D. F. (2012). Apoptosis in mosquito salivary glands: Sindbis virus-associated and tissue homeostasis. *The Journal of General Virology*, **93**, 2419-2424.
- Kenney, J. L. and Brault, A. C. (2014). The role of environmental, virological and vector interactions in dictating biological transmission of arthropod-borne viruses by mosquitoes. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **89**, 39-83.
- Kenney, J. L., Romo, H., Duggal, N. K., Tzeng, W.-P., Burkhalter, K. L., Brault, A. C. and Savage, H. M. (2017). Transmission Incompetence of *Culex quinquefasciatus* and *Culex pipiens pipiens* from North America for Zika Virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, -.
- Khadka, S., Vangeloff, A. D., Zhang, C., Siddavatam, P., Heaton, N. S., Wang, L., Sengupta, R., Sahasrabudhe, S., Randall, G., Gribskov, M., Kuhn, R. J., Perera, R. and LaCount, D. J. (2011). A physical interaction network of dengue virus and human proteins. *Molecular & Cellular Proteomics*, **10**, 12.
- Kindhauser, M. K., Allen, T., Frank, V., Santhana, R. S. and Dye, C. (2016). Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bulletin of the World Health Organization*, **94**, 9.
- Klapsing, P., MacLean, J. D., Glaze, S., McClean, K. L., Drebot, M. A., Lanciotti, R. S. and Campbell, G. L. (2005). Ross River Virus Disease Reemergence, Fiji, 2003–2004. *Emerging Infectious Diseases*, **11**, 613-615.
- Knope, K. E., Kurucz, N., Doggett, S. L., Muller, M., Johansen, C. A., Feldman, R., Hobby, M., Bennett, S., Sly, A., Lynch, S., Currie, B. J. and Nicholson, J. (2016). Arboviral diseases and malaria in Australia, 2012-13: Annual report of the National Arbovirus and

- Malaria Advisory Committee. *Communicable Diseases Intelligence Quarterly Report*, **40**, E17-47.
- Knox, T., Kay, B., Hall, R. and Ryan, P. (2003). Enhanced vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Torres Strait compared with Mainland Australia for dengue 2 and 4 viruses. *Journal of Medical Entomology*, **40**, 950 - 956.
- Kostyuchenko, V. A., Lim, E. X. Y., Zhang, S., Fibriansah, G., Ng, T.-S., Ooi, J. S. G., Shi, J. and Lok, S.-M. (2016). Structure of the thermally stable Zika virus. *Nature*, **533**, 425.
- Kraemer, M. U. G., Sinka, M. E., Duda, K. A., Mylne, A. Q. N., Shearer, F. M., Barker, C. M., Moore, C. G., Carvalho, R. G., Coelho, G. E., Van Bortel, W., Hendrickx, G., Schaffner, F., Elyazar, I. R. F., Teng, H.-J., Brady, O. J., Messina, J. P., Pigott, D. M., Scott, T. W., Smith, D. L., Wint, G. R. W., Golding, N. and Hay, S. I. (2015). The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. *Elife*, **4**, e08347.
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S. and Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for *flavivirus* organization, maturation, and fusion. *Cell*, **108**, 717-725.
- Kuno, G. (2007). Research on dengue and dengue-like illness in East Asia and the Western Pacific during the First Half of the 20th century. *Reviews in Medical Virology*, **17**, 327-341.
- Kuno, G., Chang, G. J., Tsuchiya, K. R., Karabatsos, N. and Cropp, C. B. (1998). Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol*, **72**, 73-83.
- Kurosu, T. (2011). Quasispecies of dengue virus. *Tropical Medicine and Health*, **39**, 29-36.
- 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., Chevillon, C., Albright, R. G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., Jarman, R. G. and Scott, T. W. (2009). Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evolutionary Biology*, **9**, 1471-2148.
- Lambrechts, L., Paaijmans, K., Fansiri, T., Carrington, L., Kramer, L., Thomas, M. and Scott, T. (2011). Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **108**, 7460 - 7465.

- Lanciotti, R. S., Lambert, A. J., Holodniy, M., Saavedra, S. and Signor Ldel, C. (2016). *Phylogeny of Zika Virus in Western Hemisphere, 2015*. *Emerg Infect Dis.* 2016 May;22(5):933-5. doi: 10.3201/eid2205.160065.
- Lanciotti, R. S., Ludwig, M. L., Rwaguma, E. B., Lutwama, J. J., Kram, T. M., Karabatsos, N., Cropp, B. C. and Miller, B. R. (1998). Emergence of Epidemic O'nyong-nyong Fever in Uganda after a 35-Year Absence: Genetic Characterization of the Virus. *Virology*, **252**, 258-268.
- Lardeux, F., Riviere, F., Sechan, Y. and Loncke, S. (2002). Control of the *Aedes* vectors of the dengue viruses and *Wuchereria bancrofti*: the French Polynesian experience. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, **96**, S105-116.
- Lau, C., Aubry, M., Musso, D., Teissier, A., Paulous, S., Despres, P., de-Lamballerie, X., Pastorino, B., Cao-Lormeau, V. M. and Weinstein, P. (2017). New evidence for endemic circulation of Ross River virus in the Pacific Islands and the potential for emergence. *International Journal of Infectious Diseases*, **57**, 73-76.
- Ledermann, J. P., Guillaumot, L., Yug, L., Saweyog, S. C., Tided, M., Machieng, P., Pretrick, M., Marfel, M., Griggs, A., Bel, M., Duffy, M. R., Hancock, W. T., Ho-Chen, T. and Powers, A. M. (2014). *Aedes hensilli* as a potential vector of Chikungunya and Zika viruses. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **8**.
- Lednicky, J., Beau De Rochars, V. M., El Badry, M., Loeb, J., Telisma, T., Chavannes, S., Anilis, G., Cella, E., Ciccozzi, M., Rashid, M., Okech, B., Salemi, M. and Morris, J. G., Jr. (2016). Zika Virus Outbreak in Haiti in 2014: Molecular and Clinical Data. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **10**, e0004687.
- Lefevre, T., Vantaux, A., Dabire, K. R., Mouline, K. and Cohuet, A. (2013). Non-genetic determinants of mosquito competence for malaria parasites. *PLOS Pathogens*, **9**, 20.
- Lemant, J., Boisson, V., Winer, A., Thibault, L., Andre, H., Tixier, F., Lemercier, M., Antok, E., Cresta, M. P., Grivard, P., Besnard, M., Rollot, O., Favier, F., Huerre, M., Campinos, J. L. and Michault, A. (2008). Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006. *Critical Care Medicine*, **36**, 2536-2541.
- Lequime, S., Paul, R. E. and Lambrechts, L. (2016). Determinants of Arbovirus Vertical Transmission in Mosquitoes. *PLOS Pathogens*, **12**, e1005548.

- Li, D. S., Liu, W., Guigon, A., Mostyn, C., Grant, R. and Aaskov, J. (2010). Rapid displacement of dengue virus type 1 by type 4, Pacific region, 2007-2009. *Emerging Infectious Disease journal*, **16**, 123-125.
- Lindenbach, B. D. and Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **59**, 23-61.
- Lounibos, L. P. (2002). Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*, **47**, 233-266.
- Lovin, D. D., Washington, K. O., deBruyn, B., Hemme, R. R., Mori, A., Epstein, S. R., Harker, B. W., Streit, T. G. and Severson, D. W. (2009). Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. *BMC Genomics*, **10**, 1471-2164.
- Marchette, N. J., Garcia, R. and Rudnick, A. (1969). Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **18**, 411-415.
- Marcombe, S., Paris, M., Paupy, C., Bringuier, C., Yebakima, A., Chandre, F., David, J. P., Corbel, V. and Despres, L. (2013). Insecticide-driven patterns of genetic variation in the dengue vector *Aedes aegypti* in Martinique Island. *PLoS One*, **8**.
- Martina, B. E., Koraka, P. and Osterhaus, A. D. (2009). Dengue virus pathogenesis: an integrated view. *Clinical Microbiology Reviews*, **22**, 564-581.
- Mas, A., Lopez-Galindez, C., Cacho, I., Gomez, J. and Martinez, M. A. (2010). Unfinished stories on viral quasispecies and Darwinian views of evolution. *Journal of Molecular Biology*, **397**, 865-877.
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W., Sidhu, M., Wang, Y. F. and O'Neill, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, **323**, 141-144.
- Medlock, J. M., Hansford, K. M., Versteirt, V., Cull, B., Kampen, H., Fontenille, D., Hendrickx, G., Zeller, H., Van Bortel, W. and Schaffner, F. (2015). An entomological review of invasive mosquitoes in Europe. *Bulletin of Entomological Research*, **105**, 637-663.
- Mellor, P. S. (2000). Replication of arboviruses in insect vectors. *Journal of Comparative Pathology*, **123**, 231-247.

- Mercado-Curiel, R. F., Black, W. C. t. and Munoz Mde, L. (2008). A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiol*, **8**, 1471-2180.
- Mercado-Curiel, R. F., Esquinca-Aviles, H. A., Tovar, R., Diaz-Badillo, A., Camacho-Nuez, M. and Munoz Mde, L. (2006). The four serotypes of dengue recognize the same putative receptors in *Aedes aegypti* midgut and *Ae. albopictus* cells. *BMC Microbiol*, **6**, 85.
- Minard, G., Mavingui, P. and Moro, C. V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors*, **6**, 146-146.
- MMWR. (2016a). Erratum: Vol. 65, No. 18. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **65**.
- MMWR. (2016b). Interim Guidance for Zika Virus Testing of Urine - United States, 2016. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **65**.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. and Harrison, S. C. (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 6986-6991.
- Modis, Y., Ogata, S., Clements, D. and Harrison, S. C. (2004). Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*, **427**, 313-319.
- Molko, N., Simon, O., Guyon, D., Biron, A., Dupont-Rouzeyrol, M. and Gourinat, A. C. (2017). Zika virus infection and myasthenia gravis: report of 2 cases. *Neurology*, **88**, 1097-1098.
- Moore, P. R., Johnson, P. H., Smith, G. A., Ritchie, S. A. and Van Den Hurk, A. F. (2007). Infection and dissemination of dengue virus type 2 in *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, and *Aedes scutellaris* from the Torres Strait, Australia. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **23**, 383-388.
- Morat, P. (1993). Our Knowledge of the Flora of New Caledonia: Endemism and Diversity in Relation to Vegetation Types and Substrates. *Biodiversity Letters*, **1**, 72-81.
- Mordecai, E. A., Cohen, J. M., Evans, M. V., Gudapati, P., Johnson, L. R., Lippi, C. A., Miazgowicz, K., Murdock, C. C., Rohr, J. R., Ryan, S. J., Savage, V., Shocket, M. S., Stewart Ibarra, A., Thomas, M. B. and Weikel, D. P. (2017). Detecting the impact of temperature on transmission of Zika, dengue, and chikungunya using mechanistic models. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **11**, e0005568.
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., Rocha, B. C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L. E., Johnson, K. N., Kay, B. H.,

- McGraw, E. A., van den Hurk, A. F., Ryan, P. A. and O'Neill, S. L. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, **139**, 1268-1278.
- Moudy, R. M., Meola, M. A., Morin, L. L., Ebel, G. D. and Kramer, L. D. (2007). A newly emergent genotype of West Nile virus is transmitted earlier and more efficiently by *Culex mosquitoes*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **77**, 365-370.
- Mousson, L., Vazeille, M., Chawprom, S., Prajakwong, S., Rodhain, F. and Failloux, A. B. (2002). Genetic structure of *Aedes aegypti* populations in Chiang Mai (Thailand) and relation with dengue transmission. *Trop Med Int Health*, **7**, 865-872.
- Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J.-P. and Weetman, D. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **11**, e0005625.
- Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the *flavivirus* life cycle. *Nature Reviews Microbiology*, **3**, 13-22.
- Müller, J., A., Harms, M., Schubert, A., Jansen, S., Michel, D., Mertens, T., Schmidt-Chanasit, J. and Münch, J. (2016). Inactivation and Environmental Stability of Zika Virus. *Emerging Infectious Disease journal*, **22**, 1685.
- Munoz, M. L., Cisneros, A., Cruz, J., Das, P., Tovar, R. and Ortega, A. (1998). Putative dengue virus receptors from mosquito cells. *FEMS Microbiol Lett*, **168**, 251-258.
- Nhan, T. X., Claverie, A., Roche, C., Teissier, A., Colleuil, M., Baudet, J. M., Cao-Lormeau, V. M. and Musso, D. (2014). *Chikungunya virus imported into French polynesia, 2014*. *Emerg Infect Dis*. 2014 Oct;20(10):1773-4. doi: 10.3201/eid2010.141060.
- Oehler, E., Watrin, L., Larre, P., Leparc-Goffart, I., Lastere, S., Valour, F., Baudouin, L., Mallet, H., Musso, D. and Ghawche, F. (2014). Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill*, **19**, 20720.
- OMS. (2013). *Guide pour la prise en charge clinique de la dengue*.
- ORSTOM. (1993). Atlas de Polynésie Française. *Editions de l'ORSTOM, Paris, France*.

- Osei-Poku, J., Mbogo, C. M., Palmer, W. J. and Jiggins, F. M. (2012). Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Molecular Ecology*, **21**, 5138-5150.
- PAHO/WHO. (2017). Zika - Epidemiological Report Brazil. *Pan American Health Organization / World Health Organization.*, **Washington, D.C.: PAHO/WHO; 2017.**
- Pan, X., Zhou, G., Wu, J., Bian, G., Lu, P., Raikhel, A. S. and Xi, Z. (2012). Wolbachia induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **109**, 28.
- Pardi, N., Hogan, M. J., Pelc, R. S., Muramatsu, H., Andersen, H., DeMaso, C. R., Dowd, K. A., Sutherland, L. L., Scarce, R. M., Parks, R., Wagner, W., Granados, A., Greenhouse, J., Walker, M., Willis, E., Yu, J.-S., McGee, C. E., Sempowski, G. D., Mui, B. L., Tam, Y. K., Huang, Y.-J., Vanlandingham, D., Holmes, V. M., Balachandran, H., Sahu, S., Lifton, M., Higgs, S., Hensley, S. E., Madden, T. D., Hope, M. J., Karikó, K., Santra, S., Graham, B. S., Lewis, M. G., Pierson, T. C., Haynes, B. F. and Weissman, D. (2017). Zika virus protection by a single low-dose nucleoside-modified mRNA vaccination. *Nature*, **543**, 248-251.
- Paupy, C., Brengues, C., Kamgang, B., Herve, J. P., Fontenille, D. and Simard, F. (2008). Gene flow between domestic and sylvan populations of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) in North Cameroon. *Journal of Medical Entomology*, **45**, 391-400.
- Paupy, C., Le Goff, G., Brengues, C., Guerra, M., Revollo, J., Barja Simon, Z., Hervé, J.-P. and Fontenille, D. (2012). Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*, **12**, 1260-1269.
- Paupy, C., Vazeille-Falcoz, M., Mousson, L., Rodhain, F. and Failloux, A. B. (2000). *Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population density. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **62**, 217-224.
- Perera, R. and Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Current Opinion in Microbiology*, **11**, 369-377.
- Perrone, J. B. and Spielman, A. (1988). Time and site of assembly of the peritrophic membrane of the mosquito *Aedes aegypti*. *Cell and Tissue Research*, **252**, 473-478.

- Perry, W. J. (1950). The mosquitoes and mosquito-borne diseases on New Caledonia, an historic account; 1885-1946. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **30**, 103-114.
- Petersen, L. R., Jamieson, D. J., Powers, A. M. and Honein, M. A. (2016). Zika Virus. *New England Journal of Medicine*, **374**, 1552-1563.
- Pettersson, J. H., Eldholm, V., Seligman, S. J., Lundkvist, A., Falconar, A. K., Gaunt, M. W., Musso, D., Nougairede, A., Charrel, R., Gould, E. A. and de Lamballerie, X. (2016). How Did Zika Virus Emerge in the Pacific Islands and Latin America? *MBio*, **7**, 01239-01216.
- Pompon, J., Morales-Vargas, R., Manuel, M., Huat Tan, C., Vial, T., Hao Tan, J., Sessions, O. M., Vasconcelos, P. D. C., Ng, L. C. and Misse, D. (2017). A Zika virus from America is more efficiently transmitted than an Asian virus by *Aedes aegypti* mosquitoes from Asia. *Scientific Reports*, **7**, 017-01282.
- Raju, A. K. (2003). Community Mobilization in *Aedes aegypti* Control Programme by Source Reduction in Peri-Urban District of Lautoka, Viti Levu, Fiji Islands. *Dengue Bulletin*, 149-155.
- Rallu, J.-L. (1989). Démographie des territoires français d'Océanie. In: Revue française d'histoire d'outre-mer. *La France du Pacifique*, **76** 45-62.
- Rallu, J.-L. (1994). Tendances recentes des migrations dans le Pacifique Sud. In: Espace, population, sociétés. *Les populations du Pacifique - Populations of the Pacific*, 201-212.
- Ramirez, J. L. and Dimopoulos, G. (2010). The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Developmental and comparative immunology*, **34**, 625-629.
- Ramirez, J. L., Short, S. M., Bahia, A. C., Saraiva, R. G., Dong, Y., Kang, S., Tripathi, A., Mlambo, G. and Dimopoulos, G. (2014). Chromobacterium Csp_P Reduces Malaria and Dengue Infection in Vector Mosquitoes and Has Entomopathogenic and In Vitro Anti-pathogen Activities. *PLOS Pathogens*, **10**, e1004398.
- Ramirez, J. L., Souza-Neto, J., Torres Cosme, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J. M. and Dimopoulos, G. (2012). Reciprocal Tripartite Interactions between the *Aedes aegypti*

- Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**.
- Rances, E., Ye, Y. H., Woolfit, M., McGraw, E. A. and O'Neill, S. L. (2012). The relative importance of innate immune priming in Wolbachia-mediated dengue interference. *PLOS Pathogens*, **8**, 23.
- Reich, N. G., Shrestha, S., King, A. A., Rohani, P., Lessler, J., Kalayanarooj, S., Yoon, I.-K., Gibbons, R. V., Burke, D. S. and Cummings, D. A. T. (2013). Interactions between serotypes of dengue highlight epidemiological impact of cross-immunity. *Journal of The Royal Society Interface*, **10**.
- Rezende, G. L., Martins, A. J., Gentile, C., Farnesi, L. C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A. A. and Valle, D. (2008). Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized Serosal Cuticle. *BMC Developmental Biology*, **8**, 82-82.
- Rice, C. M. (1990). Overview of *flavivirus* molecular biology and future vaccine development via recombinant DNA. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*, **21**, 670-677.
- Richard, V., Paoaafaite, T. and Cao-Lormeau, V. M. (2016). Vector Competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **10**.
- Rico-Hesse, R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, **174**, 479-493.
- Rico-Hesse, R. (2003). Microevolution and virulence of dengue viruses. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, **59**, 315-341.
- Roth A, M. A., Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, Guillaumot L, Souarès Y. . (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. . *Euro Surveillance*, **19**, 20929.
- Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., Guillaumot, L. and Souares, Y. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveillance*, **19**, 20929.

- Russell, B. M., Kay, B. H. and 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.
- Russell, R. C. and Dwyer, D. E. (2000). Arboviruses associated with human disease in Australia. *Microbes and Infection*, **2**, 1693-1704.
- Sanders, H. R., Foy, B. D., Evans, A. M., Ross, L. S., Beaty, B. J., Olson, K. E. and 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**, 1293-1307.
- Scholle, F., Girard, Y. A., Zhao, Q., Higgs, S. and Mason, P. W. (2004). trans-Packaged West Nile virus-like particles: infectious properties in vitro and in infected mosquito vectors. *J Virol*, **78**, 11605-11614.
- Schuffenecker, I., Itean, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M.-C., Lavenir, R., Pardigon, N., Reynes, J.-M., Pettinelli, F., Biscornet, L., Diancourt, L., Michel, S., Duquerroy, S., Guigon, G., Frenkiel, M.-P., Bréhin, A.-C., Cubito, N., Desprès, P., Kunst, F., Rey, F. A., Zeller, H. and Brisse, S. (2006). Genome Microevolution of Chikungunya Viruses Causing the Indian Ocean Outbreak. *PLOS Medicine*, **3**, e263.
- Schuler-Faccini, L., Ribeiro, E. M., Feitosa, I. M., Horovitz, D. D., Cavalcanti, D. P., Pessoa, A., Doriqui, M. J., Neri, J. I., Neto, J. M., Wanderley, H. Y., Cernach, M., El-Husny, A. S., Pone, M. V., Serao, C. L. and Sanseverino, M. T. (2016). Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, **65**, 59-62.
- Shi, Y. and Gao, G. F. (2017). Structural Biology of the Zika Virus. *Trends in Biochemical Sciences*, **42**, 443-456.
- Sim, S., Aw, P. P. K., Wilm, A., Teoh, G., Hue, K. D. T., Nguyen, N. M., Nagarajan, N., Simmons, C. P. and Hibberd, M. L. (2015). Tracking Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity during Human-to-Mosquito Transmission. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **9**, e0004052.
- Sim, S., Jupatanakul, N. and Dimopoulos, G. (2014). Mosquito Immunity against Arboviruses. *Viruses*, **6**, 4479-4504.
- Sim, S., Jupatanakul, N., Ramirez, J. L., Kang, S., Romero-Vivas, C. M., Mohammed, H. and Dimopoulos, G. (2013). Transcriptomic Profiling of Diverse *Aedes aegypti* Strains

- Reveals Increased Basal-level Immune Activation in Dengue Virus-refractory Populations and Identifies Novel Virus-vector Molecular Interactions. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **7**, e2295.
- Singh, N., Kiedrzyński, T., Lepers, C. and Benyon, E. K. (2005). Dengue in the Pacific--an update of the current situation. *Pacific Health Dialog*, **12**, 111-119.
- Sirohi, D., Chen, Z., Sun, L., Klose, T., Pierson, T. C., Rossmann, M. G. and Kuhn, R. J. (2016). The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science*, **352**, 467-470.
- Slotman, M., Kelly, N., Harrington, C., Kitthawee, S., Jones, W., Scott, T., Cacoone, A. and Powell, J. (2007). Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. *Molecular Ecology Notes*, **7**, 168 - 171.
- Smith, D. R. (2012). An update on mosquito cell expressed dengue virus receptor proteins. *Insect Molecular Biology*, **21**, 1-7.
- Smith, D. R., Adams, A. P., Kenney, J. L., Wang, E. and Weaver, S. C. (2008). Venezuelan equine encephalitis virus in the mosquito vector *Aedes taeniorhynchus*: Infection initiated by a small number of susceptible epithelial cells and a population bottleneck. *Virology*, **372**, 176-186.
- Soo, K.-M., Khalid, B., Ching, S.-M. and Chee, H.-Y. (2016). Meta-Analysis of Dengue Severity during Infection by Different Dengue Virus Serotypes in Primary and Secondary Infections. *PLoS One*, **11**, e0154760.
- Souza-Neto, J. A., Sim, S. and Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **106**, 17841-17846.
- Stadler, K., Allison, S. L., Schalich, J. and Heinz, F. X. (1997). Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin. *J Virol*, **71**, 8475-8481.
- Stapleford, K. A., Coffey, L. L., Lay, S., Borderia, A. V., Duong, V., Isakov, O., Rozen-Gagnon, K., Arias-Goeta, C., Blanc, H., Beaucourt, S., Haliloglu, T., Schmitt, C., Bonne, I., Ben-Tal, N., Shomron, N., Failloux, A. B., Buchy, P. and Vignuzzi, M. (2014). Emergence and transmission of arbovirus evolutionary intermediates with epidemic potential. *Cell Host Microbe*, **15**, 706-716.
- Strauss, J. H. and Strauss, E. G. (1994). The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. *Microbiological Reviews*, **58**, 491-562.

- Sukonthabhirom, S., Rongnoparut, P., Saengtharatip, S., Jirakanjanakit, N. and Chareonviriyaphap, T. (2005). Genetic structure and gene flow among *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from central Thailand. *Journal of Medical Entomology*, **42**, 604-609.
- Sylla, M., Bosio, C., Urdaneta-Marquez, L., Ndiaye, M. and Black, W. C. t. (2009). Gene flow, subspecies composition, and dengue virus-2 susceptibility among *Aedes aegypti* collections in Senegal. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **3**, 14.
- Tabachnick, W. (1994). Genetics of Insect Vector Competence for Arboviruses. In: *Advances in Disease Vector Research*, K. Harris, Ed, Vol. 10, Springer New York, pp. p 93-108.
- Tabachnick, W. J. (1991). Evolutionary genetics and arthropod-borne disease: the yellow fever mosquito. *American Entomologist*, **37**, 14-26.
- Tabachnick, W. J. (2013). Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, **10**, 249-277.
- Talbalaghi, A., Moutailler, S., Vazeille, M. and 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.
- Tan, C. H., Wong, P. J., Li, M. I., Yang, H., Ng, L. C. and O'Neill, S. L. (2017). wMel limits zika and chikungunya virus infection in a Singapore Wolbachia-introgressed *Ae. aegypti* strain, wMel-Sg. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **11**.
- Teurlai, M., Menkès, C. E., Cavarero, V., Degallier, N., Descloux, E., Grangeon, J.-P., Guillaumot, L., Libourel, T., Lucio, P. S., Mathieu-Daudé, F. and Mangeas, M. (2015). Socio-economic and Climate Factors Associated with Dengue Fever Spatial Heterogeneity: A Worked Example in New Caledonia. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **9**, e0004211.
- Tjaden, N. B., Thomas, S. M., Fischer, D. and Beierkuhnlein, C. (2013). Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **7**, e2207.
- Tsetsarkin, K. A., Vanlandingham, D. L., McGee, C. E. and Higgs, S. (2007). A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLOS Pathogens*, **3**.

- Tun-Lin, W., Burkot, T. R. and Kay, B. H. (2000). Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Medical and Veterinary Entomology*, **14**, 31-37.
- Urdaneta-Marquez, L. and Failloux, A.-B. (2011). Population genetic structure of *Aedes aegypti*, the principal vector of dengue viruses. *Infection, Genetics and Evolution*, **11**, 253-261.
- van den Hurk, A. F., Hall-Mendelin, S., Pyke, A. T., Frentiu, F. D., McElroy, K., Day, A., Higgs, S. and O'Neill, S. L. (2012). Impact of Wolbachia on infection with chikungunya and yellow fever viruses in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, 1.
- van den Hurk, A. F., McElroy, K., Pyke, A. T., McGee, C. E., Hall-Mendelin, S., Day, A., Ryan, P. A., Ritchie, S. A., Vanlandingham, D. L. and Higgs, S. (2011). Vector competence of Australian mosquitoes for yellow fever virus. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **85**, 446-451.
- Vanlandingham, D. L., Hong, C., Klingler, K., Tsetsarkin, K., McElroy, K. L., Powers, A. M., Lehane, M. J. and Higgs, S. (2005). Differential infectivities of o'nyong-nyong and chikungunya virus isolates in *Anopheles gambiae* and *Aedes aegypti* mosquitoes. *The 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. and Higgs, S. (2006). Determinants of vector specificity of o'nyong nyong and chikungunya viruses in *Anopheles* and *Aedes* mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **74**, 663-669.
- Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., Thiria, J., Dehecq, J. S., Fontenille, D., Schuffenecker, I., Despres, P. and Failloux, A. B. (2007). Two Chikungunya isolates from the outbreak of La Reunion (Indian Ocean) exhibit different patterns of infection in the mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS One*, **2**.
- Vazeille, M., Rosen, L., Mouson, L. and Failloux, A. (2003). Low oral susceptibility for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **68**, 203 - 208.
- Vega-Rua, A. (2015). Émergence du virus chikungunya en Amérique et en Europe. In: *Unité d'Arbovirus et Insectes Vecteurs, Institut Pasteur Paris*, Vol. Thèse de Doctorat, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI.

- Vega-Rua, A., Lourenço-de-Oliveira, R., Mousson, L., Vazeille, M., Fuchs, S., Yébakima, A., Gustave, J., Girod, R., Dusfour, I., Leparç-Goffart, I., Vanlandingham, D. L., Huang, Y.-J. S., Lounibos, L. P., Mohamed Ali, S., Nougairede, A., de Lamballerie, X. and Failloux, A.-B. (2015). Chikungunya Virus Transmission Potential by Local *Aedes* Mosquitoes in the Americas and Europe. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **9**, e0003780.
- Vega-Rúa, A., Schmitt, C., Bonne, I., Krijnse Locker, J. and Failloux, A.-B. (2015). Chikungunya Virus Replication in Salivary Glands of the Mosquito *Aedes albopictus*. *Viruses*, **7**, 5902-5907.
- Vega-Rua, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A. B. and 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.
- Victora, C. G., Schuler-Faccini, L., Matijasevich, A., Ribeiro, E., Pessoa, A. and Barros, F. C. (2016). Microcephaly in Brazil: how to interpret reported numbers? *The Lancet*, **387**, 621-624.
- Volk, S. M., Chen, R., Tsetsarkin, K. A., Adams, A. P., Garcia, T. I., Sall, A. A., Nasar, F., Schuh, A. J., Holmes, E. C., Higgs, S., Maharaj, P. D., Brault, A. C. and Weaver, S. C. (2010). Genome-scale phylogenetic analyses of chikungunya virus reveal independent emergences of recent epidemics and various evolutionary rates. *J Virol*, **84**, 6497-6504.
- Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., Leong, Y. S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A. L., Ritchie, S. A., O'Neill, S. L. and Hoffmann, A. A. (2011). The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, **476**, 450-453.
- Wang, E., Ni, H., Xu, R., Barrett, A. D., Watowich, S. J., Gubler, D. J. and Weaver, S. C. (2000). Evolutionary relationships of endemic/epidemic and sylvatic dengue viruses. *J Virol*, **74**, 3227-3234.
- Warrilow, D., Northill, J. A., Pyke, A. and Smith, G. A. (2002). Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. *Journal of Medical Entomology*, **66**, 524-528.
- 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**, e2921.

- Weaver, S. C. and Barrett, A. D. (2004). Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology*, **2**, 789-801.
- Weaver, S. C. and Reisen, W. K. (2010). Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*, **85**, 328-345.
- Weaver, S. C. and Vasilakis, N. (2009). Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infection, Genetics and Evolution*, **9**, 523-540.
- Weber, D. S., Alroy, K. A. and Scheiner, S. M. (2017). Phylogenetic Insight into Zika and Emerging Viruses for a Perspective on Potential Hosts. *Ecohealth*, **18**, 017-1237.
- Weger-Lucarelli, J., Ruckert, C., Chotiwan, N., Nguyen, C., Garcia Luna, S. M., Fauver, J. R., Foy, B. D., Perera, R., Black, W. C., Kading, R. C. and Ebel, G. D. (2016). Vector Competence of American Mosquitoes for Three Strains of Zika Virus. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **10**.
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J. and Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*, **5**, 365-375.
- Whitfield, S. G., Murphy, F. A. and Sudia, W. D. (1973). St. Louis encephalitis virus: an ultrastructural study of infection in a mosquito vector. *Virology*, **56**, 70-87.
- Woodall, J. P. and Yuill, T. M. (2016). Why is the yellow fever outbreak in Angola a threat to the entire world? *International Journal of Infectious Diseases*, **48**, 96-97.
- Xi, Z., Ramirez, J. L. and Dimopoulos, G. (2008). The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *PLOS Pathogens*, **4**, e1000098.
- Yactayo, S., Staples, J. E., Millot, V., Cibrelus, L. and Ramon-Pardo, P. (2016). Epidemiology of Chikungunya in the Americas. *The Journal of Infectious Diseases*, **214**, S441-S445.
- You, S., Falgout, B., Markoff, L. and Padmanabhan, R. (2001). In vitro RNA synthesis from exogenous dengue viral RNA templates requires long range interactions between 5'- and 3'-terminal regions that influence RNA structure. *The Journal of Biological Chemistry*, **276**, 15581-15591.
- You, S. and Padmanabhan, R. (1999). A novel in vitro replication system for Dengue virus. Initiation of RNA synthesis at the 3'-end of exogenous viral RNA templates requires

- 5'- and 3'-terminal complementary sequence motifs of the viral RNA. *The Journal of Biological Chemistry*, **274**, 33714-33722.
- Yu, I. M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G. and Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, **319**, 1834-1837.
- Yuan, L., Huang, X.-Y., Liu, Z.-Y., Zhang, F., Zhu, X.-L., Yu, J.-Y., Ji, X., Xu, Y.-P., Li, G., Li, C., Wang, H.-J., Deng, Y.-Q., Wu, M., Cheng, M.-L., Ye, Q., Xie, D.-Y., Li, X.-F., Wang, X., Shi, W., Hu, B., Shi, P.-Y., Xu, Z. and Qin, C.-F. (2017). A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. *Science*.
- Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T. S., Strauss, J. H., Rossmann, M. G. and Kuhn, R. J. (2003). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nature Structural Biology*, **10**, 907-912.
- Zhang, Y., Zhang, W., Ogata, S., Clements, D., Strauss, J. H., Baker, T. S., Kuhn, R. J. and Rossmann, M. G. (2004). Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*, **12**, 1607-1618.
- Zheng, A., Umashankar, M. and Kielian, M. (2010). In Vitro and In Vivo Studies Identify Important Features of Dengue Virus pr-E Protein Interactions. *PLOS Pathogens*, **6**, e1001157.
- Zompi, S., Montoya, M., Pohl, M. O., Balmaseda, A. and Harris, E. (2012). Dominant Cross-Reactive B Cell Response during Secondary Acute Dengue Virus Infection in Humans. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, **6**, e1568.
- Zouache, K., Fontaine, A., Vega-Rua, A., Mousson, L., Thiberge, J. M., Lourenco-De-Oliveira, R., Caro, V., Lambrechts, L. and Failloux, A. B. (2014). Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, **281**.
- Zouache, K., Raharimalala, F. N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L. H., Ravelonandro, P. and Mavingui, P. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiology Ecology*, **75**, 377-389.

Annexes

Annexe 1

Detection of Zika Virus in Urine

Ann-Claire Gourinat,¹ Olivia O'Connor,¹
Elodie Calvez, Cyrille Goarant,
and Myrielle Dupont-Rouzeyrol

We describe the kinetics of Zika virus (ZIKV) detection in serum and urine samples of 6 patients. Urine samples were positive for ZIKV >10 days after onset of disease, which was a notably longer period than for serum samples. This finding supports the conclusion that urine samples are useful for diagnosis of ZIKV infections.

Zika virus (ZIKV) is an emerging mosquito-borne pathogen (family *Flaviviridae*, genus *Flavivirus*) that was isolated in 1947 from a rhesus monkey in the Zika forest in Uganda (1). ZIKV is believed to be transmitted to humans by infected *Aedes* spp. mosquitoes (2,3). Studies have demonstrated that ZIKV is endemic to Africa and Southeast Asia (4). Before 2007, few cases of human infection with ZIKV had been reported. In 2007, an epidemic of ZIKV infection in humans occurred in Yap, Federated States of Micronesia, in the Pacific region. A seroprevalence survey determined that $\leq 70\%$ of the population had been infected (5). During 2007–2013, the few cases of infection with ZIKV reported were in travelers returning from Africa (6) or Southeast Asia (7).

In humans, ZIKV infection is characterized by mild fever (37.8°C–38.5°C); arthralgia, notably of small joints of hands and feet; myalgia, headache; retroorbital pain; conjunctivitis; and cutaneous maculopapular rash. ZIKV infection is believed to be asymptomatic or mildly symptomatic in most cases (5). Thus, Zika can be misdiagnosed during the acute (viremic) phase because of nonspecific influenza-like signs and symptoms. Hemorrhagic signs have not been reported in ZIKV-infected patients (5–7). However neurologic complications, including Guillain-Barré syndrome, have been observed (8).

Biological confirmation of ZIKV infections is based mostly on detection of virus RNA in serum by using reverse transcription PCR (RT-PCR). Although IgM against ZIKV can be detected by ELISA, few laboratories have this ability. Thus, in addition to the nonspecific clinical features of infection with ZIKV, laboratory diagnosis is challenging because of low viremia and cross-reactivity of ZIKV antibodies with other flaviviruses (including dengue), which require confirmation by neutralization assays (8) and make rapid serologic confirmation difficult. We investigated the

diagnostic utility of urine as a source for detection of ZIKV RNA by real-time RT-PCR.

The Study

In October 2013, a ZIKV outbreak was reported in French Polynesia (9). This was the second outbreak of ZIKV infection reported in the Pacific region. In New Caledonia, where ZIKV infection had never been documented, the first cases of ZIKV infection imported from French Polynesia were confirmed by the end of November, and the first autochthonous cases were reported by mid-January 2014. Early in February 2014, the New Caledonia Health Authority declared an outbreak situation. By the end of August 2014, >1,400 cases of ZIKV infection were biologically confirmed, including 34 cases imported from French Polynesia (10).

Written informed consent was obtained from all patients in this study. Clinical signs and symptoms of 6 ZIKV-infected patients are shown in the Table. In this study, a cutaneous maculopapular rash of the trunk and extremities was systematically observed and considered a relevant clinical criterion. Complete blood counts showed a discreet perturbation common in many viral infections (mild leukopenia and thrombocytopenia associated with activated lymphocytes).

To detect ZIKV in samples (RNA extracted from 200 μL of serum or urine), we used both sets of primers/probe specific for ZIKV (11). A standard curve with serial dilutions of known concentrations of a ZIKV virus stock was used to estimate viral load in samples. All blood samples were also tested for dengue virus and chikungunya virus by real-time RT-PCR and showed negative results. ZIKV was detected in serum of 4 patients (Figure). Urine samples from 2 other patients were also positive for ZIKV, and showed a higher viral load than corresponding serum samples and were positive for ≤ 7 days (patient 4) and probably >20 days (patient 3) after viremia reached an undetectable level (Figure). Urine samples from 6 healthy patients were also assessed and showed negative results.

Partial sequences of the gene for ZIKV nonstructural protein were obtained (12) directly from amplification products from urine or serum samples. Sequences obtained (GenBank accession nos. KJ873160 and KJ873161) had 100% identity with the sequence of a ZIKV strain isolated from a patient who returned from French Polynesia in 2013. As observed previously (9,13), sequences also had 98% identity with sequences of ZIKV strains isolated in Cambodia in 2010 and in Yap in 2007.

¹These authors contributed equally to this article.

Author affiliation: Institut Pasteur, Noumea, New Caledonia

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2101.140894>

Table. Characteristics of 6 patients infected with Zika virus, New Caledonia, 2014*

Characteristics	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4	Patient 5	Patient 6
Clinical						
Headache	-	-	-	-	+	-
Arthralgia	-	+++ (ankles)	++ (hands)	+++	++ (hands)	-
Maculopapular rash	+++	++	+++	++	+++	+++
Itching	+	+	+	++	+++	++
Edema in hands	+	-	-	++	-	++
Conjunctivitis	-	++	-	+	+	-
Adenopathy	++	-	-	-	-	-
Fever	+	+ (38°C)	+	++ (39°C)	++ (39.5°C)	-
Retroorbital pain	++	-	-	-	-	-
Myalgia	NA	-	+	+	+	+
Laboratory						
Leukopenia	-	-	+	-	NA	+
Thrombocytopenia	-	-	+ (123 g/L)	-	NA	-
Activated lymphocytes	+	+	+	+	NA	+

*-, negative; +, light; ++, moderate; +++, intense; NA, not available.

Conclusions

We report the suitability of urine samples for diagnosis of ZIKV infection by showing that ZIKV RNA is detectable in urine at a higher load and with a longer duration than in serum. ZIKV infection has been poorly described because it is a benign, self-limiting illness in most cases (5). Thus, ZIKV infection has probably been underdiagnosed and underreported in disease-endemic settings (4) or in returning travelers. However, if perifocal vector control is to be implemented and severe neurologic complications are to be avoided, biological confirmation of ZIKV infection is essential. Because of the absence of specific IgM-based diagnostic tests, molecular confirmation is the only method available for routine diagnosis.

For ZIKV infection, date of onset of illness is difficult to establish because of sporadic and frequently mild fever.

Although rash has been reported 3–5 days after the febrile phase (6,7), the 6 patients in our study had light asthenia and mild fever 2–3 days before the rash was observed; these symptoms were considered indicative of disease onset. Therefore, at the time the rash was observed, viremia was probably decreasing, which makes detection of virus in serum samples extremely challenging (Figure).

Other groups have reported that other flavivirus genomes, such as those of dengue virus (14), West Nile virus (15) and recently ZIKV (13), can be detected in urine samples for a longer time than in serum samples. Furthermore, use of urine samples for laboratory testing has some advantages, such as noninvasive sampling and ease of use. We detected ZIKV RNA in urine samples from all 6 patients. Urine samples showed strongly positive results; estimated maximum viral load was 0.7–220.10⁶ copies/mL.

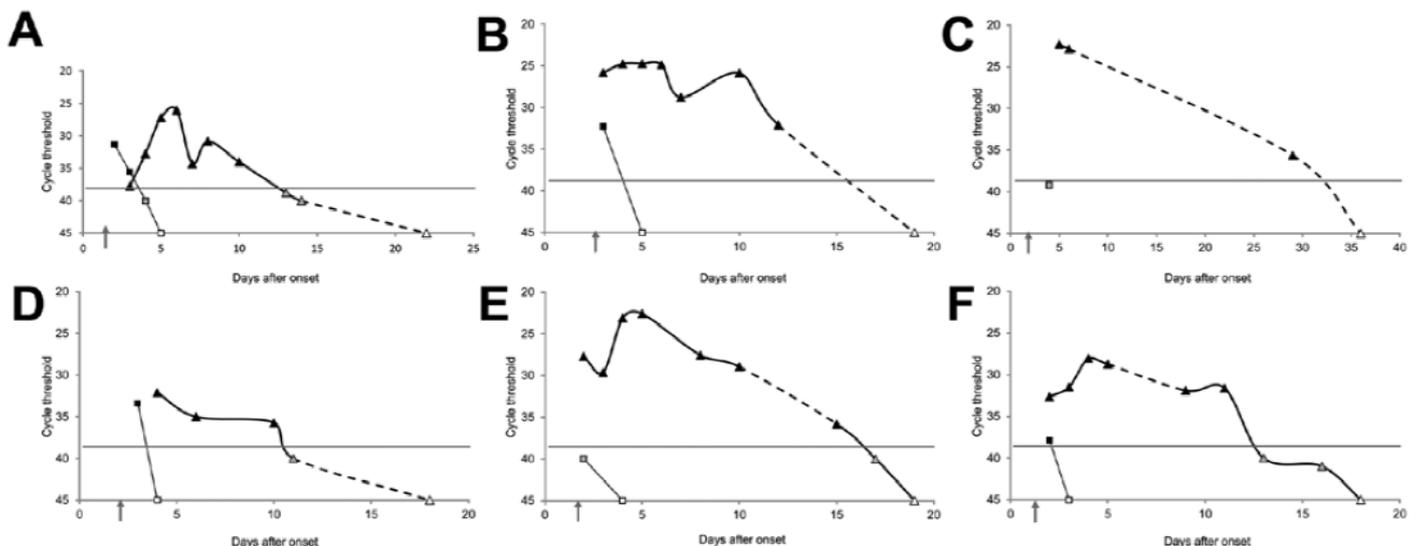


Figure. Detection of Zika virus in blood and urine specimens of 6 patients by using real-time reverse transcription PCR with primers/probe 1086/1162c/1107-Cy5 (11) New Caledonia, 2014. A) Patient 1; B) Patient 2; C) Patient 3; D) Patient 4; E) Patient 5; F) Patient 6. Triangles indicate urine samples and squares indicate serum samples. The cutoff cycle threshold (C_t) value is 38.5, as previously reported (11) and is indicated by horizontal lines. Black symbols indicate amplifications with $C_t < 38.5$, gray symbols indicate amplifications with $C_t \geq 38.5$, and white symbols indicate negative amplifications. Onset of disease (day 0) was defined retrospectively after questioning patients about initial symptoms. Dashed lines indicate a period >2 days without a sample being obtained. Arrows indicate onset of rash.

For all cases with sequential specimens, ZIKV RNA was detected ≤ 15 days (range 10 days to >20 days) after onset of symptoms, which was >7 days after it was not detected in serum samples.

In our study, ZIKV was detected in patient serum until a rash was observed (days 2–3 after disease onset). However, urine was preferred for virus detection. We observed a slight increase in ZIKV RNA from urine over the first few days after disease onset and rash (Figure). We therefore attempted to isolate ZIKV from urine samples, but failed to cultivate infectious particles. Further investigations are needed to evaluate whether live infectious ZIKV particles are excreted in urine, as has been observed for other arboviruses (15).

This study investigated the diagnostic utility of urine as a source for detection of ZIKV RNA by real-time RT-PCR. Results suggest that urine might be useful for confirmation of ZIKV infection because virus was detected at higher titers and for a longer period in urine samples than in serum samples. Although these results need confirmation in larger cohorts, they strongly suggest the suitability of urine as a specimen for ZIKV detection and screening in large-scale investigations or other epidemiologic contexts (e.g., returning travelers).

In industrialized regions, where local transmission of arboviruses, such as dengue virus or chikungunya virus has been reported, physicians should test patients who return from tropical regions for ZIKV when a case of dengue-like infection is suspected. Travelers might be a source of local transmission because *Ae. albopictus* mosquitoes are a competent vector for ZIKV (3).

Acknowledgments

We thank the staff of the Institut Pasteur in New Caledonia and M. Richard for providing technical support and I. Leparac-Goffart for providing Zika virus stock for the RT-PCR. Sequencing experiments were performed on La-Plateforme-du-Vivant (Noumea, New Caledonia).

Dr. Gourinat is a clinical pathologist and head of the Serology, Immunology, and Molecular Biology Unit at the Institut Pasteur, Noumea, New Caledonia. Her research interests are diagnostic and biological surveillance of arboviruses.

References

- Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1952;46:509–20. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Haddock AJ, Williams MC, Woodall JP, Simpson DI, Goma LK. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes (Stegomyia) africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull World Health Organ.* 1964;31:57–69.
- Wong PS, Li MZ, Chong CS, Ng LC, Tan CH. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): a potential vector of Zika virus in Singapore. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7:e2348. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0002348>

- Hayes EB. Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis.* 2009;15:1347–50. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1509.090442>
- Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med.* 2009;360:2536–43. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>
- Kwong JC, Druce JD, Leder K. Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 2013;89:516–7. <http://dx.doi.org/10.4269/ajtmh.13-0029>
- Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddock AD, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011;17:880–2. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1705.101939>
- Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparac-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill.* 2014;19:pii: 20720.
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014;20:1085–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2006.140138>
- Health situation in New Caledonia—Zika, 2014 [in French] [cited 2014 Sep 9]. http://www.dass.gouv.nc/portal/page/portal/dass/observatoire_sante/veille_sanitaire/Zika
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 2008;14:1232–9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- Kuno G, Chang GJ, Tsuchiya KR, Karabatsos N, Cropp CB. Phylogeny of the genus *Flavivirus*. *J Virol.* 1998;72:73–83.
- Kutsuna S, Kato Y, Takasaki T, Moi M, Kotaki A, Uemura H, et al. Two cases of Zika fever imported from French Polynesia to Japan, December 2013 to January 2014. *Euro Surveill.* 2014;19:pii:20683.
- Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, et al. Detection of dengue virus genome in urine by real-time reverse transcriptase PCR: a laboratory diagnostic method useful after disappearance of the genome in serum. *J Clin Microbiol.* 2012;50:2047–52. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.06557-11>
- Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Pagni S, Martello T, Cattai M, et al. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection. *J Infect Dis.* 2013;208:1086–92. <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jit290>

Address for correspondence: Myrielle Dupont-Rouzeyrol, Institut Pasteur, 9–11 Ave Paul Doumer, BP 61, Noumea 98845, New Caledonia; email: mdupont@pasteur.nc

PODCAST

Breathing Valley Fever

Dr. Duc Vugia, chief of the Infectious Diseases Branch in the California Department of Public Health, discusses Valley Fever.

<http://www2c.cdc.gov/podcasts/player.asp?f=8631241>

Annexe 2

Address for correspondence: Masri Sembiring Maha, Center for Biomedical and Basic Technology of Health, National Institute of Health Research and Development, Ministry of Health, Republic of Indonesia, Jl. Percetakan Negara 23, Jakarta Pusat 16417 Indonesia; email: masrimaha@yahoo.com

Co-infection with Zika and Dengue Viruses in 2 Patients, New Caledonia, 2014

Myrielle Dupont-Rouzeyrol, Olivia O'Connor, Elodie Calvez, Maguy Daurès, Michèle John, Jean-Paul Grangeon, Ann-Claire Gourinat

Authors affiliations: Institut Pasteur, Noumea, New Caledonia (M. Dupont-Rouzeyrol, O. O'Connor, E. Calvez, A.-C. Gourinat); Direction des Affaires Sanitaires et Sociales, Noumea (M. Daurès, M. John, J.-P. Grangeon)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2102.141553>

To the Editor: Dengue is the most prevalent arthropod-borne viral disease in tropical and subtropical countries. Every year, dengue virus (DENV) infections cause more than 50 million cases, 500,000 hospitalizations, and 12,500 deaths worldwide (1). DENV belongs to the genus *Flavivirus* and is transmitted by *Aedes* spp. mosquitoes. There are 4 distinct serotypes (DENV-1 to DENV-4), and infection with 1 serotype does not provide long-term, cross-protective immunity against the other 3 serotypes.

In New Caledonia, DENV outbreaks have occurred since World War II and have been caused mainly by 1 serotype/genotype introduced from a country to which dengue is hyperendemic. Since 2000, New Caledonia has had recurrent DENV-1 outbreaks (2). In 2014, circulation of DENV-1 and DENV-3 was still reported in this country (3).

Zika virus (ZIKV) is an emerging mosquito-borne virus that belongs to the genus *Flavivirus* and was first isolated in Uganda (4). ZIKV is believed to be transmitted to humans by *Aedes* spp. mosquitoes. Before 2007, few human cases of infection had been reported. In 2007, the first Zika epidemic occurred in Yap, Federated States of Micronesia (5). In October 2013, a ZIKV outbreak was reported in French Polynesia (6).

In New Caledonia, the first cases of ZIKV infection imported from French Polynesia were confirmed at the end of November 2013, and the first autochthonous cases were reported by mid-January 2014. Early in February 2014, the New Caledonia Health Authority declared an outbreak situation. Since February 2014, a total of 1,385 ZIKV laboratory-confirmed cases have been detected, including 35 imported cases (32 from French Polynesia, 2 from Vanuatu,

and 1 from the Cook Islands). Concomitant with this ZIKV outbreak, circulation of DENV-1 and DENV-3 was reported; >150 cases were biologically confirmed during January–September 2014 (3). Thus, New Caledonia currently has 3 arboviruses co-circulating.

In recent years, co-circulation of multiple DENV serotypes or DENV and chikungunya virus has been reported. Although rare co-infections have been identified (7,8), given the similar clinical features and lack of concurrent testing, co-infections might not be identified. We report detection of ZIKV and DENV genomes in serum of a traveler (patient 1) who returned from French Polynesia where ZIKV and DENV were co-circulating (6,9) and in serum of a person (patient 2) in New Caledonia who had no travel history. The traveler was co-infected with ZIKV and DENV-3, and the local patient was co-infected with ZIKV and DENV-1.

Patient 1 was a 14-year-old boy who had fever (39.5°C), headache, arthralgia, asthenia, and myalgia. No hemorrhagic or neurologic findings were reported, and the patient recovered within 3 days. A complete blood count showed mild thrombocytopenia (platelet count 129×10^9 platelets/L; reference range $150\text{--}400 \times 10^9$ platelets/L), leukopenia (leukocyte count 2.75×10^9 cells/L; reference range $4\text{--}10 \times 10^9$ cells/L) with associated stimulated lymphocytes, and discreet hepatic cytolysis (aspartate aminotransferase 55 IU/L; reference value <34 IU/L, and alanine aminotransferase 51 IU/L; reference value <55 IU/L). Serum was analyzed by using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR) and was positive for ZIKV as recommended by Lanciotti et al. (5) and DENV-3.

Patient 2 was a 38-year-old woman who had fever (40°C), headache, arthralgia, asthenia, myalgia, retroorbital pain, conjunctivitis, diarrhea, nausea, and a diffuse pruritic maculopapular rash. No hemorrhagic or neurologic findings were reported, but signs of illness lasted ≈ 1 week. The patient had mild thrombocytopenia (platelet count 123×10^9 platelets/L) and leukopenia (leukocyte count 2.65×10^9 cells/L). Serum was analyzed by using RT-PCR (5) and was positive for ZIKV and DENV-1.

Co-infections were assessed by sequencing partial ZIKV membrane–envelope gene regions for isolates (GenBank accession nos. KM212963 and KM212967) from both patients, partial DENV-1 envelope gene for an isolate (KM212960) from patient 2, and partial DENV-3 nonstructural protein 5 gene for an isolate (KM212962) from patient 1. Sequencing was conducted at La Plateforme du Vivant (Noumea, New Caledonia).

DENV-1 sequence obtained belonged to genotype I and clustered with DENV-1 sequences isolated in New Caledonia (2). DENV-3 sequence obtained belonged to genotype III, similar to DENV-3 recently isolated in French Polynesia (9). ZIKV sequences obtained belonged to the

Asian lineage and had 99% identity with sequences of ZIKV isolated in French Polynesia in 2013 (10).

Serum specimens from both patients were cultured on Vero cells, and supernatants were evaluated by RT-PCR. Each specimen was positive only for DENV, which was probably caused by low viral loads for ZIKV.

We report co-infection of 2 patients with DENV and ZIKV; each patient was infected with a different DENV serotype. No synergistic effects of the 2 viral infections were observed because both patients were not hospitalized and recovered after a mild clinical course.

During this outbreak, patients in New Caledonia were tested for DENV, chikungunya virus, and ZIKV within the framework of the arboviruses sentinel network, which enabled detection of co-infections. Thus, clinicians should be aware of infections with multiple pathogens in the differential diagnosis of dengue-like illness, especially in patients who returned from tropical regions. This diagnostic procedure could be improved by using multiplex RT-PCR for travelers, given the frequent co-circulation of multiple arboviruses in tropical regions.

Acknowledgments

We thank C. Goarant for providing scientific advice and critically revising the manuscript and D. Baudon for providing scientific support.

This study was supported by the Institut Pasteur and the New Caledonia Government.

References

- World Health Organization. Dengue guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control, 2009 [cited 2014 Nov 4]. http://whqlibdoc.who.int/publications/2009/9789241547871_eng.pdf
- Dupont-Rouzeyrol M, Aubry M, O Connor O, Roche C, Gourinat AC, Guigon A, et al. Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001–2013. *Virology*. 2014;11:61. <http://dx.doi.org/10.1186/1743-422X-11-61>
- Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle-Calédonie. Situation sanitaire de la Nouvelle-Calédonie. La dengue, 2014 [cited 2014 Nov 4]. www.dass.gouv.nc/portal/page/portal/dass/observatoire_sante/veille_sanitaire/Dengue
- Dick GW, Kitchen SF, Haddock AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1952;46:509–20. [http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](http://dx.doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4)
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis*. 2008;14:1232–9. <http://dx.doi.org/10.3201/eid1408.080287>
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1085–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2011.141380>
- Vinodkumar CS, Kalapannavar NK, Basavarajappa KG, Sanjay D, Gowli C, Nadig NG, et al. Episode of coexisting infections with multiple dengue virus serotypes in central Karnataka, India. *J Infect Public Health*. 2013;6:302–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jiph.2013.01.004>
- Caron M, Paupy C, Grard G, Becquart P, Mombo I, Nso BB, et al. 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*. 2012;55:e45–53. <http://dx.doi.org/10.1093/cid/cis530>
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Musso D, Mallet HP, Dalipanda T, Dofai A, et al. Dengue virus type 3, South Pacific Islands, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014;20:1034–6. <http://dx.doi.org/10.3201/eid2006.131413>
- Baronti C, Piorkowski G, Charrel RN, Boubis L, Leparc-Goffart I, de Lamballerie X. Complete coding sequence of Zika virus from a French Polynesia outbreak in 2013. *Genome Announc*. 2014;2:pii: e00500-14. <http://dx.doi.org/10.1128/genomeA.00500-14>

Address for correspondence: Myrielle Dupont-Rouzeyrol, Unité de Recherche et d'Expertise–Dengue et autres Arboviroses, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, 9–11 Ave Paul Doumer, BP 61, 98845 Noumea, New Caledonia; email: mdupont@pasteur.nc

Fatal Meningoencephalitis in Child and Isolation of *Naegleria fowleri* from Hot Springs in Costa Rica

Elizabeth Abrahams-Sandí,
Lissette Retana-Moreira, Alfredo Castro-Castillo,
María Reyes-Batlle, Jacob Lorenzo-Morales

Author affiliations: University of Costa Rica, San Pedro, Costa Rica (E. Abrahams-Sandí, L. Retana-Moreira, A. Castro-Castillo); University of Costa Rica Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, San Pedro (E. Abrahams-Sandí, L. Retana-Moreira, A. Castro-Castillo); University of La Laguna Institute of Tropical Diseases and Public Health of the Canary Islands, Tenerife, Spain (M. Reyes-Batlle, J. Lorenzo-Morales)

DOI: <http://dx.doi.org/10.3201/eid2102.141576>

To the Editor: Primary amebic meningoencephalitis (PAM) is an acute and fulminant disease caused by *Naegleria fowleri*, an amphizoic amoeba belonging to the family *Vahlkampfiidae*. About 235 PAM cases have been described worldwide, most in children and immunocompetent young adults (1,2). The infection occurs through the nose; the amoeba enters through the nasal passages and ascends the olfactory nerve until it reaches the olfactory bulb of the central nervous system. The incubation period for PAM ranges from 5 to 7 days, and infection leads to death within a week. Symptom onset is abrupt, with bifrontal or bitemporal headaches, fever, and stiff neck, followed by nausea, vomiting, irritability, and fatigue. The mortality rate is as high as 95%; few cases of survival have been reported (2,3).

Annexe 3

RESEARCH ARTICLE

Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific

Elodie Calvez^{1*}, Laurent Guillaumot², Laurent Millet³, Jérôme Marie⁴, Hervé Bossin⁴, Vineshwaran Rama⁵, Akata Faamoe⁶, Sosiasi Kilama², Magali Teurlai⁷, Françoise Mathieu-Daudé⁸, Myrielle Dupont-Rouzeyrol¹

1 URE-Dengue et autres Arboviroses, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Réseau International Institut Pasteur, Noumea, New Caledonia, 2 URE-Entomologie Médicale, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Réseau International Institut Pasteur, Noumea, New Caledonia, 3 UMR 9220, ENTROPIE, Institut de Recherche pour le Développement, Noumea, New Caledonia, 4 Pôle des Maladies Infectieuses et Emergentes, Institut Louis Malardé, Papeete, Tahiti, 5 Ministry of Health, Suva, Fiji, 6 Ministry of Health, Nuku'alofa, Kingdom of Tonga, 7 URE-Epidémiologie des Maladies Infectieuses, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Réseau International Institut Pasteur, Noumea, New Caledonia, 8 UMR IRD 224-CNRS 5290-UM1-UM2, MIVEGEC, Institut de Recherche pour le Développement, Noumea, New Caledonia

* ecalvez@pasteur.nc



 OPEN ACCESS

Citation: Calvez E, Guillaumot L, Millet L, Marie J, Bossin H, Rama V, et al. (2016) Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. *PLoS Negl Trop Dis* 10(1): e0004374. doi:10.1371/journal.pntd.0004374

Editor: Michael J Turell, United States Army Medical Research Institute of Infectious Diseases, UNITED STATES

Received: August 25, 2015

Accepted: December 17, 2015

Published: January 22, 2016

Copyright: © 2016 Calvez et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All sequences files are available from the GenBank database (accession numbers KT313642 to KT313662).

Funding: This work was funded by the "Agence Française pour le Développement" through the Pacific Fund (CZT102701R/n°1162, CNC194801X/n°1272, UO0209CSOLD988/n°1439) and by the Government of New Caledonia (CS123007063/n°1162). Recipient for both grants: LG. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

Background

The Pacific region is an area unique in the world, composed of thousands of islands with differing climates and environments. The spreading and establishment of the mosquito *Aedes aegypti* in these islands might be linked to human migration. *Ae. aegypti* is the major vector of arboviruses (dengue, chikungunya and Zika viruses) in the region. The intense circulation of these viruses in the Pacific during the last decade led to an increase of vector control measures by local health authorities. The aim of this study is to analyze the genetic relationships among *Ae. aegypti* populations in this region.

Methodology/Principal Finding

We studied the genetic variability and population genetics of 270 *Ae. aegypti*, sampled from 9 locations in New Caledonia, Fiji, Tonga and French Polynesia by analyzing nine microsatellites and two mitochondrial DNA regions (CO1 and ND4). Microsatellite markers revealed heterogeneity in the genetic structure between the western, central and eastern Pacific island countries. The microsatellite markers indicate a statistically moderate differentiation ($F_{ST} = 0.136$; $P < 0.001$) in relation to island isolation. A high degree of mixed ancestry can be observed in the most important towns (e.g. Noumea, Suva and Papeete) compared with the most isolated islands (e.g. Ouvea and Vaitahu). Phylogenetic analysis indicated that most of samples are related to Asian and American specimens.

Conclusions/Significance

Our results suggest a link between human migrations in the Pacific region and the origin of *Ae. aegypti* populations. The genetic pattern observed might be linked to the island isolation and to the different environmental conditions or ecosystems.

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

Author Summary

Aedes aegypti is the major arbovirus vector in the Pacific region. The spread of this mosquito in the different islands seems to be linked to human activities at the beginning of the twentieth century. Since 2010, occurrence of arbovirus outbreaks increased in this region, with the co-circulation of dengue, chikungunya and Zika viruses. The lack of vaccines and treatments for these pathogens led the health authorities to implement vector control measures. In this study, we present the genetic structure and the phylogenetic data obtained from the analysis of 270 *Ae. aegypti* collected in the Pacific region. The infestation of the islands seems to have American and Asian origins. The genetic structure of the vector populations indicates a differentiation of the mosquitoes between the western, central and eastern Pacific island countries and the specific island isolation context. This differentiation could be related to the different environmental conditions in each island country.

Introduction

Dengue fever is the most prevalent arthropod-borne viral infection of humans in tropical and subtropical countries [1]. In the Pacific region dengue virus outbreaks have occurred regularly since World War II [2]. However, over the last 5 years, the arbovirus outbreak profile in the Pacific region has changed. Indeed, the predominant circulation of a single dengue virus serotype moved on to the co-circulation of several dengue serotypes, along with the emergence of chikungunya and Zika viruses [2–5].

Dengue, chikungunya and Zika are arboviruses transmitted to humans through the bites of mosquitoes belonging to the genus *Aedes*, subgenus *Stegomyia*. In the Pacific region, many of these vectors are endemic species members of the “*scutellaris*” group, which, according to Belkin [6], could have derived from a single original species unintentionally introduced by the first Austronesian navigators 1500 to 2000 years ago. Owing to the very particular conditions of this region including strict isolation and ecological differences between the islands, it underwent a speciation process that led to the separation into different species [6, 7]. The introduction of *Aedes aegypti* was more recent, this mosquito was first recorded in the Pacific in the late nineteenth and the early twentieth century [8]. At present, the main *Aedes* vectors are *Ae. aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* along with nine other *Aedes* potential vectors [8]. *Ae. aegypti* is present in most Pacific islands with the exception of Futuna and very few other isolated islands. Recently introduced, from South Asia into Western Pacific islands, *Ae. albopictus* is now established as far as the Kingdom of Tonga. *Ae. polynesiensis* is widespread in the Eastern part of Oceania, including Fiji, Samoa Islands, French Polynesia, and Pitcairn [9]. Regarding this distribution, *Ae. aegypti* is the most widespread arbovirus vector in the Pacific with its presence reported in a majority of islands. This vector is a domestic species, closely associated with human migrations and transportation, commerce and urbanization [10, 11].

Pacific islands have experienced intense population migrations since the early nineteenth century with the first wave of European colonization [12]. During the twentieth century, this migration continued due to the implementation of various business and industrial activities. Thus many Asian workers immigrated into New Caledonia, French Polynesia [13] and Fiji. Population flows between the different Pacific islands have always been observed. This immigration was highly influenced by the vehicular languages used, being more intense between French speaking islands or between English speaking islands [12]. The introduction of *Ae. aegypti* in different islands over time might be linked to the Pacific history of human migrations. In French Polynesia it was first reported in 1924 only in Tahiti, and then in the

Marquesas Islands and in the Austral Islands sixty years later [14] but the first dengue epidemic was described in the middle of the nineteenth century [15] and might be due to *Ae. polynesiensis* which is a competent dengue vector [16, 17]. The first reported dengue epidemic in New Caledonia was described during the 1880s. This epidemic episode clearly demonstrates the presence of *Ae. aegypti*, as no other dengue vector had been reported at this date or later on [18]. In Fiji and Tonga, vector descriptions reported the presence of *Ae. aegypti* from the 1960s [6, 19], but dengue epidemics were recorded before the 1950s [2]. During World War II, the exchanges between America, Asia, Europe and the Pacific islands increased and may have impacted the distribution of *Ae. aegypti* [20].

Before 1960, no systematic control measures were implemented against *Ae. aegypti* in the South Pacific islands, except for international airports and harbors [19]. Due to an increase in the frequency and intensity of dengue outbreaks in the second half of the twentieth century, French Polynesia and New Caledonia health authorities adopted similar vector control strategies involving a combination of insecticide spraying and community awareness raising, aimed at source reduction. These strategies resulted in a decrease of the mosquito's presence in these island groups [21–23]. In 2003, in Fiji, the Ministry of Health decided to assess a larval source reduction campaign to reduce the density of the vector's breeding sites [24]. In Tonga the WHO decided in 1984 to increase the vector control effort at the international airport with insecticide applications and aircraft disinsection. These vector control operations did not result in elimination of *Ae. aegypti*, but they created different environments and exerted selective pressure.

To our knowledge, no studies have investigated the genetic diversity of *Ae. aegypti* in the Pacific region except in French Polynesia, using isoenzymes [11] and alloenzymes [25]. These studies demonstrated a link between the genetic diversity of *Ae. aegypti* populations, human population density, and vector control intensity. The recent arbovirus outbreak waves in the Pacific region highlight the need to improve our knowledge of *Ae. aegypti* in the Pacific. The aim of this study is to better understand the genetic structure and the phylogeny of this vector on the Pacific region. For this purpose, we analyzed a set of nine microsatellites and two mitochondrial DNA sequences on 270 *Ae. aegypti* specimens collected in nine locations distributed in four different Pacific Island Countries and Territories.

Materials and Methods

Description of the study area

The Pacific region is an area unique in the world, composed of thousands of islands, high volcanic and low coral (atoll) islands, separated by vast stretches of ocean. Our sample sites are situated between longitudes 165° East and 139° West, spanning a region approximately 6,000 km wide. Latitudes of our sample sites are between 9° South and 23° South. There are several tropical climatic zones across the South Pacific region with different environments according to the latitude, localization within the islands and human influence. In New Caledonia (NC), temperatures are generally mild although with marked seasons. Poindimie, situated in a rural area exposed to dominant winds, has heavy rainfall whereas Noumea, the main city, is much drier. Ouvea is a flat coral island with no water supply connection (Fig 1). In Fiji (FJ), both sample sites are situated in peri-urban settings. Lautoka, a city on the leeward side of the island, is situated in a dry area. Suva, on the windward side of the same island, has a wet climate. In Tonga (TG), Havelu is a suburb of Nuku'alofa, capital of the country, on the island of Tongatapu, a flat coral island, but, where piped water supply is available, unlike on Ouvea (Fig 1). In French Polynesia (FP) the climate is different between the islands. Tubuai is the southernmost sample site of all. It is a rural island with temperate climate and distinct seasons. Papeete is the main

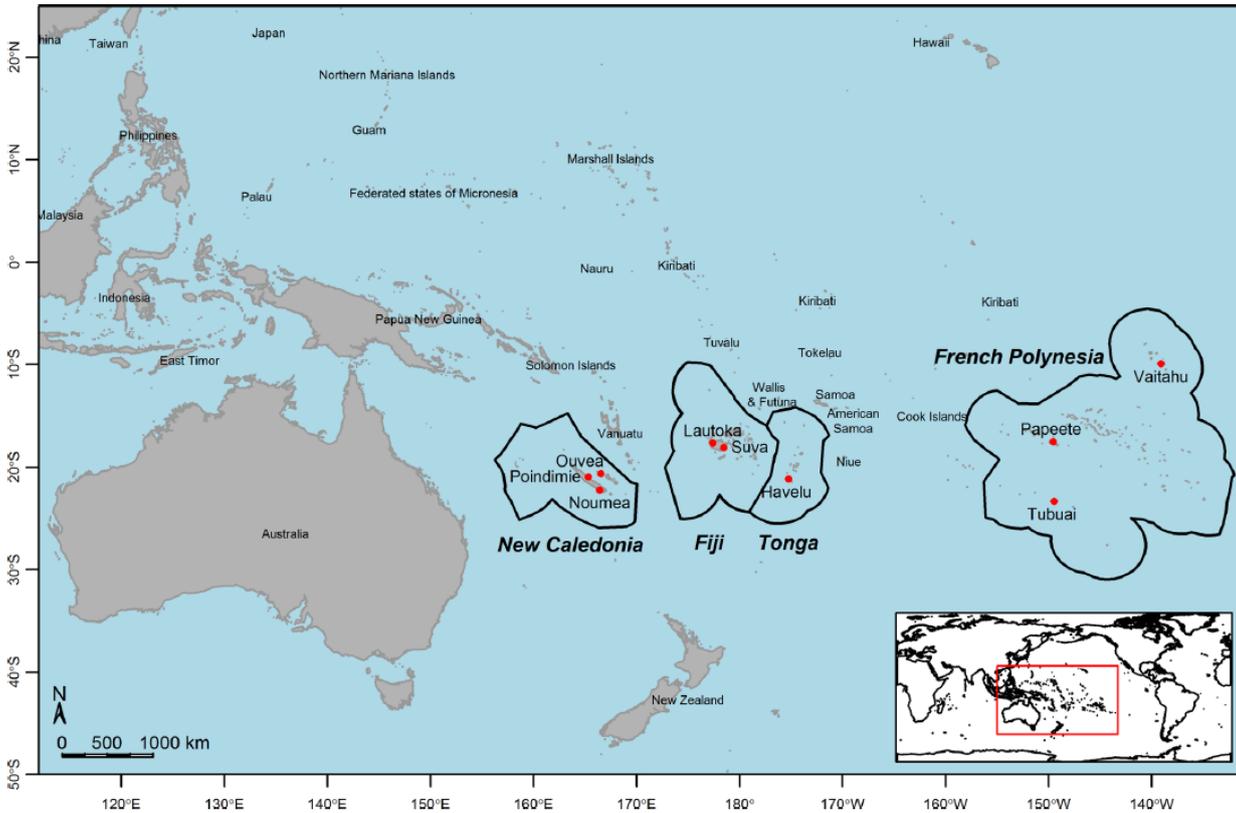


Fig 1. Pacific map locating *Ae. aegypti* sampling sites, 2013. The nine sample sites are represented by the red dots.

doi:10.1371/journal.pntd.0004374.g001

city on Tahiti, with a humid tropical maritime climate and high temperature with slight seasonal variations. The village of Vaitahu on the island of Tahuata in the Marquesas Islands, is the northernmost sample site with warm conditions year round (Fig 1).

Mosquito sampling

Mosquitoes were sampled at the immature stage (larvae and pupae) in the four island countries: New Caledonia (NC, 3 sites), French Polynesia (FP, 3 sites), Fiji (FJ, 2 sites) and Tonga (TG, 1 site) (Fig 1). For each sampling site a central spot was specified (Table 1). All potential

Table 1. *Ae aegypti* sampling sites: coordinates and date in Pacific islands, 2013.

Sample name	Locality	Country	Date	Latitude	Longitude
Poi-NC	Poindimie	New Caledonia	Jul. 2013	20°56'56" S	165°19'58" E
Nou-NC	Noumea	New Caledonia	Jul. 2013	22°13'57" S	166°25'25" E
Ouv-NC	Ouvea (Loyalty Islands)	New Caledonia	Jul. 2013	20°39'00" S	166°32'38" E
Lau-FJ	Lautoka (Viti Levu Island)	Fiji	Oct. 2013	17°39'33" S	177°24'17" E
Suv-FJ	Suva (Viti Levu Island)	Fiji	Oct. 2013	18°05'13" S	178°27'43" E
Hav-TG	Havelu (Nuku'alofa Tongatapu Island)	Tonga	Oct. 2013	21°09'03" S	175°13'12" W
Tub-FP	Mataura (Tubuai Australes Islands)	French Polynesia	Nov. 2013	23°20'49" S	149°28'43" W
Pap-FP	Papeete (Tahiti)	French Polynesia	Aug. 2013	17°31'38" S	149°33'00" W
Vai-FP	Vaitahu (Tahuata Marquesas Islands)	French Polynesia	Jan. 2013	9°56'14" S	139°06'29" W

Thirty mosquitoes were analyzed for each sampling site.

doi:10.1371/journal.pntd.0004374.t001

breeding sites within a 200 m radius were searched and mosquito larvae and pupae were collected (three to eleven containers were sampled per site). A first morphological identification was carried out. *Aedes*-like larvae were reared to adulthood for confirmation and the *Ae. aegypti* specimens collected. Thirty such specimens from each site were stored in 100% ethanol at -20°C for molecular analysis.

DNA extraction

Total DNA was extracted from adult mosquitoes using the DNeasy Blood & Tissue Kit (Qiagen) with a first step of mechanic lysis with 2.38 mm RNase/DNase free metal beads at 3000 rpm during 1 min and stored at -20°C.

Microsatellite analysis

Individual genotypes were scored for 11 previously published microsatellite loci: AC1, AC2, AC4, AG1, AG2, AG5, CT2 [26], A1, B2, B3 [27] and 145TAAA1 [28]. DNA was amplified in a Veriti 96 well Thermal Cycler (Applied Biosystems) using the GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega) as described in previous studies with slight modifications [26–28]. PCR products were analyzed using a Genetic Analyser 3130xl (Applied Biosystems). The results were genotyped with Peak Scanner software (Applied Biosystems) and double-checked (i. e., read by two independent people).

The deviation from Hardy-Weinberg equilibrium for each locus was tested with GenAlex 6.5 [29]. MicroChecker v2.2.3 [30] was used to calculate the probability of null allele occurrence in each locus within each population. The number of alleles and the estimated allele richness [31] were determined by FSTAT2.9.3 software [32]. The F_{IS} for each population for all loci were calculated using Genetix [33] and Arlequin v3.5.1.2 [34]. The Analysis of Molecular Variance (AMOVA) and the F_{ST} were computed using Arlequin v3.5.1.2 software [34]. The population genetic structure was determined using STRUCTURE software [35]. The Bayesian approach was chosen to infer the number of genetic clusters (K). We performed twenty independent runs, K from 1 to 15, with a burn-in period of 100,000 iterations and a total of 1,000,000 Markov Chain Monte Carlo iterations. The program Structure Harvester [36] was used to determine the most probable number of clusters by calculating the ΔK value [37]. The web server CLUMPAK was used to summarize and visualize the STRUCTURE results [38]. A Mantel test of correlation between geographical and genetic distance matrices was tested on IBD web server 3.23 [39] with 1,000 permutations.

MtDNA sequencing analysis

A mitochondrial DNA analysis was performed for two genes: CO1 [40] and ND4 [41]. The 270 DNA samples were amplified and sequenced with the primers previously published. Amplified fragments were purified with the MinElute PCR Purification kit (Qiagen) and sequenced using BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems) on a Genetic Analyser 3130xl (Applied Biosystems).

Sequences were analyzed using Staden Package (MRC Cambridge, England), nucleotide sequences were aligned with BioEdit [42]. The haplotype numbers were assigned in reference to the published *Ae. aegypti* sequence from Cambodia for CO1 (GenBank accession No. JQ926688) and for ND4 (GenBank accession No. JQ926722). The nucleotide diversity (π), the Tajima [43], the Fu and Li [44] and Fu [45] tests were computed by DNASP v5 [46] to determine the neutrality of the populations. The phylogenetic networks based on CO1 and ND4 sequences were constructed using a reduced-median algorithm [47] as implemented in the Network program [48]. MRBAYES 3.1.2 software [49] was used to make a CO1-ND4

combined analysis using sequences obtained in this study and retrieved from GenBank. Four Markov chains were run for 2,000,000 generations with a 25% burn-in. The tree was drawn with FigTree v1.4.2 (Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh). A Principle Coordinate Analysis (PCoA) of the mtDNA sequences was realized with DARwin software [50].

Results

Microsatellites analysis

Genetic variability of the samples. The 11 microsatellite loci allowed the identification of genotypes from the 270 *Ae. aegypti* adult mosquitoes sampled from the nine sites. The presence of a null allele was suspected at loci AG2 and 145TAAA1, which were therefore excluded from the analysis, leading to a dataset of 9 loci. A total of 57 alleles was observed for all samples (Table 2). The allelic richness was determined as 6 for the whole population ranging from 4 alleles for locus AC2 to 9 alleles for locus AG5. Regarding the allelic richness, no significant difference was observed among the different sampling sites or the different island countries.

Genetic structure of the samples

The AMOVA results indicated statistically moderate genetic differentiation for all samples ($F_{ST} = 0.136$; $P < 0.001$). F_{ST} among the studied sample sites ranged from 0.05 to 0.24 (Table 3). The highest F_{ST} value was obtained between Ouvea (NC) and Vaitahu (FP) with 0.24. The two lowest results were obtained between Suva (FJ) and Lautoka (FJ) on one hand, while between Poindimie (NC) and Noumea (NC) on the other hand with a score of 0.05. Globally the F_{ST} results for Vaitahu (FP) were higher than the others (ranging from 0.13 to 0.24). Moreover, statistically high differences were observed between the New Caledonia samples and the samples of central (FJ and TG) and eastern Pacific (FP). The results of the Mantel test demonstrated a significant correlation between the genetic differentiation and the geographical distance ($r = 0.6164$; $P < 0.001$) (Fig 2) for the Pacific samples analyzed.

The Bayesian analysis performed, with the Evanno *et al* method [37], revealed that the most likely number of clusters were $K = 2$, $K = 4$ (highest probability) and $K = 7$. These three clustering models were further analyzed. The two-cluster plot ($K = 2$) indicates a differentiation between the samples of New Caledonia (West Pacific) on one hand, Fiji, Tonga (Central Pacific) and French Polynesia (East Pacific) on the other hand (Fig 3). The four-cluster plot ($K = 4$) highlights a differentiation between the samples of Fiji and Tonga. The Suva samples seemed to be more differentiated than the Lautoka or Havelu samples. For French Polynesia the Vaitahu samples appeared to be a separate cluster and the Papeete individuals looked to be more diversified than the other FP samples. The seven-cluster plot ($K = 7$) confirmed the results obtained with the AMOVA: a high diversity for Suva and Papeete, mid-diversity for Noumea/Poindimie and Lautoka and isolation of Ouvea, Havelu, Tubuai and Vaitahu.

MtDNA phylogeny analysis

COI gene diversity. All 270 individuals were analyzed for their COI sequence. The 711 bp alignment revealed the presence of seven distinct haplotypes (Figs 4, 5 and S1 Table, S2 Table) and a nucleotide diversity of $\pi = 0.00177$. Haplotype I (frequency = 0.25) was present in all islands except in Poindimie (NC) and in Fiji. Haplotype II (frequency = 0.24) was present in New Caledonia, Fiji and Vaitahu (in FP). Haplotype III (frequency = 0.21) was found in eastern islands (FP). Haplotype IV (frequency 0.18) seemed to be exclusively present in NC. The haplotype V (frequency = 0.09) was present only in Fiji. Haplotype VI (frequency = 0.02) was

Table 2. Genetic variability parameters estimated for the 9 microsatellites markers analyzed for all mosquito samples.

	AC1			AC2			AC4			A1			AG1			AG5			CT2			B2			B3			All Loci			
	Nall	Rs	Fis	Nall	Rs	Fis	Nall	Rs	Fis	Nall	Rs	Fis	Nall	Rs	Fis																
Pch-NC	6	6	0.015	4	4	-0.055	4	4	-0.065	3	3	0.376	5	4.967	0.348	4	4	-0.08	2	2	0.223	5	4.967	0.173	3	3	-0.023	36	4	0.086	
Nou-NC	6	6	-0.011	4	4	-0.074	4	4	-0.076	3	3	0.095	5	5	0.038	5	5	-0.12	2	2	0.282	2	2	0.721	2	2	-0.324	33	3.7	0.045	
Ouv-NC	4	3.967	0.139	3	3	-0.236	5	4.966	-0.052	3	3	0.206	5	6.933	0.051	5	4.999	0.059	2	2	0.296	3	2.967	-0.065	3	3	-0.108	33	3.7	0.017	
Lau-F	6	5.967	0.01	3	3	0.033	2	2	-0.177	5	4.966	-0.099	4	4	0.025	7	6.999	0.132	4	4	3.967	-0.113	4	4	-0.09	3	3	-0.295	38	4.2	-0.055
Suv-F	5	4.969	-0.229	4	4	-0.117	2	2	-0.387	5	4.967	-0.031	4	4	0.146	6	5.966	-0.08	3	3	2.967	0.138	4	4	-0.386	4	4	-0.204	37	4.1	-0.128
Hav-T	6	5.933	0.158	4	3.967	0.119	2	2	0.141	5	4.966	-0.135	3	3	0.162	4	4	0.136	4	4	-0.152	4	3.966	-0.57	5	4.967	0.186	37	4.1	0.009	
Mah-FP	4	4	-0.182	4	3.967	0.056	2	2	0.102	4	3.999	0.037	4	4	0.03	5	5	-0.087	2	2	-0.057	3	3	0.127	3	3	-0.092	31	3.4	-0.013	
Pap-FP	4	4	0.165	4	3.967	0.157	2	2	-0.208	4	3.999	-0.038	4	4	0.107	5	5	0.113	3	3	-0.101	5	4.967	-0.218	4	3.967	-0.205	35	3.9	-0.004	
Vai-FP	4	4	0.075	3	3	0.238	2	2	-0.137	2	2	0.125	5	5.965	-0.188	5	5	0.045	4	4	3.933	-0.083	5	5	-0.072	2	2	0.065	32	3.6	0.029
New Caledonia	6	5.983	0.145	4	3.973	-0.106	5	4.333	-0.048	3	3	0.281	5	5.665	0.169	6	5.785	0.039	2	2	0.283	5	4.235	0.286	3	2.999	-0.103	39	4.3	0.103	
Fiji	6	5.5	-0.099	4	3.994	-0.024	2	2	-0.216	5	4.751	-0.081	4	3.994	0.1	8	6.995	0.055	5	5	3.997	0.033	5	4.878	-0.137	4	3.941	-0.249	43	4.8	-0.062
Tonga	6	5.933	0.158	4	3.967	0.119	2	2	0.141	5	4.966	-0.135	3	3	0.162	4	4	0.136	4	4	-0.152	4	3.966	-0.57	5	4.967	0.186	37	4.1	0.009	
French Polynesia	4	4	0.082	4	3.999	0.237	2	2	-0.094	5	4.113	0.17	5	5.114	0.059	7	6.023	0.143	4	4	3.333	0.074	5	4.791	-0.005	4	3.788	0.092	40	4.4	0.099
All samples	8	7.985	0.123	4	4	0.142	5	4.993	0.104	6	6	0.228	9	9	0.129	9	9	0.129	8	8	7.989	0.131	6	6	0.061	5	5	-0.021	57	6.3	0.12

Nall corresponds to the number of scored alleles; Rs represents the Allele Richness; Fis indicates the Inbreeding coefficient.

doi:10.1371/journal.pntd.0004374.t002

Table 3. Pairwise F_{ST} values for the nine populations studied and geographic distances between the sampling sites (in km).

	Poi-NC	Nou-NC	Ouv-NC	Lau-FJ	Suv-FJ	Hav-TG	Tub-FP	Pap-FP	Vai-FP
Poi-NC	-	182	130	1318	1412	2017	4643	4737	6050
Nou-NC	0.051	-	176	1255	1338	1899	4505	4618	5946
Ouv-NC	0.094	0.097	-	1188	1282	1894	4527	4613	5923
Lau-FJ	0.161	0.110	0.185	-	122	865	3499	3498	4763
Suv-FJ	0.122	0.094	0.148	0.051	-	744	3378	3383	4656
Hav-TG	0.156	0.145	0.168	0.136	0.064	-	2657	2720	4053
Tub-FP	0.187	0.176	0.154	0.112	0.110	0.175	-	647	1854
Pap-FP	0.108	0.117	0.149	0.087	0.095	0.141	0.083	-	1408
Vai-FP	0.162	0.172	0.238	0.166	0.148	0.198	0.188	0.130	-

Below diagonal, F_{ST} values, statistical significance was 0.05. Above diagonal, geographical distances (km) between the sample sites.

doi:10.1371/journal.pntd.0004374.t003

present only in Papeete (FP). And haplotype VII (frequency = 0.01) appeared to be exclusive to Suva (FJ). Haplotype II seemed to be the link between the different CO1 haplotypes in the Pacific region (Fig 5A). Haplotype VI appeared to derive from haplotype I with a single mutation. A link between haplotype VII and haplotypes III and V seemed to be present. Tajima's D statistic ($D = 1.02758$, $P > 0.10$), used to determine the departure from neutrality, was not significant but suggested a balancing selection or a decrease in population size due to the presence of multiple alleles, some at low and other at high frequencies. Fu and Li's statistics were positive but not significant ($F^* = 1.17029$, $P > 10$; $D^* = 0.95715$, $P > 0.10$) and confirmed the Tajima's D result.

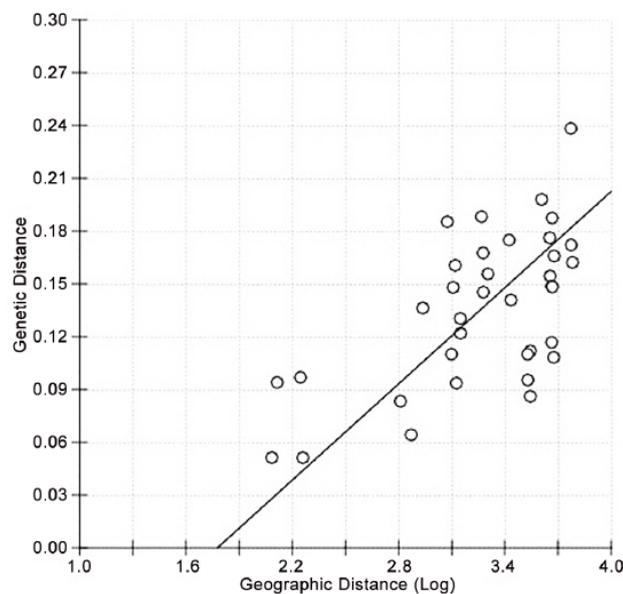


Fig 2. Correlation between the geographic and genetic distance matrices. The regression line corresponds to the standard major axis regression between pairwise genetic distances and logarithmic geographic distances with equation: $F_{st} = -0.1620 + 0.09113 \cdot \log(\text{geographic distance})$. The relationship was significant (Mantel test: $Z = 16.3746$; $r = 0.6164$; $P < 0.001$).

doi:10.1371/journal.pntd.0004374.g002

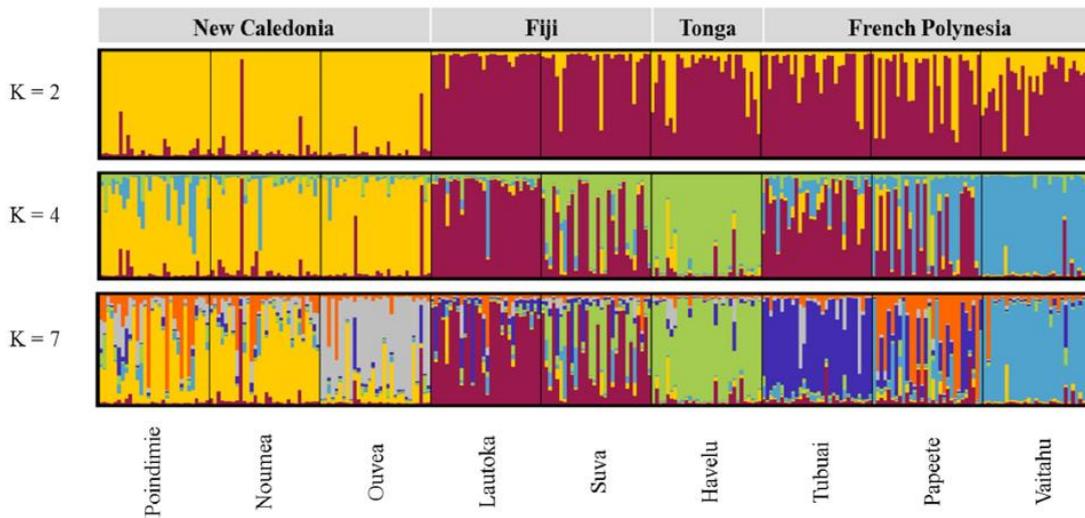


Fig 3. Model-based clustering of 270 *Ae. aegypti* individuals using STRUCTURE software. Each individual is represented by a single vertical line; sample sites are separated by a black line; the whole sample is divided into K colors representing the number of clusters assumed. The colors show the estimated individual proportions of cluster membership.

doi:10.1371/journal.pntd.0004374.g003

ND4 gene diversity. Partial ND4 sequence was analyzed for all individuals (Figs 4, 5 and S1 Table, S2 Table). The 320 bp alignment revealed the presence of three distinct haplotypes and a nucleotide diversity of $\pi = 0.00203$. Haplotype I (frequency = 0.59) was present in all Pacific samples. As for haplotype II (frequency = 0.22) the results demonstrated its presence only in central and eastern islands from Suva to Vaitahu. Haplotype III (frequency = 0.19) was present in the western islands from Poindimie (NC) to Suva (FJ). Haplotypes II and III seem to derive from haplotype I with only a single nucleotide difference (Fig 5B). The departure from neutrality, indicated by Tajima's D statistic, was not significant ($D = 1.131386, P > 0.10$). Fu and Li's statistics were positive but not significant either ($F^* = 0.99728, P > 0.10; D^* = 0.61853, P > 0.10$).

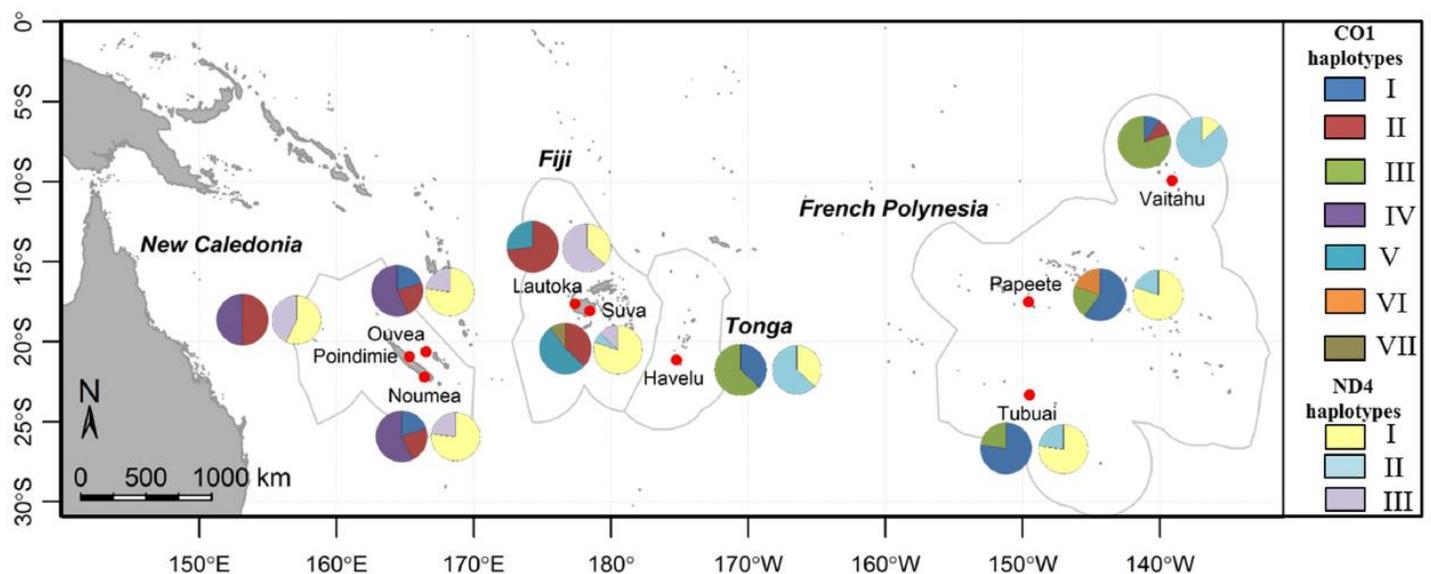


Fig 4. Representation of the MtDNA haplotype frequencies within the sample sites. The left circles indicate the CO1 haplotype frequencies and the right circles the ND4 haplotype frequencies. The arc length of each slice is proportional to the haplotype frequencies (as an example a semicircle represents 15 samples). Haplotype frequencies are indicated in S1 Table.

doi:10.1371/journal.pntd.0004374.g004

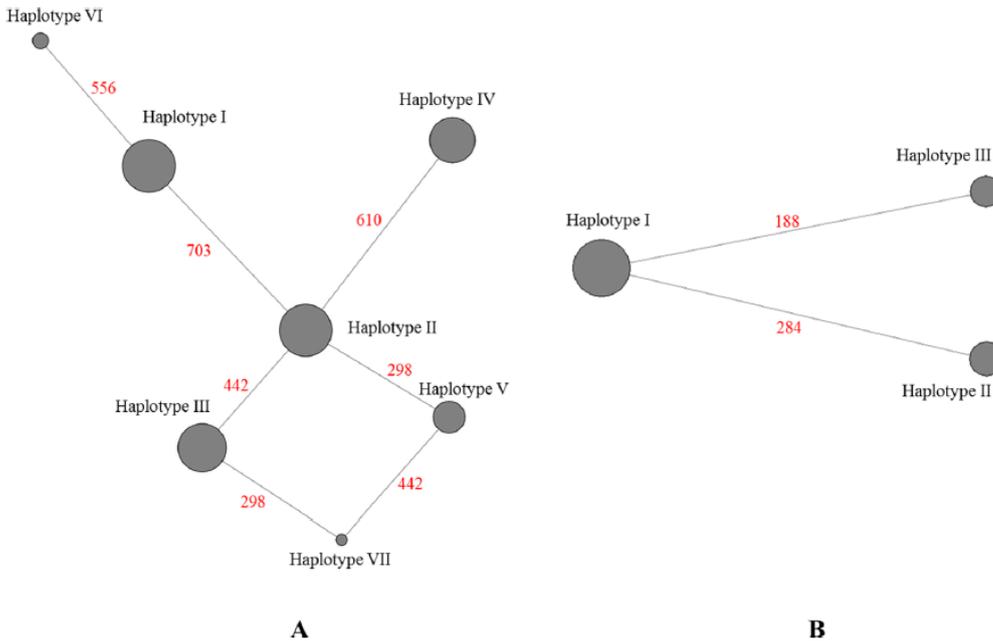


Fig 5. Median-joining network obtained with the haplotypes of all samples. A- Representation for the mtDNA CO1 sequences. B- Representation for mtDNA ND4 sequences. The diameters of grey circles represent the frequency of each haplotype for all individuals. The red number indicates the position of the mutation on the analyzed sequences.

doi:10.1371/journal.pntd.0004374.g005

Associated CO1-ND4 sequences analysis. The sequences of CO1 and ND4 were concatenated to perform a phylogenetic analysis with published mtDNA sequences from extra-Pacific *Ae. aegypti* specimens (Fig 6 and S3 Table). The phylogenetic tree obtained indicated the presence of a main combined haplotype in Pacific samples (CO1-I / ND4-I) originating from Asia. Specimens from the West Pacific (NC and FJ) were both linked to American mosquitoes and to Asian mosquitoes. A haplotype of Papeete-FP originated from Asia. Two haplotypes of Suva-FJ seemed to be linked to Australian specimens (CO1 mtDNA) and Asian specimens. The other samples principally of French Polynesia, Tonga and Suva-FJ were not clearly affiliated. The PCoA performed on associated CO1-ND4 sequences (S1 Fig) corroborated the results obtained. In fact, it underlined three origins: Asian, American and Australian.

Discussion

The spread of *Ae. aegypti* in the Pacific took decades [6, 14, 18, 19]. The presence of this vector contributed to an explosive arbovirus situation in the Pacific region since the year 2010. Pacific Island Countries and Territories tried to limit the importation of *Ae. aegypti* in new territories through the establishment of control measures at sea-ports and airports. These measures may have prevented the increase of mosquito populations, but no evidence of eradication of the vector was ever recorded as it was in South American or Mediterranean countries [40, 51, 52]

Our results indicate the presence of multiple clusters in the mosquito samples from the Pacific islands [40]. Our *Ae. aegypti* samples are linked to *Ae. aegypti* originating from the Americas, South-East Asia and Australia (Fig 6 and S1 Fig). The introduction of the Asian lineage in New Caledonia could be linked to i) whaling industry and the sandalwood commerce between China/Australia/Pacific (Fiji and New Caledonia) in the years 1800–1850 [53] and ii) the immigration of Asian workers to New Caledonia during the years 1900–1940 for the mining industry [54]. In French Polynesia the presence of the Asian lineage could be linked to a

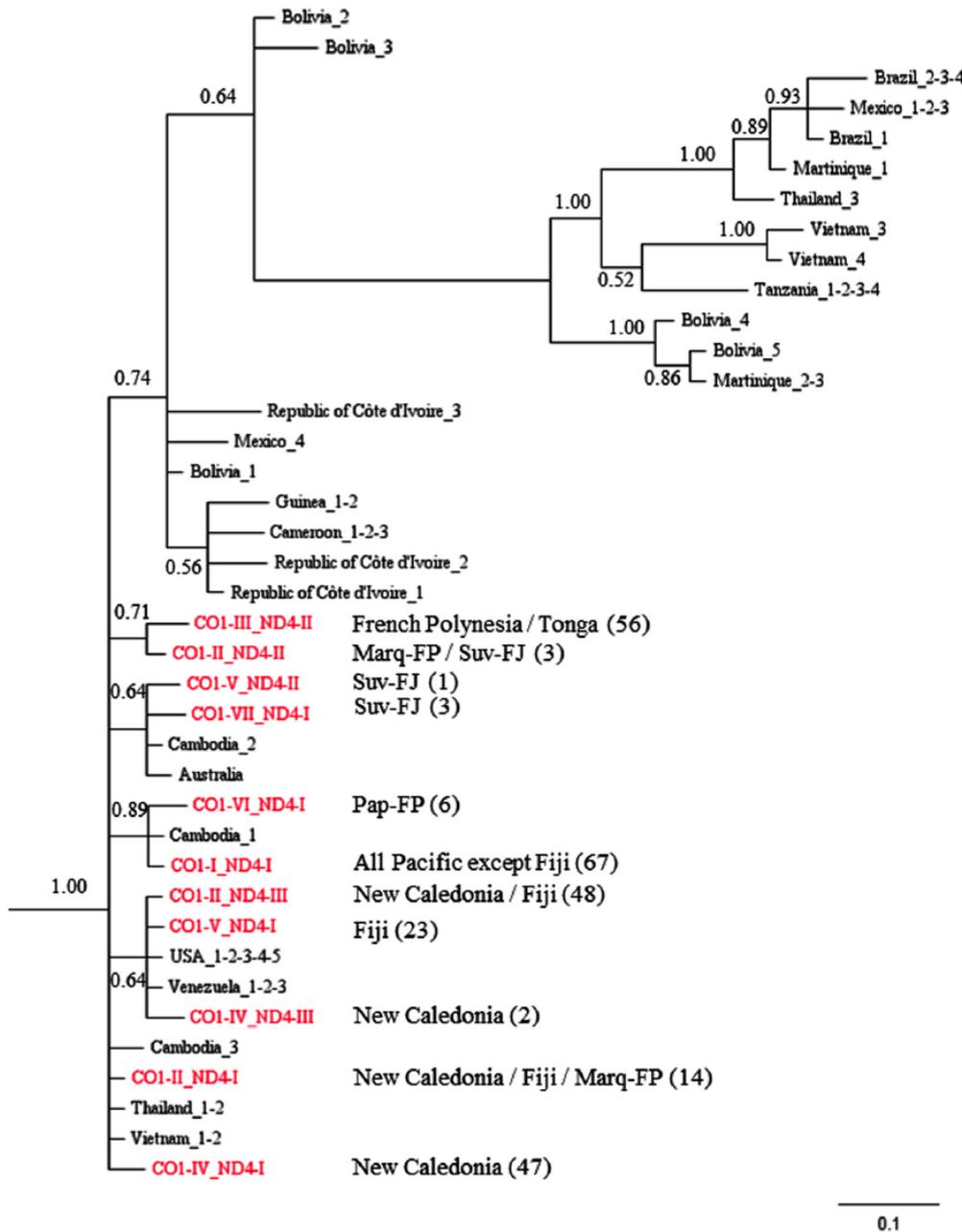


Fig 6. Phylogenetic tree obtained with a Bayesian inference of concatenated CO1 and ND4 sequence data. Numbers in parentheses indicate the number of samples belonging to this haplotype. For the Australian sample, only the CO1 sequence was available. Rooting was inferred from DNA sequences of *Anopheles pullus* and *Culex quinquefasciatus* but were not represented for clarity

doi:10.1371/journal.pntd.0004374.g006

substantial immigration of Chinese people, with three waves of immigration: the first one in 1865, then from 1907 to 1914 and lastly from 1921 to 1925 [13]. The presence of *Ae. aegypti* of the American origin in the Pacific could be associated with the whaling activity during the XIXth century, and to the presence of the US navy during World War II. From 1942 to 1945, New Caledonia was a support base and a key location for the US and Allied troops fighting in

the Pacific War. The NC human population doubled during this period, and a dramatic increase in trade and economic activity took place. Furthermore, between the years 1880 and 1910, most importations into New Caledonia came from Australia, the United States and France with at least one ship calling at Noumea every two days [55]. In Fiji, the link with the Australian cluster could be related to the sugar cane and sandalwood trade between the two countries [53]. The principal commercial exchanges of Fiji, where a large proportion of the current population is of Indian origin, were with India, South-East Asia, Australia, the United States, and Europe [55]. The same commerce pattern is valid for Tonga. It is important to note that although this *Ae. aegypti* migration through the Pacific started during the nineteenth century, it might still be a current phenomenon. *Ae. aegypti* was first recorded in New Caledonia's outer islands Mare and Lifou only in the 90's and on Isle of Pins in 2003 [56]. In French Polynesia, *Ae. aegypti* was first recorded in the Austral Islands in 1984 [14]. On another hand, *Ae. albopictus* is currently invading the Pacific region, it has been reported in Fiji in 1988 [57], in Tonga in 2011 [58] and in Vanuatu in 2012 [59] but not yet in French Polynesia and New Caledonia [8, 60].

The presence of mitochondrial pseudogenes was observed in Fiji mosquitoes (two samples for Suva and one for Lautoka) for CO1 mtDNA (Haplotype CO1-V and CO1-VII, Fig 5 and S2 Table) with difficult distinction between a C and a T nucleotide. The presence of pseudogenes has already been demonstrated in *Ae. aegypti* nuclear genome. This genetic phenomenon, called heteroplasmy, was highly prevalent in previous studies [61, 62]. Among all the populations studied, it is interesting to note that this heteroplasmy was found only in Fiji samples, where haplotype distribution from eastern and western Pacific overlap, thus suggesting that Fiji might act as a hub regarding *Ae. aegypti* diversity.

In general, the genetic diversity observed within the Pacific was lower than the genetic diversity observed in studies implemented in Africa [63] or South America [51]. Comparing these works to our context, a decrease in diversity was commonly observed in other islands and especially in Martinique [64] or Dominica [51] in the Caribbean. The genetic diversity seemed to be linked with the isolation of the island, and a low level of genetic exchanges between different islands was shown in French Polynesia [25, 64]. These results were confirmed by the presence of high correlation in the Mantel test (Fig 2) and suggest that even short range mosquitoes like *Ae. aegypti* can disperse readily within an island, each island having its own diversity.

Our results also indicate a clear structure differentiation between New Caledonia samples and the mosquitoes of Central (FJ and TG) and East Pacific (FP) (Fig 3). It is interesting to note, that mosquito specimens collected on the same island (ie: Noumea/Poindimie and Lautoka/Suva) are more homogeneous compared to samples from different islands (ie: Ouvea, Havelu, Tubuai and Vaitahu) which are more isolated. As a fact, in 1958, *Ae. aegypti* was restricted to Noumea and its suburbs [65]. The first mention of this species in Ouvea was reported in 1962 [6]. Whereas travel between Noumea and Poindimie is easy by road, Ouvea has remained quite isolated from the main island, which is corroborated by the *Ae. aegypti*-free status of the other Loyalty islands until the end of the 1990s [66, 67].

The mosquitoes of Noumea, Suva and Papeete were more genetically mixed. New Caledonia, French Polynesia and Fiji have the largest economies in the South Pacific region [68], thus underlining the importance of the sea-ports in this specific structure. Indeed, in New Caledonia, the Nickel industry represents 75% of the export of goods: mainly to Asia, Australia and Europe. For mosquitoes collected in central Pacific islands, a differentiation was observed between Lautoka (FJ) and Havelu (TG). The genetic link between Fiji and Tonga could be explained by the relative proximity of these two island countries and the volume of trade between them. Furthermore, the goods and services importation/exportation are promoted between English or French speaking countries [12].

Environmental conditions and ecosystems could have an impact on the structure of the *Ae. aegypti* population. Insecticides used both for agriculture and vector control can exert specific environmental constraints. Among the different island countries, insecticide use has been implemented in different ways. In New Caledonia, malathion (organophosphate) was used until the end of the 1980s when it was replaced by deltamethrin (pyrethroid). Malathion was reintroduced in 2005 due to the detection of mosquito resistance to pyrethroids and used until present day [69]. In French Polynesia, only malathion was used before the year 2000. Malathion was then used alternatively with pyrethroids. In Tonga, malathion was used until the end of the twentieth century and was then replaced by pyrethroids. These different vector control strategies could have an impact on the genetic structure of the *Ae. aegypti* population [64], (due to genetic bottlenecks) along with other environmental factors (climate, human influence. . .).

This is, to our knowledge, the first study carried out on a Pacific scale dealing with the genetic diversity and phylogeny of *Ae. aegypti*. The genetic specificity could have an impact on vector competence for the arbovirus especially for dengue virus [70–72]. In the Pacific region, the arboviral outbreaks impacted island countries at different times [4]. The genetic structure in the Pacific region indicates a western, central and eastern differentiation between the *Ae. aegypti* samples. Previous studies reported that the vector competence of *Ae. aegypti* for dengue virus is linked to the mosquito genetic factor and to the dengue virus strain [72, 73]. Thus characterization of vector competence for arboviruses in Pacific island mosquitoes is also an important issue deserving investigation.

Supporting Information

S1 Fig. Factorial Correspondence Analysis of combined CO1-ND4 genes. The colour indicates the geographical sample origin: blue represents American samples, green Asian samples, purple African samples, yellow Australian samples and red Pacific samples. Both axis represent 77.9% of the variability in the dataset.
(PDF)

S1 Table. Frequencies of CO1 and ND4 haplotypes for all sample sites and for each island. N Number of individual analyzed. Roman numerals indicate the name of CO1 or ND4 haplotypes.
(PDF)

S2 Table. MtDNA haplotype sequences for CO1 and ND4 across *Ae. aegypti* Pacific samples. N corresponds to the number of sample belonging to this haplotype.
(PDF)

S3 Table. MtDNA sequence informations of Pacific samples and reference sequences.
(PDF)

Acknowledgments

We thank Olivia O'Connor for her valuable suggestions during the project. We thank Subdivision Santé des Australes (Patricia Anania and Mathias Ellacott) and for assistance in mosquito sampling in Tubuai, the Heads of Units Drs Mike Kama, Eric Rafai (Fiji), Dr Reynold 'Ofanoa (Tonga) and all the Environmental Health Inspectors who participated in the field collection and laboratory rearing, particularly Mrs Kelera Oli and Alisi Tokailagi, Mr Waqa Tikoisuva and Kareleli Voi (Fiji) and Mr Uatesoni Tu'Angalu and Siaola Mahe (Tonga). We thank Mrs Sela 'Akolo Fa'u for revision of the manuscript. We are grateful to Secretariat of the Pacific

Community for the help in coordination and data access. We thank Nicolas Pocquet for scientific discussion on *Ae. aegypti*. We thank Evelyne Henriot, Yves Mermoud, José-Louis Barbançon for sharing information regarding the past colonization of New Caledonia. Sequencing and genotyping were performed on “La Plateforme du Vivant”, Noumea, New Caledonia.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MDR LG FMD HB. Performed the experiments: EC. Analyzed the data: EC LM MT. Contributed reagents/materials/analysis tools: EC MDR LG SK JM HB VR AF. Wrote the paper: EC MDR LG LM FMD.

References

- Weaver SC, Reisen WK. Present and future arboviral threats. *Antiviral Research*. 2010; 85(2):328–45. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2009.10.008> PMID: [19857523](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19857523/)
- Singh N, Kiedrzyński T, Lepers C, Benyon EK. Dengue in the Pacific—an update of the current situation. *Pacific health dialog*. 2005; 12(2):111–9. Epub 2008/01/10. PMID: [18181502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18181502/).
- Cao-Lormeau V-M, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *The Lancet*. 384(9954):1571–2. [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(14\)61977-2](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(14)61977-2).
- Roth A MA, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, Guillaumot L, Souarès Y. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections—an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Euro Surveill*. 2014; 19(41):20929. PMID: [25345518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25345518/)
- Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014: *Emerg Infect Dis*. 2015 Feb; 21(2):381–2. doi: [10.3201/eid2102.141553](https://doi.org/10.3201/eid2102.141553) PMID: [25625687](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25625687/)
- Belkin JN. *The mosquitoes of the South Pacific: Diptera, Culicidae*. Berkeley, University of California Press 1962; Vol. 1.
- Rao NP, Rai KS. Inter and intraspecific variation in nuclear DNA content in *Aedes* mosquitoes. *Heredity*. 1987; 59(2):253–8.
- Guillaumot L. Arboviruses and their vectors in the Pacific—status report. *Pacific health dialog*. 2005; 12(2):45–52. PMID: [18181493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18181493/).
- Horwood P, Bande G, Dajina R, Guillaumot L, Aaskov J, Pavlin B. The threat of chikungunya in Oceania. *Western Pac Surveill Response J*. 2013; 4(2):8–10. doi: [10.5365/WPSAR.2013.4.2.003](https://doi.org/10.5365/WPSAR.2013.4.2.003) PMID: [24015365](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24015365/)
- Lounibos LP. Invasions by insect vectors of human disease. *Annual Review of Entomology*. 2002; 47(1):233–66. doi: [10.1146/annurev.ento.47.091201.145206](https://doi.org/10.1146/annurev.ento.47.091201.145206)
- Paupy C, Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population density. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2000; 62(2):217–24. PMID: [10813476](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10813476/).
- Rallu J-L. Tendances récentes des migrations dans le Pacifique Sud. In: *Espace, population, sociétés. Les populations du Pacifique—Populations of the Pacific*. 1994—2:201–12. doi: [10.3406/espos.1994.1640](https://doi.org/10.3406/espos.1994.1640)
- Rallu J-L. Démographie des territoires français d'Océanie. In: *Revue française d'histoire d'outre-mer. La France du Pacifique*. 1989; 76 (n°284–285, 3e et 4e trimestre 1989):45–62. doi: [10.3406/outre.1989.2742](https://doi.org/10.3406/outre.1989.2742)
- ORSTOM. *Atlas de Polynésie Française*. Editions de l'ORSTOM, Paris, France. 1993.
- Chungue E DX, Murgue B. Dengue in French Polynesia: Major features, surveillance, molecular epidemiology and current situation. *Pac Health Dialog*. 1998; 5:154–62.
- Carrington LB, Simmons CP. Human to Mosquito Transmission of Dengue Viruses. *Frontiers in Immunology*. 2014; 5:290. doi: [10.3389/fimmu.2014.00290](https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00290) PMID: [PMC4060056](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC4060056/).
- Rosen L, Rozeboom LE, Sweet BH, Sabin AB. The transmission of dengue by *Aedes polynesiensis* Marks. *Am J Trop Med Hyg*. 1954; 3(5):878–82. PMID: [13197723](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13197723/)
- Perry WJ. The mosquitoes and mosquito-borne diseases on New Caledonia, an historic account; 1885–1946. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 1950; 30(1):103–14, illust. PMID: [15401987](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15401987/).

19. Chow CY. *Aedes aegypti* in the Western Pacific Region. Bulletin of the World Health Organization. 1967; 36(4):544–6. PMID: [PMC2476414](#).
20. Kuno G. Research on dengue and dengue-like illness in East Asia and the Western Pacific during the First Half of the 20th century. Reviews in Medical Virology. 2007; 17(5):327–41. doi: [10.1002/mv.545](#) PMID: [WOS:000249457300004](#).
21. Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D'Ortenzio E, Thiberge JM, et al. Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). Vector Borne Zoonotic Dis. 2012; 12(12):1036–41. Epub 2012/11/22. doi: [10.1089/vbz.2011.0937](#) PMID: [23167500](#).
22. Lardeux F, Riviere F, Sechan Y, Loncke S. Control of the *Aedes* vectors of the dengue viruses and *Wuchereria bancrofti*: the French Polynesian experience. Ann Trop Med Parasitol. 2002; 96(2):S105–16.
23. Nhan TX, Claverie A, Roche C, Teissier A, Colleuil M, Baudet JM, et al. Chikungunya virus imported into French polynesia, 2014: Emerg Infect Dis. 2014 Oct; 20(10):1773–4. doi: [10.3201/eid2010.141060](#) PMID: [25271852](#)
24. Raju AK. Community Mobilization in *Aedes aegypti* Control Programme by Source Reduction in Peri-Urban District of Lautoka, Viti Levu, Fiji Islands. 2003; Dengue Bulletin(27:):149–55.
25. Failloux AB, Darius H, Pasteur N. Genetic differentiation of *Aedes aegypti*, the vector of dengue virus in French Polynesia. Journal of the American Mosquito Control Association. 1995; 11(4):457–62. PMID: [8825508](#).
26. Slotman M, Kelly N, Harrington C, Kitthawee S, Jones W, Scott T, et al. Polymorphic microsatellite markers for studies of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), the vector of dengue and yellow fever. Mol Ecol Notes. 2007; 7:168–71. doi: [10.1111/j.1471-8286.2006.01533.x](#)
27. Brown JE, McBride CS, Johnson P, Ritchie S, Paupy C, Bossin H, et al. Worldwide patterns of genetic differentiation imply multiple 'domestications' of *Aedes aegypti*, a major vector of human diseases. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences. 2011; 278(1717):2446–54. doi: [10.1098/rspb.2010.2469](#) PMID: [21227970](#)
28. Lovin DD, Washington KO, deBruyn B, Hemme RR, Mori A, Epstein SR, et al. Genome-based polymorphic microsatellite development and validation in the mosquito *Aedes aegypti* and application to population genetics in Haiti. BMC Genomics. 2009; 10(590):1471–2164.
29. Peakall R, Smouse PE. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. Bioinformatics. 2012; 28(19):2537–9. doi: [10.1093/bioinformatics/bts460](#) PMID: [PMC3463245](#).
30. Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. Molecular Ecology Notes. 2004; 4(3):535–8. doi: [10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x](#)
31. El Mousadik A, Petit RJ. High level of genetic differentiation for allelic richness among populations of the argan tree [*Argania spinosa* (L.) Skeels] endemic to Morocco. Theoret Appl Genetics. 1996; 92(7):832–9. doi: [10.1007/bf00221895](#)
32. Goudet J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. Journal of Heredity. 1995; 86(6):485–6.
33. Belkhir K BP, Chikhi L, Raufaste N and Bonhomme F. (1996–2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
34. Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. Evolutionary Bioinformatics Online. 2005; 1:47–50. PMID: [PMC2658868](#).
35. Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. Genetics. 2000; 155(2):945–59. PMID: [10835412](#)
36. Earl D, vonHoldt B. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genet Resour. 2012; 4(2):359–61. doi: [10.1007/s12686-011-9548-7](#)
37. Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. Molecular Ecology. 2005; 14(8):2611–20. doi: [10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x](#) PMID: [15969739](#)
38. Kopelman NM, Mayzel J, Jakobsson M, Rosenberg NA, Mayrose I. Clumpak: a program for identifying clustering modes and packaging population structure inferences across K. Mol Ecol Resour. 2015; 12(10):1755–0998.
39. Jensen JL, Bohonak A.J., and Kelley S.T. Isolation by distance, web service. BMC Genetics 6: 13 v323 <http://ibdwssdsuedu/> 2005. PMID: [15760479](#)

40. Paupy C, Le Goff G, Brengues C, Guerra M, Revollo J, Barja Simon Z, et al. Genetic structure and phylogeography of *Aedes aegypti*, the dengue and yellow-fever mosquito vector in Bolivia. *Infection, Genetics and Evolution*. 2012; 12(6):1260–9. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2012.04.012> PMID: [22522103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22522103/)
41. da Costa-da-Silva AL, Capurro ML, Bracco JE. Genetic lineages in the yellow fever mosquito *Aedes (Stegomyia) aegypti* (Diptera: Culicidae) from Peru. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2005; 100:539–44. PMID: [16302064](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16302064/)
42. Hall TA. BioEdit: A user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* 1999; 41:95–8.
43. Tajima F. The Effect of Change in Population Size on DNA Polymorphism. *Genetics*. 1989; 123(3):597–601. PMID: [PMC1203832](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/PMC1203832/).
44. Fu YX, Li WH. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*. 1993; 133(3):693–709. PMID: [8454210](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8454210/)
45. Fu YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1997; 147(2):915–25. PMID: [9335623](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9335623/)
46. Rozas J, Sanchez-DelBarrio JC, Messeguer X, Rozas R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics*. 2003; 19(18):2496–7. PMID: [14668244](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14668244/)
47. Bandelt HJ, Forster P, Rohl A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol Evol*. 1999; 16(1):37–48. PMID: [10331250](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10331250/)
48. Fluxus Technology Ltd 2004–2015 NETWORK 4.6.1.3. <http://www.fluxus-engineering.com/sharenethm>.
49. Ronquist F, Huelsenbeck JP. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 2003; 19(12):1572–4. PMID: [12912839](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12912839/)
50. Perrier X, Flori A., Bonnot F. Data analysis methods. Hamon P, Seguin M, Perrier X, Glaszmann J C Ed, Genetic diversity of cultivated tropical plants. 2003; Enfield, Science Publishers. Montpellier.: 43–76.
51. Monteiro FA, Schama R, Martins AJ, Gloria-Soria A, Brown JE, Powell JR. Genetic Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014; 8(9):e3167. doi: [10.1371/journal.pntd.0003167](https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003167) PMID: [25233218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25233218/)
52. Powell JR, Tabachnick WJ. History of domestication and spread of *Aedes aegypti*—a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013; 11:1–7.
53. Shineberg D. They came for Sandalwood. A study of the sandalwood trade in the South-West Pacific, 1830–1865. 1967.
54. IRD. Atlas de la Nouvelle-Calédonie IRD Éditions, Marseille, France. 2012.
55. Survey. NZDoLa. Atlas of the South Pacific. Wellington New Zealand Government Printing Office. 1986.
56. Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. IPNC—Rapport technique Année 2003 www.institutpasteur.nc/rapports-dactivites/2003.
57. Laille M, Fauran P, Rodhain F. [The presence of *Aedes (Stegomyia) albopictus* in the Fiji Islands]. *Bull Soc Pathol Exot*. 1990; 83(3):394–8. PMID: [2208470](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2208470/)
58. Guillaumot L, Ofanoa R, Swillen L, Singh N, Bossin HC, Schaffner F. Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in southwestern Pacific countries, with a first report from the Kingdom of Tonga. *Parasit Vectors*. 2012; 5(247):1756–3305.
59. Guillaumot L. Entomological survey on Efate—Vanuatu to assess the statut of the mosquito *Aedes albopictus*. 2013; Doc. n°41/2013-IPNC-URE-EM/LG/DG, 7th of February 2013.
60. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections—an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Euro Surveill*. 2014; 19(41):20929. PMID: [25345518](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25345518/)
61. Hlaing T, Tun-Lin W, Somboon P, Socheat D, Setha T, Min S, et al. Mitochondrial pseudogenes in the nuclear genome of *Aedes aegypti* mosquitoes: implications for past and future population genetic studies. *BMC Genetics*. 2009; 10(1):11. doi: [10.1186/1471-2156-10-11](https://doi.org/10.1186/1471-2156-10-11)
62. Paduan Kdos S, Ribolla PE. Mitochondrial DNA polymorphism and heteroplasmy in populations of *Aedes aegypti* in Brazil. *J Med Entomol*. 2008; 45(1):59–67. PMID: [18283943](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18283943/)
63. Paupy C, Brengues C, Ndiath O, Toty C, Hervé J-P, Simard F. Morphological and genetic variability within *Aedes aegypti* in Niakhar, Senegal. *Infection, Genetics and Evolution*. 2010; 10(4):473–80. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2010.03.001> PMID: [20223297](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20223297/)
64. Marcombe S, Paris M, Paupy C, Binguier C, Yebakima A, Chandre F, et al. Insecticide-driven patterns of genetic variation in the dengue vector *Aedes aegypti* in Martinique Island. *PLoS One*. 2013; 8(10).

65. Rageau J. La répartition géographique des moustiques en Nouvelle-Calédonie et dépendances. CPS. 1958; Document technique n°117.
66. Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. IPNC—Rapport technique Année 2003 www.institutpasteur.nc/rapports-dactivites/1996.
67. Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. IPNC—Rapport technique Année 2003 www.institutpasteur.nc/rapports-dactivites/1999.
68. ISEE. Bilan économique et social 2014—Echanges extérieurs Institut de la Statistique et des Etudes Economiques Nouvelle-Calédonie. 2014.
69. Huerre M, Camprasse MA, Laille M. Problèmes posés par les épidémies de dengue. L'exemple des foyers d'Océanie. Situation mondiale actuelle et dans les DOM-TOM. Médecine et Maladies Infectieuses. 1995;25, Supplement 7(0):688–95. [http://dx.doi.org/10.1016/S0399-077X\(05\)80880-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0399-077X(05)80880-7).
70. Lambrechts L, Chevillon C, Albright RG, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, Jarman RG, et al. Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. BMC Evol Biol. 2009; 9(160):1471–2148.
71. Failloux AB, Vazeille M, Rodhain F. Geographic genetic variation in populations of the dengue virus vector *Aedes aegypti*. J Mol Evol. 2002; 55(6):653–63. PMID: [12486524](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12486524/)
72. Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. Int J Environ Res Public Health. 2013; 10(1):249–77. doi: [10.3390/ijerph10010249](https://doi.org/10.3390/ijerph10010249) PMID: [23343982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23343982/)
73. Tabachnick W. Genetics of Insect Vector Competence for Arboviruses. In: Harris K, editor. Advances in Disease Vector Research. Advances in Disease Vector Research. 10: Springer New York; 1994. p. 93–108.

Annexe 4

RESEARCH

Open Access



Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia

Elodie Calvez¹, Laurent Guillaumot², Dominique Girault¹, Vaea Richard³, Olivia O'Connor¹, Tuterarii Paoaafaite³, Magali Teurlai⁴, Nicolas Pocquet², Van-Mai Cao-Lormeau³ and Myrielle Dupont-Rouzeyrol^{1*}

Abstract

Background: Dengue virus (DENV) is the arbovirus with the highest incidence in New Caledonia and in the South Pacific region. In 2012–2014, a major DENV-1 outbreak occurred in New Caledonia. The only known vector of DENV in New Caledonia is *Aedes aegypti* but no study has yet evaluated the competence of New Caledonia *Ae. aegypti* populations to transmit DENV. This study compared the ability of field-collected *Ae. aegypti* from different locations in New Caledonia to transmit the DENV-1 responsible for the 2012–2014 outbreak. This study also aimed to compare the New Caledonia results with the vector competence of *Ae. aegypti* from French Polynesia as these two French countries have close links, including arbovirus circulation.

Methods: Three wild *Ae. aegypti* populations were collected in New Caledonia and one in French Polynesia. Female mosquitoes were orally exposed to DENV-1 (10^6 FFU/ml). Mosquito bodies (thorax and abdomen), heads and saliva were analyzed to measure infection, dissemination, transmission rates and transmission efficiency, at 7, 14 and 21 days post-infection (dpi), respectively.

Results: DENV-1 infection rates were heterogeneous, but dissemination rates were high and homogenous among the three *Ae. aegypti* populations from New Caledonia. Despite this high DENV-1 dissemination rate, the transmission rate, and therefore the transmission efficiency, observed were low. *Aedes aegypti* population from New Caledonia was less susceptible to infection and had lower ability to transmit DENV-1 than *Ae. aegypti* populations from French Polynesia.

Conclusion: This study suggests that even if susceptible to infection, the New Caledonian *Ae. aegypti* populations were moderately competent vectors for DENV-1 strain from the 2012–2014 outbreak. These results strongly suggest that other factors might have contributed to the spread of this DENV-1 strain in New Caledonia and in the Pacific region.

Keywords: Dengue virus (DENV), *Aedes aegypti*, New Caledonia, Pacific region, Vector competence

Background

Dengue fever is one of the most prevalent human vector-borne diseases in tropical and subtropical countries. A recent study estimates that 390 million dengue fever infections occur every year worldwide [1]. Dengue virus (DENV) is a single-stranded, positive-sense RNA virus of the genus *Flavivirus*, separated in four serotypes (DENV-1 to DENV-4) themselves divided into

genotypes [2]. Infection by one of these serotypes confers specific and prolonged immunity against that serotype only [3]. DENV is transmitted to humans through the bite of mosquitoes of the genus *Aedes*, subgenus *Stegomyia*.

Unlike countries in south-east Asia and Latin America where dengue is hyperendemic, dengue in the Pacific region is characterized by intermittent epidemics of varying severity. During the second half of the twentieth century, dengue epidemics in the Pacific were mainly caused by a single serotype/genotype introduced from another, hyperendemic country. The epidemiology of dengue, however,

* Correspondence: mdupont@pasteur.nc

¹Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Dengue et autres Arboviroses, Réseau International Institut Pasteur, Nouméa, New Caledonia
Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

is heterogeneous; Small Pacific Island Countries and Territories (PICTs) are affected by DENV transmission for a few months only, while larger PICTs, like New Caledonia (NC) or French Polynesia (FP), may experience active circulation of a single serotype/genotype for several years until the emergence of a new epidemic viral strain [4–8].

In the Pacific region, known vectors of DENV are *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* and other local species [9]; *Ae. aegypti* is present throughout the region with the exception of a few isolated islands [10]. The introduction of *Ae. aegypti* in the Pacific is relatively recent, starting in the late nineteenth century [9]. Previous studies found differences in the genetic structure of Pacific populations of *Ae. aegypti* [11–13], with significant genetic differentiation between *Ae. aegypti* from NC compared to populations from other PICTs [13]. In NC, a lower genetic differentiation was observed between the mosquitoes from the main island (Nouméa and Poindimié sampling sites) and the mosquitoes from Ouvéa, a smaller, distant island [13]. This genetic differentiation may impact the vector capacity of the mosquito [14, 15]. Indeed, other studies showed that vector competence for DENV may be linked to the genetic background of the vector, such as genes related to the midgut escape barrier, notably the Quantitative Trait Loci (QTL) on the chromosome III [16–18].

New Caledonia is a French territory located in the tropical zone of the South Pacific Ocean. Dengue transmission in NC occurs mainly during the hot-and-rainy season (December to May). Epidemics have a 3–4 years cyclical pattern [4]. Dengue epidemics usually last 2 years, with two peaks occurring during the two consecutive hot-and-rainy seasons and few cases reported during the interepidemic cool season. Since World War II, NC has experienced 13 epidemics, caused by all four DENV serotypes. Most of these epidemics occurred after the introduction of a new viral strain either directly from south-east Asia or after emerging in another PICT [19]. When a new DENV serotype is introduced in NC, the previously circulating serotype is usually replaced within a few months. This pattern, however, is evolving. After causing severe epidemics in 2003–2004 and again in 2008–2009, DENV-1 unexpectedly re-emerged in 2012–2014 and caused the largest outbreak ever reported in NC [4]. The spatial distribution of dengue cases on the main island showed that the East coast was more affected with higher reported dengue incidence rates than the West coast [20]. *Aedes aegypti* is the only mosquito species recognized as being able to transmit DENV in NC but, to date, no study has evaluated its competence to transmit.

In the present study, we aimed to test the susceptibility of *Ae. aegypti* populations from different locations in NC to DENV. We collected three *Ae. aegypti* populations

based on DENV cases distribution in NC and performed vector competence assays with a DENV-1 strain isolated during the 2012–2014 outbreak. There are close economics and population exchanges between New Caledonia and French Polynesia and previous work highlighted similarities in arbovirus transmission between these two territories [21–23]. In the present study, we therefore compared the vector competence obtained for *Ae. aegypti* from Nouméa, the largest city in New Caledonia, with the vector competence of *Ae. aegypti* from Papeete, the largest city in French Polynesia.

Methods

Mosquitoes

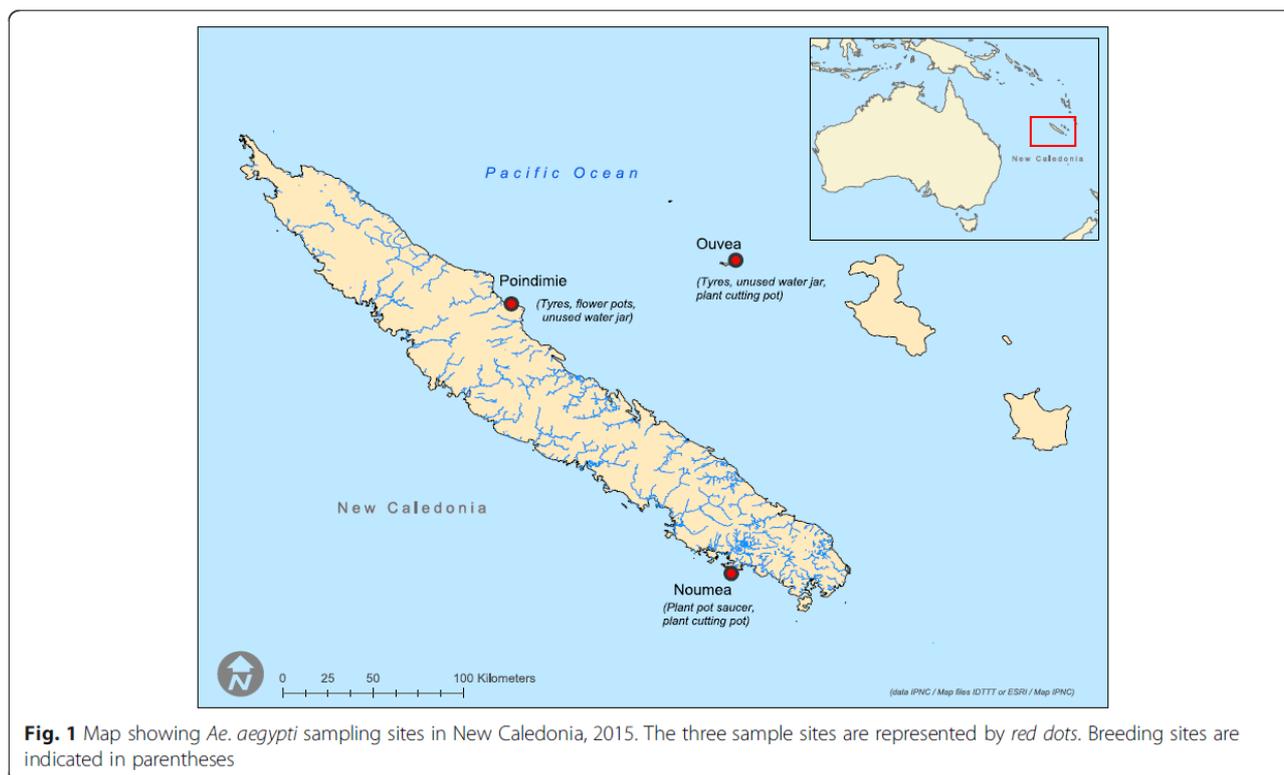
Mosquitoes were sampled at immature stages (larvae and pupae) in three sites in New Caledonia (Nouméa, Poindimié and Ouvéa; Fig. 1) [13] and in one site in French Polynesia (Papeete, Tahiti Island). Larvae and pupae were reared to adult forms which were maintained at 28 °C and 80% humidity, a 12:12 h light-dark cycle and fed with a 10% sucrose solution. Females were blood-fed several times with guinea pig blood to obtain F1-generation eggs. For all infection assays, F1-eggs were hatched and adults were maintained as described above.

Viral strain

The viral strain used in this study was a DENV-1 genotype I isolated from a patient in New Caledonia in 2014 (GenBank KY553285). The virus stock was obtained after five passages of 5 days incubation at 28 °C on *Ae. albopictus* C6/36 cells in Leibovitz L15 medium (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS; Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK) and 10% of tryptose phosphate (Gibco BRL, Paisley, Scotland, UK). The titration of the viral stock was performed using immunofluorescent assays with the anti-dengue virus complex antibody, clone D3-2H2-9-21 (Millipore, Billerica, Massachusetts, USA) and the Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG secondary antibody (Life technologies, Eugene, Oregon, USA) and the results calculated in FFU/ml (Focus Forming Unit).

Mosquito oral infections

Five to seven day-old, never blood-fed F1-females were starved for 24 h before infection. They were allowed to take an infectious blood meal through an artificial system with pig intestine membrane stretched over the Hemotek system (Discovery Workshops, Accrington, UK), containing a mix (2:1) of rabbit washed erythrocytes and viral suspension supplemented with adenosine triphosphate (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, Missouri, USA) at 5 mM. The female mosquitoes were allowed access to the blood meal maintained at 37 °C for 20 min.



The average concentration of DENV-1 in blood meals was 10^6 FFU/ml. After blood-feeding, fully engorged females were transferred into new containers and maintained at 28 °C and 80% humidity with a 12:12 h light-dark cycle and ad libitum access to 10% sucrose.

Dissemination and transmission analyses

At 7, 14 and 21 days post-infection (dpi) for NC populations and at 21 dpi for the FP population from Papeete (FP-Papeete), 30 mosquito females (except for Nouméa and Papeete at 21 dpi with 25 and 17 mosquitoes, respectively) were randomly collected and cold-anesthetized. Legs and wings of each sampled mosquito were removed and the proboscis was inserted for 30 min into a filter tip ART (Thermo Scientific, San Diego, USA) containing 5 μ l of FBS for salivation. The 5 μ l harvested were added to 45 μ l of L-15 medium and preserved at -80 °C until analysis. The body and the head of each mosquito were placed in separate tubes and stored at -80 °C until use.

To determine infection and dissemination characteristic of the four mosquito populations, the head and the body of each mosquito were mechanically ground with ceramic beads (Roche, Auckland, New Zealand) in 350 μ l of L-15 medium supplemented with 5% FBS, 10% tryptose phosphate and antibiotics/antifungals (100 units/ml of penicillin, 0.1 mg/ml of streptomycin and 0.25 μ g/ml amphotericin B). Lysis was performed three times during

30 s at 3000 rpm and samples were then centrifuged at 5000 rpm for 5 min. For each sample, 140 μ l of supernatant were used for RNA extraction with the QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany). Viral detection was performed using real time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) by LightCycler 480 II (Roche, Auckland, New Zealand) and previously published primers and probe [24] and the SuperScript III One-Step RT-PCR System with Platinum Taq DNA Polymerase (Invitrogen, Carlsbad, California, USA).

To determine mosquitoes' transmission ability, saliva samples were inoculated onto *Ae. albopictus* C6/36 cells in 96-well plates and incubated at 28 °C for 5 days. DENV infective particles were detected was achieved by immunofluorescent assays as described above.

Data analysis

The infection rate (number of positive bodies divided by the total number of mosquitoes tested), dissemination rate (number of infected heads divided by the number of infected bodies), transmission rate (number of infected saliva divided by the number of infected heads) and transmission efficiency (number of infected saliva divided by the total number of mosquitoes tested) were calculated for each *Ae. aegypti* population at each dpi. Data were statistically compared using Chi-square test or Fisher's exact test using R software (v. 3.3.1 [25]), considering *P*-values > 0.05 as non-significant.

Results

Fluctuant infection rate in NC *Ae. aegypti* population

At 7 dpi (Fig. 2a, Additional file 1: Table S1), infection rates ranged from 33 to 53% for the three NC populations with no significant difference measured. From 14 dpi, infection rates decreased significantly in *Ae. aegypti* mosquitoes from Poindimié (Fisher’s exact test: $P = 0.0022$ at 14 dpi) and Nouméa (Fisher’s exact test: $P = 0.0006$ and 0.0463 at 14 and 21 dpi, respectively) compared to the Ouvéa population.

High dissemination but low transmission in NC *Ae. aegypti* populations

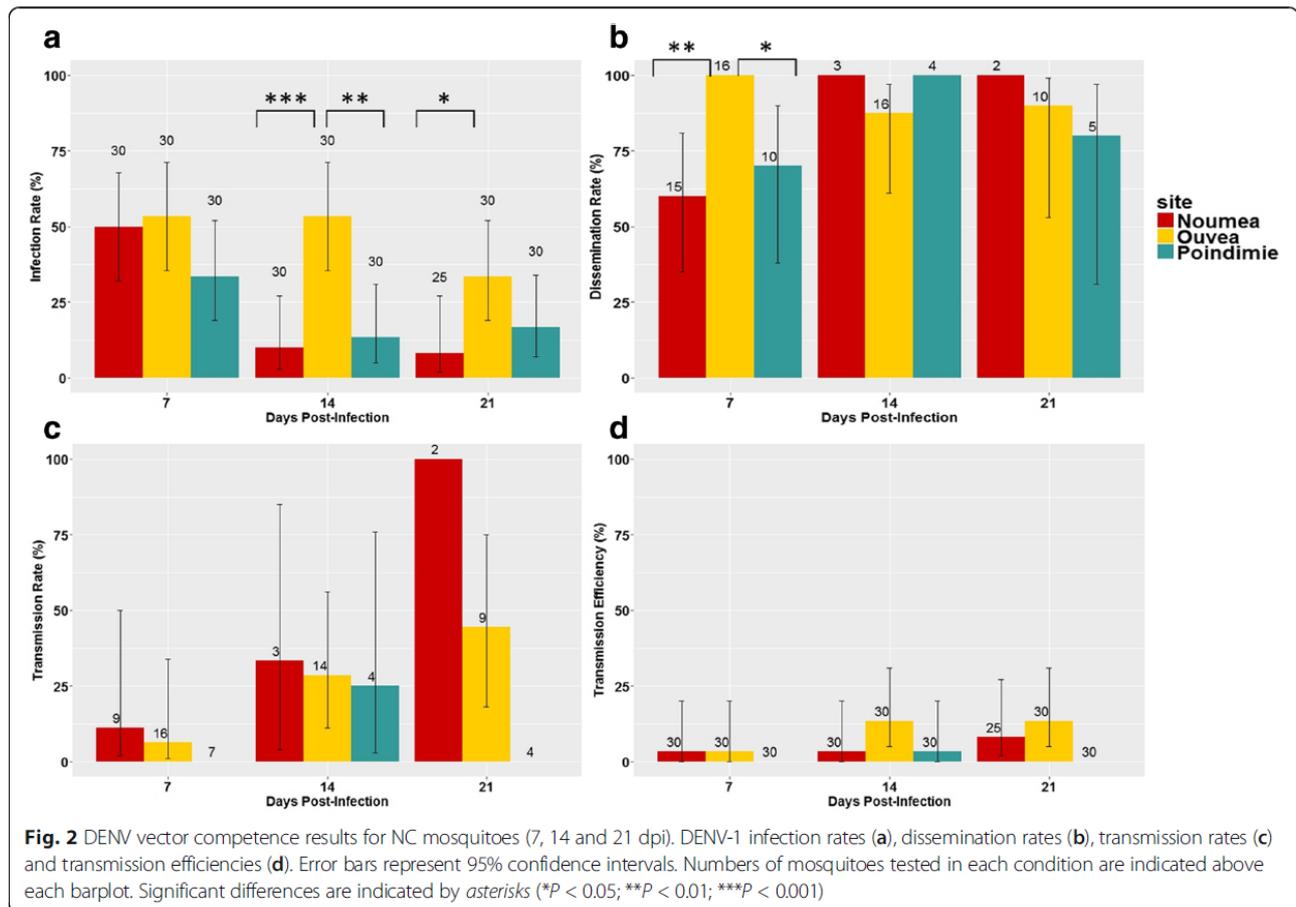
Dissemination rates ranged from 60 to 100% at 7dpi for all NC mosquitoes tested, with Ouvéa mosquitoes showing significantly higher dissemination rates when compared to Poindimié (Fisher’s exact test: $P = 0.046$) and Nouméa (Fisher’s exact test: $P = 0.007$) (Fig. 2b, Additional file 1: Table S1). Although the number of infected mosquitoes obtained for Nouméa and Poindimié were low after 14 dpi, the dissemination rate seems more homogenous among the three NC populations (80–100% of dissemination).

Infectious DENV-1 particles were detected in the saliva of tested *Ae. aegypti* mosquitoes from Nouméa

and Ouvéa as early as 7 dpi and at 14 dpi for Poindimié (Fig. 2c, Additional file 1: Table S1). The transmission efficiencies of the three NC populations ranged from 3 to 13% (Fig. 2d, Additional file 1: Table S1).

Lower competence of NC-Nouméa *Ae. aegypti* for DENV-1 compared to PF-Papeete *Ae. aegypti*

Because NC and FP are both French territories in the Pacific region, they have long and close ties, including arbovirus circulation. We therefore compared the vector competence of both *Ae. aegypti* collected in the two capital cities, (Nouméa and Papeete). Regarding FP-Papeete mosquitoes, 47% were infected at 21 dpi compared to 8% observed in the NC-Nouméa population (Fisher’s exact test: $P = 0.008$). In both Nouméa and Papeete populations, dissemination rate observed among the infected individuals reached 100% (Fig. 3, Additional file 1: Table S1). The DENV-1 transmission rate calculated exclusively among the mosquitoes in which the virus had disseminated was 75% ($n = 8$) for the FP-Papeete population. The transmission efficiency differed significantly between the FP-Papeete and NC-Nouméa populations, at 35% ($n = 17$) and 8% ($n = 25$), respectively (Fisher’s exact test: $P = 0.045$).



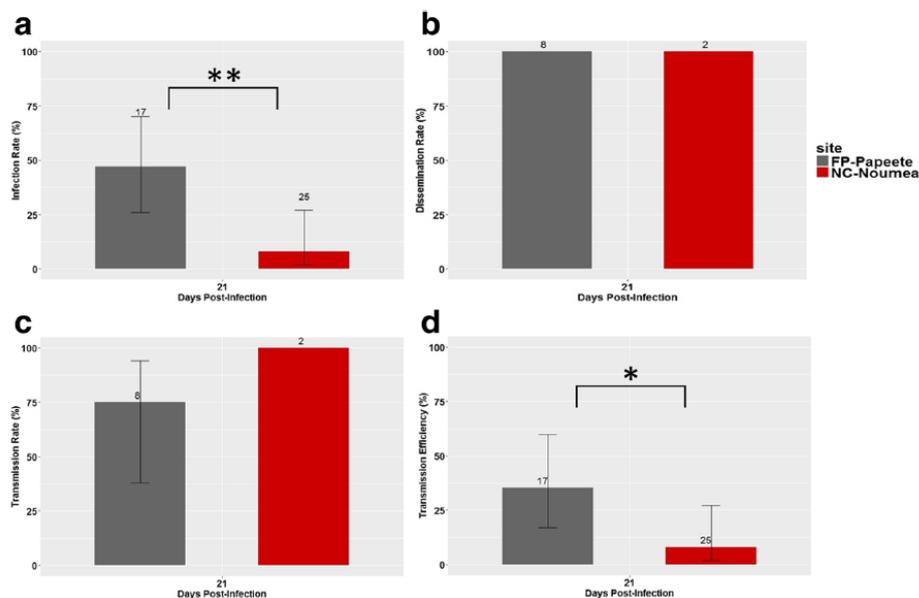


Fig. 3 Comparison between *Ae. aegypti* population from Nouméa (NC) and Papeete (FP) (21 dpi). Comparison of DENV-1 infection rates (a), dissemination rates (b), transmission rates (c) and transmission efficiencies (d). Error bars represent 95% confidence intervals. Numbers of mosquitoes tested are indicated above each barplot. Significant differences are indicated by asterisks (* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$)

Discussion

Recent studies have characterized the vector competence of several populations of *Ae. aegypti* from the Pacific region for arboviruses, especially chikungunya and Zika viruses [26–28]. The present study is the first to describe and compare the vector competence of three *Ae. aegypti* populations from NC for dengue virus serotype 1.

DENV-1 has been the major circulating serotype in the Pacific region over the past decade [4, 19]. The DENV-1 strain used in this study belongs to the Asian genotype and was isolated in 2014 during the largest dengue fever outbreak reported in NC [4]. This genotype, introduced in NC in 2012, subsequently spread to other PICTs (Vanuatu and FP) and is still circulating in NC and FP (O. O'Connor, personal communication). This ongoing circulation suggests efficient transmission of this DENV-1 strain by local vectors.

Our results confirm New Caledonian *Ae. aegypti* populations' ability to be infected by and subsequently to disseminate DENV-1. Infection rates differ significantly between the Ouvéa population and the Nouméa and Poindimié populations, related to a decrease overtime for the latter two. This decrease in susceptibility to infection in these mosquitoes suggests that either: 1) survival rate could be lower in the infected than in the non-infected mosquitoes; or 2) *Ae. aegypti* from Nouméa and Poindimié could be more resistant to infection by this DENV-1 strain than mosquitoes from Ouvéa. The three NC populations were collected from different localities, but their environments may have been

different [13]. The resident microbiota, which directly depends on the local ecosystem and lives in the breeding site, are known to influence the adult mosquito microbiome. Interestingly, the bacteria from that microbiome can modulate mosquitoes' viral susceptibility [29, 30]. Regulation of host immunity is one possible mechanism by which the microbiome could influence mosquito susceptibility to regulate of innate immune responses, especially via the RNA interference pathways and strongly alter the viral replication capacity [31, 32]. Moreover, the re-introduction of specific microbiome bacteria in the midgut of mosquitoes treated with antibiotics to remove their midgut flora has shown to decrease DENV infection rates, possibly through the activation of immune system factors [33]. One can therefore hypothesize that a microbiome-dependent up-regulation of NC mosquitoes' immune responses could be the reason for our observed decrease in infection rates. As the microbiota in the breeding site can impact the adult mosquito microbiome [34], differences in the ecosystem may influence the mosquitoes' innate immune response [33, 35, 36] and the consequent vector competence. The microbiota could play a role in the modulation of DENV infection through a possibly basal-level stimulation of the antiviral immune system of mosquitoes [37]. Several innate immune pathways are activated during arbovirus infection, especially the Toll pathway, the Jak-STAT pathway and the mosquito RNAi. All these pathways are known to control arbovirus infection and transmission in the mosquitoes [31, 37–41]. Thus, the up-regulation of these

pathways in time could explain the lower DENV infection rate observed in NC mosquitoes.

Despite reasonable numbers of mosquitoes collected at each dpi (25–30 mosquitoes), unexpectedly low infection rates unfortunately resulted in small sample sizes for the estimation of dissemination and transmission rates. Our study, however, provides interesting data on dissemination and transmission of DENV-1 in NC mosquitoes. Although infection rates were modest, the dissemination of the virus in infected mosquitoes was high in the three NC populations. The dissemination rates obtained among NC populations were high and relatively homogenous, except at 7 dpi for which the population from Ouvéa had a higher dissemination rate. Transmission efficiencies were also similar between the three populations and they were surprisingly low, as observed in previous studies [42–44].

New Caledonia and French Polynesia are two overseas territories administrated by France and, consequently, have long-standing ties and close exchanges (e.g. economics, populations and travel). Previous work has highlighted similarities in arbovirus transmission between these two territories and shown that the same DENV-1 strain circulates in both territories [4, 19, 22]. We compared the ability of the *Ae. aegypti* population from Nouméa, the capital city of New Caledonia, with the ability of *Ae. aegypti* from Papeete, the capital city of French Polynesia, to transmit this DENV-1 strain. The results clearly demonstrate a lower susceptibility to infection and lower transmission efficiency in NC mosquitoes.

Several factors may influence vector competence of *Ae. aegypti*, notably host viremia, the genetic background of the *Ae. aegypti* populations tested and/or the virulence of the virus strain used [14, 15, 45]. As shown in previous studies [46, 47], vector competence is a dose-response phenomenon. In this study, all mosquitoes were fed with a blood meal at the average concentration of 10^6 FFU/ml. As the same DENV-1 strain was used to infect these four mosquito populations, the vector's genetic characteristics are probably an important parameter in the observed difference in viral transmission. Variation in vector competence of *Ae. aegypti* has previously been observed between populations from different countries, but also within a country [42–44, 48]. The mosquito populations tested here were collected in the same sampling sites used in a recently published study, which showed genetic differences between the Ouvéa *Ae. aegypti* population and the Nouméa and Poindimié populations, and between the Nouméa and the Papeete population [13].

The known vector for dengue virus in New Caledonia is *Ae. aegypti*. In FP and the rest of the South Pacific region, however, other vectors are present, especially *Ae. polynesiensis* and *Ae. albopictus* [9, 10]. Although the

Ae. aegypti populations tested were susceptible to infection in the present study, they were unexpectedly low competence vectors for the strain of DENV-1 circulating since 2012. The prolonged circulation of DENV-1 in NC may therefore not be due solely to the vector-virus interaction, and highlights the importance of several other factors, such as vector density, mosquito lifespan, the number of susceptible individuals in the human population as well as frequency and intensity of host-vector contact. This work underscores the importance of maintaining both arboviruses and vector surveillance networks in the Pacific and the need to develop innovative and targeted vector control strategies in the region to prevent expansion of outbreaks [49, 50].

Conclusion

In the context of globalization of trade and travel, and as shown with chikungunya or the recent Zika outbreak that spread from the Pacific region to the Americas [51], improving our knowledge on Pacific region vectors and arboviruses' circulation is of major importance. This study describes, for the first time, the vector competence of several populations of *Ae. aegypti* from NC for the DENV-1 strain currently circulating in this country and the rest of the Pacific. Studies are now needed to determine the vector competence of NC *Ae. aegypti* for other serotypes/genotypes of DENV and for other arboviruses circulating in the Pacific, to guide risk assessment strategies in NC and the rest of the Pacific region.

Additional file

Additional file 1: Table S1. Infection, dissemination, transmission rates and transmission efficiency at 7, 14 and 21 days post-infection (dpi). (DOCX 13 kb)

Abbreviations

DENV: Dengue virus; dpi: day post-infection; FBS: Fetal bovine serum; FFU: Focus Forming Unit; FP: French Polynesia; NC: New Caledonia; PICTs: Pacific Island Countries and Territories; QTL: Quantitative Trait Loci; RT-PCR: Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction

Acknowledgments

We thank Morgane Pol and Sosiasi Kilama for mosquito sampling in New Caledonia. We thank Jérôme Marie and Mathias Ellacott for mosquito sampling in French Polynesia. We thank Cyrille Goarant and Mariko Matsui for the rabbit blood samples. We thank Julie Peter for technical support. We thank Julie Cagliero for discussions. We are very grateful to Arnaud Tarantola for the mapping and for critically revising the manuscript.

Funding

This work was funded by the "Agence Française pour le Développement" through the Pacific Fund (CZT102701R/n°1162, CNC194801X/n°1272, UO0209CSOLD988/n°1439) and by the Government of New Caledonia (CS123007063/n°1162). Recipient for both grants: LG.

Availability of data and materials

The data supporting the conclusions of this article are included within the article. The raw data used or analyzed during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request.

Authors' contributions

MDR, VMCL and LG designed the study; LG, NP and TP collected and reared the mosquitoes; EC, VR, DG and OOC performed the virus infection experiments; EC, DG, OOC and MDR performed the molecular and the cellular laboratory work; EC, OOC and MT performed the statistical analyses; EC, MDR and VMCL wrote the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interest

The authors declare that they have no competing interests.

Ethics approval and consent to participate

This study follows the New Caledonia ethic regulations regarding animal experiments.

Consent for publication

Not applicable.

Publisher's Note

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

Author details

¹Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Dengue et autres Arboviroses, Réseau International Institut Pasteur, Nouméa, New Caledonia. ²Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Entomologie Médicale, Réseau International Institut Pasteur, Nouméa, New Caledonia. ³Institut Louis Malardé, Papeete, French Polynesia. ⁴Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE-Epidémiologie des Maladies Infectieuses, Réseau International Institut Pasteur, Nouméa, New Caledonia.

Received: 14 March 2017 Accepted: 1 August 2017

Published online: 09 August 2017

References

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496:504–7.
- Henchal EA, Putnak JR. The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*. 1990;3:376–96.
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11:480–96.
- Dupont-Rouzeyrol M, Aubry M, O'Connor O, Roche C, Gourinat AC, Guigon A, et al. Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001–2013. *Virology*. 2014;11:61.
- Descloux E, Cao-Lormeau VM, Roche C, De Lamballerie X. Dengue 1 diversity and microevolution, French Polynesia 2001–2006: connection with epidemiology and clinics. *PLoS Negl Trop Dis*. 2009;3:0000493.
- A-Nuegonoopipat A, Berlioz-Arthaud A, Chow V, Endy T, Lowry K, Mai Le Q, et al. Sustained transmission of dengue virus type 1 in the Pacific due to repeated introductions of different Asian strains. *Virology*. 2004;329:505–12.
- Cao-Lormeau VM, Roche C, Musso D, Mallet HP, Dalipanda T, Dofai A, et al. Dengue virus type 3, South Pacific Islands, 2013. *Emerg Infect Diseases*. 2014;20:1034–6.
- Li DS, Liu W, Guigon A, Mostyn C, Grant R, Aaskov J. Rapid displacement of dengue virus type 1 by type 4, Pacific region, 2007–2009. *Emerg Infect Diseases*. 2010;16(1):123–5.
- Guillaumot L. Arboviruses and their vectors in the Pacific - status report. *Pacific Health Dialog*. 2005;12(2):45–52.
- Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituturaga S, Benyon E, et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Euro Surveill*. 2014;19(41):20929.
- Failloux AB, Darius H, Pasteur N. Genetic differentiation of *Aedes aegypti*, the vector of dengue virus in French Polynesia. *J Am Mosq Control Assoc*. 1995; 11(4):457–62.
- Paupy C, Vazeille-Falcoz M, Mousson L, Rodhain F, Failloux AB. *Aedes aegypti* in Tahiti and Moorea (French Polynesia): isoenzyme differentiation in the mosquito population according to human population density. *Am J Trop Med Hyg*. 2000;62(2):217–24.
- Calvez E, Guillaumot L, Millet L, Marie J, Bossin H, Rama V, et al. Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main *Arbovirus* vector in the Pacific. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10:1.
- Tabachnick W. Genetics of insect vector competence for arboviruses. In: Harris K, editor. *Advances in disease vector research*, vol. 10. New York: Springer; 1994. p. 93–108.
- Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int J Environ Res Public Health*. 2013;10(1):249–77.
- Bennett KE, Beaty BJ, Black WC. Selection of D253, an *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) strain with high oral susceptibility to dengue 2 virus and D2MEB, a strain with a midgut barrier to dengue 2 escape. *J Med Entomol*. 2005; 42(2):110–9.
- Bosio CF, Fulton RE, Salasek ML, Beaty BJ, Black WC. Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*. 2000;156(2):687–98.
- Bennett KE, Flick D, Fleming KH, Jochim R, Beaty BJ, Black WC. Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*. 2005;170(1):185–94.
- Singh N, Kiedrzyński T, Lepers C, Benyon EK. Dengue in the Pacific - an update of the current situation. *Pacific Health Dialog*. 2005;12(2):111–9.
- Teurlai M, Menkès CE, Cavarero V, Degallier N, Descloux E, Grangeon J-P, et al. Socio-economic and climate factors associated with dengue fever spatial heterogeneity: a worked example in New Caledonia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(12):e0004211.
- Cao-Lormeau VM. Tropical Islands as new hubs for emerging Arboviruses. *Emerg Infect Dis*. 2016; May;22(5):913–5. doi:10.3201/eid2205.150547.
- Cao-Lormeau V-M, Musso D. Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet*. 2014;384(9954):1571–2.
- Rallu J-L. Tendances récentes des migrations dans le Pacifique Sud. In: Espace, population, sociétés. Les population du Pacifique. 1994;2:201–12.
- Warrilow D, Northill JA, Pyke A, Smith GA. Single rapid TaqMan fluorogenic probe based PCR assay that detects all four dengue serotypes. *J Med Virol*. 2002;66(4):524–8.
- R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2016.
- Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D'Ortenzio E, Thiberge JM, et al. Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific region). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012;12(12):1036–41.
- Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau V-M. Vector competence of French Polynesian *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* for Zika virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(9):e0005024.
- Richard V, Paoaafaite T, Cao-Lormeau V-M. Vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* populations from French Polynesia for chikungunya virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(5):e0004694.
- Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, Deobagkar DN. *Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus. *PLoS One*. 2012;7(7):e40401.
- Ramirez JL, Short SM, Bahia AC, Saraiva RG, Dong Y, Kang S, et al. Chromobacterium Csp_P reduces malaria and dengue infection in vector mosquitoes and has entomopathogenic and in vitro anti-pathogen activities. *PLoS Pathog*. 2014;10(10):e1004398.
- Blair CD. Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol*. 2011;6(3):265–77.
- Sim S, Jupatanakul N, Dimopoulos G. Mosquito immunity against arboviruses. *Viruses*. 2014;6(11):4479–504.
- Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, et al. Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl Trop Dis*. 2012;6(3):6.
- Paupy C, Chanthan N, Vazeille M, Reynes JM, Rodhain F, et al. Variation over space and time of *Aedes aegypti* in Phnom Penh (Cambodia): genetic structure and oral susceptibility to a dengue virus. *Genet Res*. 2003;82(3):171–82.
- Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G. The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*. 2014;6(11):4294–313.
- Dennison NJ, Jupatanakul N, Dimopoulos G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Current Opinion in Insect Science*. 2014;3:6–13.
- Xi Z, Ramirez JL, Dimopoulos G. The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog*. 2008;4(7):e1000098.
- Barletta ABF, Nascimento-Silva MCL, Talyuli OAC, Oliveira JHM, Pereira LOR, Oliveira PL, et al. Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*. *Parasit Vectors*. 2017;10(1):103.

39. Blair CD, Olson KE. The role of RNA interference (RNAi) in arbovirus-vector interactions. *Viruses*. 2015;7(2):820–43.
40. Fragkoudis R, Attarzadeh-Yazdi G, Nash AA, Fazakerley JK, Kohl A. Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection. *J Gen Virol*. 2009;90(Pt 9):2061–72.
41. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2009;106(42):17841–6.
42. Diallo M, Ba Y, Faye O, Soumare M, Dia I, Sall A. Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in west Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2008;102:493–8.
43. Knox T, Kay B, Hall R, Ryan P. Enhanced vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Torres Strait compared with mainland Australia for dengue 2 and 4 viruses. *J Med Entomol*. 2003;40(6):950–6.
44. Vazeille M, Rosen L, Mouson L, Failloux A. Low oral susceptibility for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 2003;68:203–8.
45. Lambrechts L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol*. 2011;27(3):111–4.
46. Nguyen NM, Thi hue Kien D, Tuan TV, Quyen NTH, Tran CNB, Vo Thi L, et al. Host and viral features of human dengue cases shape the population of infected and infectious *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2013;110(22):9072–7.
47. Whitehorn J, Kien DTH, Nguyen NM, Nguyen HL, Kyrylos PP, Carrington LB, et al. Comparative susceptibility of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* to dengue virus infection after feeding on blood of viremic humans: implications for public health. *J Infect Dis*. 2015;212(8):1182–90.
48. Bennett KE, Olson KE, Muñoz ML, Fernandez-Salas I, Farfan-Ale JA, Higgs S, et al. 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*. 2002;67
49. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S7–16.
50. McGraw EA, O'Neill SL. Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(3):181–93.
51. Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika virus. *N Engl J Med*. 2016;374(16):1552–63.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Communications scientifiques

Publications scientifiques:

1. Dupont-Rouzeyrol M., Diancourt L., **Calvez E.**, *et al.* "Zika virus evolution in the edges of the Pacific Ocean." *In press* in Emerging Microbes & Infections.
2. **Calvez E.**, Guillaumot L., Girault D. *et al.* (2017). "Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) populations from New Caledonia." *Parasites and Vectors* 10(1):381.
3. **Calvez E.**, Guillaumot L., Millet L., *et al.* (2016). "Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the Pacific." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 10(1).
4. Dupont-Rouzeyrol M., O'Connor O., **Calvez E.**, *et al.* (2015). "Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014". *Emerging Infectious Diseases* 21(2):381-2.
5. Gourinat A-C., O'Connor O., **Calvez E.**, *et al.* (2015). "Detection of Zika virus in urine." *Emerging Infectious Diseases* 21(1): 84-86.

Publications scientifiques en préparation:

1. Pol M., Kilama S., Duperier S., Soupé-Gilbert ME, **Calvez E.**, *et al.* Introduction of *Anopheles bancroftii*, the First Malaria Vector identified in New Caledonia. En cours de soumission.
2. **Calvez E.**, O'Connor O., Pol M., *et al.* "*Aedes aegypti* from New Caledonia, Pacific region, transmit more efficiently Zika virus from Africa than Zika virus of the Asian/Pacific/American lineage." En cours de soumission.
3. Boyer S., **Calvez E.**, Chouin-Carneiro T., *et al.* "An overview on mosquito vectors of Zika virus." En cours de soumission dans le journal *Microbes and Infection*.
4. **Calvez E.**, Mousson L., Vazeille M., *et al.* "Zika virus outbreak in the Pacific, importance of the regional *Aedes* vectors." En preparation.

Communications scientifiques:

1. **Calvez E.** O'Connor O. Pol M., *et al.* Differential capacity of Zika virus transmission for *Aedes aegypti* from New Caledonia. **2nd International Meeting on Arbovirus and their vectors**, Glasgow (Écosse). Septembre 2017. *Poster*.
2. **Calvez E.** Evaluation de la capacité vectorielle de l'*Aedes aegypti* de Nouvelle-Calédonie pour différentes souches de virus Zika. **Doctoriales de l'Université de Nouvelle-Calédonie**, Nouméa (Nouvelle-Calédonie). Août 2017. *Communication orale*.
➤ [Prix de la meilleure présentation orale](#)
3. **Calvez E.**, Vazeille M., O'Connor O., *et al.* *Aedes aegypti* and *Aedes polynesiensis* from the Pacific region, two competent vectors for Zika virus. **Symposium scientifique du Réseau International des Instituts Pasteur**, Paris (France). Novembre 2016. *Poster*.
4. **Calvez E.**, O'Connor O., Girault D., *et al.* Dengue circulation in the south pacific region: importance of the regional vector *Aedes aegypti*. **International Congress for Tropical Medicine and Malaria**, Brisbane (Australie). Septembre 2016. *Communication orale*.
➤ [Early Career Scholar Grant](#)
5. **Calvez E.** Importance des vecteurs *Aedes* dans les épidémies d'arboviroses en Nouvelle-Calédonie et dans la région Pacifique. **Doctoriales de l'Université de Nouvelle-Calédonie**, Nouméa (Nouvelle-Calédonie). Août 2016. *Communication orale*.
6. **Calvez E.**, Guillaumot L., Millet L. *et al.* Genetic diversity and phylogeny of *Aedes aegypti*, the main arbovirus vector in the Pacific. **2^{ème} journée scientifique de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie**, Nouméa (Nouvelle-Calédonie). Novembre 2015. *Communication orale*.
7. **Calvez E.** Amélioration des connaissances sur les épidémies d'arboviroses en Nouvelle-Calédonie : importance du vecteur local *Aedes aegypti*. **Doctoriales de l'Université de Nouvelle-Calédonie**, Nouméa (Nouvelle-Calédonie). Août 2015. *Poster*.

