



Open Archive TOULOUSE Archive Ouverte (OATAO)

OATAO is an open access repository that collects the work of Toulouse researchers and makes it freely available over the web where possible.

This is an author-deposited version published in : <http://oatao.univ-toulouse.fr/Eprints> ID : 12199

To cite this version :

Legros, Vincent. *Etude dynamique et protéomique de l'interaction entre Aedes albopictus et les virus émergents de la dengue et du chikungunya*. Thèse d'exercice, Médecine vétérinaire, Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse - ENVT, 2014, 133 p.

Any correspondance concerning this service should be sent to the repository administrator: staff-oatao@inp-toulouse.fr.

ANNEE 2014 THESE : 2014 – TOU 3 – 4066

ETUDE DYNAMIQUE ET PROTEOMIQUE DE L'INTERACTION ENTRE *Aedes albopictus* ET LES ARBOVIRUS DE LA DENGUE ET DU CHIKUNGUNYA

THESE
pour obtenir le grade de
DOCTEUR VETERINAIRE

DIPLOME D'ETAT

*présentée et soutenue publiquement
devant l'Université Paul-Sabatier de Toulouse*

par

LEGROS Vincent

Né, le 12 avril 1988 à Guilherand (07)

Directeur de thèse : M. Stéphane BERTAGNOLI

JURY

PRESIDENT :

M. Christophe PASQUIER

Professeur à l'Université Paul-Sabatier de TOULOUSE

ASSESEURS :

M. Stéphane BERTAGNOLI

M. Romain VOLMER

Professeur à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Maître de Conférences à l'Ecole Nationale Vétérinaire de TOULOUSE

Ministère de l'Agriculture de l'Agroalimentaire et de la Forêt
ECOLE NATIONALE VETERINAIRE DE TOULOUSE

Directeur : M. Alain MILON

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

- M. **AUTEFAGE André**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **CLAUW Martine**, *Pharmacie-Toxicologie*
- M. **CONCORDET Didier**, *Mathématiques, Statistiques, Modélisation*
- M. **CORPET Denis**, *Science de l'Aliment et Technologies dans les Industries agro-alimentaires*
- M. **DELVERDIER Maxence**, *Anatomie Pathologique*
- M. **ENJALBERT Francis**, *Alimentation*
- M. **EUZEBY Jean**, *Pathologie générale, Microbiologie, Immunologie*
- M. **FRANC Michel**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- M. **MARTINEAU Guy**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- M. **PETIT Claude**, *Pharmacie et Toxicologie*
- M. **REGNIER Alain**, *Physiopathologie oculaire*
- M. **SAUTET Jean**, *Anatomie*
- M. **SHELCHER François**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*

PROFESSEURS 1° CLASSE

- M. **BERTHELOT Xavier**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **BOUSQUET-MELOU Alain**, *Physiologie et Thérapeutique*
- M. **DUCOS Alain**, *Zootecnie*
- M. **FOUCRAS Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **LEFEBVRE Hervé**, *Physiologie et Thérapeutique*

PROFESSEURS 2° CLASSE

- M. **BAILLY Jean-Denis**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BENARD Geneviève**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- M. **BERTAGNOLI Stéphane**, *Pathologie infectieuse*
- M. **BRUGERE Hubert**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **CHASTANT-MAILLARD Sylvie**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **DUCOS DE LAHITTE Jacques**, *Parasitologie et Maladies parasitaires*
- Mme **GAYRARD-TROY Véronique**, *Physiologie de la Reproduction, Endocrinologie*
- M. **GUERRE Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mme **HAGEN-PICARD Nicole**, *Pathologie de la Reproduction*
- M. **JACQUIET Philippe**, *Parasitologie et Maladies Parasitaires*
- M. **LIGNEREUX Yves**, *Anatomie*
- M. **MEYER Gilles**, *Pathologie des ruminants*
- M. **PICAVET Dominique**, *Pathologie infectieuse*
- M. **SANS Pierre**, *Productions animales*
- Mme **TRUMEL Catherine**, *Pathologie médicale des Equidés et Carnivores*

PROFESSEURS CERTIFIES DE L'ENSEIGNEMENT AGRICOLE

- Mme **MICHAUD Françoise**, *Professeur d'Anglais*
- M. **SEVERAC Benoît**, *Professeur d'Anglais*

MAITRES DE CONFERENCES HORS CLASSE

- M. **BERGONIER Dominique**, *Pathologie de la Reproduction*
- Mlle **BOULLIER Séverine**, *Immunologie générale et médicale*
- Mme **BOURGES-ABELLA Nathalie**, *Histologie, Anatomie pathologique*
- Mlle **DIQUELOU Armelle**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- M. **JOUGLAR Jean-Yves**, *Pathologie médicale du Bétail et des Animaux de Basse-cour*
- Mme **LETRON-RAYMOND Isabelle**, *Anatomie pathologique*
- M. **LYAZRHI Faouzi**, *Statistiques biologiques et Mathématiques*
- M. **MATHON Didier**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **PRIYMENKO Nathalie**, *Alimentation*

MAITRES DE CONFERENCES (classe normale)

- M. **ASIMUS Erik**, *Pathologie chirurgicale*
- Mme **BENNIS-BRET Lydie**, *Physique et Chimie biologiques et médicales*
- Mlle **BIBBAL Delphine**, *Hygiène et Industrie des Denrées alimentaires d'Origine animale*
- Mme **BOUCLAINVILLE-CAMUS Christelle**, *Biologie cellulaire et moléculaire*
- Mlle **CADIERGUES Marie-Christine**, *Dermatologie*
- M. **CONCHOU Fabrice**, *Imagerie médicale*
- M. **CORBIERE Fabien**, *Pathologie des ruminants*
- M. **CUEVAS RAMOS Gabriel**, *Chirurgie Equine*
- Mme **DANIELS Hélène**, *Microbiologie-Pathologie infectieuse*
- Mlle **DEVIERS Alexandra**, *Anatomie-Imagerie*
- M. **DOSSIN Olivier**, *Pathologie médicale des Equidés et des Carnivores*
- Mlle **FERRAN Aude**, *Physiologie*
- M. **GUERIN Jean-Luc**, *Elevage et Santé avicoles et cunicoles*
- M. **JAEG Jean-Philippe**, *Pharmacie et Toxicologie*
- Mlle **LACROUX Caroline**, *Anatomie Pathologique des animaux de rente*
- Mlle **LAVOUE Rachel**, *Médecine Interne*
- M. **LIENARD Emmanuel**, *Parasitologie et maladies parasitaires*
- M. **MAILLARD Renaud**, *Pathologie des Ruminants*
- Mme **MEYNAUD-COLLARD Patricia**, *Pathologie Chirurgicale*
- M. **MOGICATO Giovanni**, *Anatomie, Imagerie médicale*
- M. **NOUVEL Laurent**, *Pathologie de la reproduction (en disponibilité)*
- Mlle **PALIERNE Sophie**, *Chirurgie des animaux de compagnie*
- Mlle **PAUL Mathilde**, *Epidémiologie, gestion de la santé des élevages avicoles et porcins*
- Mme **PRADIER Sophie**, *Médecine interne des équidés*
- M. **RABOISSON Didier**, *Productions animales (ruminants)*
- Mme **TROEGELER-MEYNADIER Annabelle**, *Alimentation*
- M. **VOLMER Romain**, *Microbiologie et Infectiologie (disponibilité à cpt du 01/09/10)*
- M. **VERWAERDE Patrick**, *Anesthésie, Réanimation*
- Mme **WARET-SZKUTA Agnès**, *Production et pathologie porcine*

MAITRES DE CONFERENCES et AGENTS CONTRACTUELS

- M. **BOURRET Vincent**, *Microbiologie et infectiologie*
- M. **DAHAN Julien**, *Médecine Interne*
- Mme **FERNANDEZ Laura**, *Pathologie de la reproduction*

ASSISTANTS D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE CONTRACTUELS

- M. **DOUET Jean-Yves**, *Ophthalmologie*

Remerciements

A notre président de thèse,

Monsieur le Professeur Christophe Pasquier

Professeur à l'Université Toulouse III Paul Sabatier

Praticien hospitalier

Virologie

Qui nous a fait le grand honneur d'accepter la présidence de notre jury de thèse,

Hommages respectueux.

A notre jury de thèse,

Monsieur le Professeur Stéphane Bertagnoli,

Professeur de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Pathologie infectieuse

Qui nous a guidé et conseillé dans la rédaction de ce travail,

Qu'il trouve ici toute l'expression de notre reconnaissance et de notre profond respect.

Monsieur le Docteur Romain VOLMER,

Maître de conférences de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse,

Microbiologie et infectiologie

Qui nous a fait l'honneur de participer à notre jury de thèse,

Qu'il trouve ici nos sincères remerciements et toute notre reconnaissance.

Au docteur Valérie CHOUMET,

Chargée de recherche à l'Institut Pasteur de Paris,

Pour m'avoir proposé ce projet passionnant, son aide précieuse et sa disponibilité,

Très sincères remerciements.

A mes parents,

Dédicaces

A **papa** et **maman**, pour votre soutien, votre amour, pour l'exemple que vous êtes pour moi. Je suis chanceux de vous avoir comme parents. Merci.

A ma sœur, **Maryno**, pour nos « mercredi après-midi déguisements » de quand on était petits, mais surtout pour ta gentillesse, ton écoute et pour tes idées toujours un peu folles (comme reprendre une chèvrerie dans l'Allier...).

A mes grands frères, **David** et **Benoit**, pour les temps passés à jouer aux legos, à faire des maquettes et les soirées/nuits jeux de société qui ne sont pas prêtes de s'arrêter. Pour avoir été et être encore des grands frères trop cools.

A **Etienne**, **Claire** et **Magalie**, pour avoir su rendre mes frères et sœur heureux, c'est génial de vous avoir dans la famille et de partager ces bons moments.

A **mamie Juliette**, pour toutes tes chansons, ta force de caractère et pour être avec **papi Maurice** à l'origine d'une belle et grande famille, merci à tous les deux.

A **bonne maman**, pour tous les petits plats que toi seule sait cuisiner, pour toutes les recettes dont tu as bien voulu me livrer le secret et pour ton accueil toujours chaleureux à Grimbergen. Et à **bon papa**, pour tous le temps passé avec nous à jouer aux petits trains, pour les bonnes bouteilles de vin que tu n'hésites pas à déboucher en toutes occasions et pour m'avoir communiqué ta passion pour la science.

A mon neveu et mes nièces adorés, **Zélie**, **Simon**, **Chloé** et **Lison**, pour la joie que vous apportez à tous (même quand vous me réveillez le dimanche matin à 6 heures du mat'), j'ai hâte de vous voir grandir.

A ma vaste famille Legros et à mes cousins, oncles et tantes du plat pays qui est aussi le mien, c'est toujours un plaisir de se retrouver autour d'un bon repas.

A tous mes amis scouts, avec qui j'ai partagé tant de choses fabuleuses. A **Xav'**, l'une des personnes les plus futée que je connaisse malgré ce que je dis toujours, et **Guigui**, que j'aimerais avoir sur Paris pour gagner plus souvent au quizz culture G du Bréguet (ou **Guigui** et **Xav'**, je veux pas avoir de problèmes...), mes copains de toujours. Merci pour tous ces moments trop nombreux pour que je puisse en citer un seul. Je sais que je pourrais toujours compter sur vous et j'espère que vous savez que c'est réciproque. A **Claire**, pour ton état d'esprit toujours positif, parce que quand tu es là ça me permet de pas toujours être le plus mauvais perdant, pour les innombrables moments qu'on a partagé et que je n'oublierais pas. Pour avoir tenu 9 mois sans boire une goutte d'alcool (respect sérieux), je suis sûr que tu seras une super maman. A **Jojo**, ton amour du pastis, ton incroyable maîtrise du Molki et pour le papa génial que tu seras. A **Emma**, la petite fille des deux précédents, que j'ai hâte de rencontrer. Tu nous prêteras tes parents de temps en temps ? A **Clém'**, qui a réussi à démontrer qu'on peut être fun et prof de Français en même temps, pour ton engagement pour la cause féminine mais surtout pour ton amitié. Merci également pour le temps passé à la relecture de ma thèse. A **Nénésse**, pour ta bonne humeur, pour nous avoir présenté ta famille « **Marrahoui** » et ton pays d'origine (je parle de la Tunisie, pas de la Chine de Corée ou la Corée Chinoise je sais plus...), t'es une fille en or. A **Guill'**, l'expat' polyglotte, pour nous faire oublier que tu habites hors de France en venant nous revoir régulièrement. Pour faire de ta maison de vacances notre QG d'été où l'on passe toujours de super soirées et pour cette fameuse après-midi où nous ne sommes pas allés faire les courses. A **Claire**, pour ta phobie des souris qui t'oblige à passer un week-end dans le noir en cas de coupure de courant, ça me fait super plaisir de t'avoir retrouvé après s'être perdu de vue pendant quelques temps.

A mes anciens chefs pios, **Didi, Hélène, Gilloux, Rémi, Bérengère, Raph, Nico, Cédric**. Pour le temps considérable que vous nous avez accordé pour nous aider à réaliser de beaux projets. Pour l'exemple que vous avez été pour moi, merci de nous avoir aidé à grandir.

A mes potes de Grenoble, en particulier **Pépé, Alex, Nico, Momo** et **Jacqueline**. C'est en grande partie grâce à vous que je garde un bon souvenir de prépa. Pour nos soirées au jardin de ville à boire du rouge qui tache et à refaire le monde mais aussi pour celles passées à essayer de comprendre les cours de Donaire. Pour toutes les sorties de DS du samedi matin où l'on se retrouvait au subway (ou dans ce bar en face de Champo dont j'ai oublié le nom) pour essayer de faire passer la pilule. C'est génial de continuer à se revoir.

A **Miramar**, cette illustre et vieille bâtisse dont il se murmure que son premier occupant aurait été Claude Bourgelat. Pour ta robustesse malgré les nombreuses générations de miramariens qui ont su profiter de ta bienveillance, pour tes murs trop fins pour permettre une quelconque intimité, ton garage toujours remplis des plus improbables habits de boom, ton parquet ayant accueilli les championnats du monde de jeu du couteau en 1995 et qui en porte encore les stigmates, ton jardin qui permet de faire des barbeuks en toute saison, ta salle de bain qui ferait passer les sanitaires d'un camping biélorusse pour le Ritz de Paris et pour n'avoir jamais refusé d'ouvrir ta porte à un déchet de boom même après 5 heure du mat'. Longue vie à toi, on te laisse entre de bonnes mains.

A mes compères miramariens, pour ces 2 années passées en collocation au cours desquelles on a partagé bien plus que le loyer. A **Gozlan** le gitan, pour toutes ces booms où nous avons su donner ses lettres de noblesse à la danse sur tabouret, pour notre association dans le cabinet « Tony Barre et Johnny Chon, experts en loches », pour nos entraînements intensifs de PES, pour nos entraînements moins intensifs de Hand malgré les excellents résultats que nous avons toujours obtenus (je me souviens particulièrement de cette fois où l'équipe féminine a arraché sa première victoire en 6 mois sur le score sans appel de 4 à 5). A **Bastaro**, mon copain prolo de la colloc, pour tes muscles qui ne parviennent pas à faire oublier ta finesse légendaire « je vous dis pas qui, mais parmi vous, y'en a un qu'est cocu », pour ta passion pour la musique Jah Rastafari, pour ta 206 presque aussi âgée que Miramar, et surtout pour être quelqu'un sur qui on peut vraiment compter (oui oui vraiment). A **Fageosse**, qui aurait quand même pu nous prévenir qu'il emménageait avec **Jean-Claude le ténia**, pour nos soirées en mode « chasseurs », pour ton accent aveyronnais qui t'a toujours empêché de prononcer le mot « année » correctement, pour les grosses surprises que tu aimais nous laisser dans le fond des chiottes, pour notre trajet Nantes-Toulouse de nuit, la musique à fond à essayer d'éviter les arbres tombés sur l'autoroute. Parce que je sais que même à 5089,10 km tu n'oublies pas les copains. A **Lanjoyce**, pour tes conquêtes aussi nombreuses que tes charriotes, pour tes performances en tant que pilote de rallye qui n'ont d'égales celles dont tu nous as si souvent fait la démonstration au hand-ball, pour ta façon bien à toi de mettre en évidence ta bedaine avec des tenues de boom toujours soigneusement choisies, pour ne pas supporter de te faire spolier, pour tes nombreux exploits imaginaires et réels mais surtout parce que t'es un mec bien même quand t'as pas dormi. A la **Chotasse**, que je place ici malgré que je n'aie pas eu la chance de partager cette belle demeure avec lui. Pour ta connaissance sans faille du répertoire des Inconnus (bien qu'on ne puisse pas en dire autant de la bromato), pour savoir cuisiner absolument tout mais uniquement à partir de conserves. Parce que sous des airs innocents, t'es un putain de sécateur. Je suis content que ce soit toi qui aies pris ma place à Miramar.

Aux meufs de la **Chatterie**, pour avoir su apporter un peu de finesse dans notre groupe (quoique), pour avoir une colloc avec des murs mouvants après 4 grammes du mat' (désolé pour les réveils en pleine nuit...). A **Rouaeu**, qui était certainement un lama dans une autre vie, t'es vraiment une fille bien même si tu cherches à tous prix à le cacher. A **Mailys**, pour les spécialités

ramenées de son île lointaine (rhum-piment, rhum-ananas, rhum-coco, rhum-goyave... Ils font autre chose que de l'alcool là-bas ?). Pour avoir été une excellente compère de boom. A **Zoccat'**, à qui je n'aurais jamais dû prêter **Jérèm**, pour avoir formé un groupe de clinique de compèt', pour ton rire et autres vocalises qui traversent les murs, parce que t'es vraiment trop cool.

A **Myriam**, pour le bout de chemin que nous avons parcouru ensemble, pour les bons moments, les restos, les voyages que nous avons partagés et que je n'oublierais pas. Egalement pour avoir élevé le chien le plus cool du monde (je parle pas de moi mais de **Nyanya**). Tu m'as beaucoup apporté, bonne route à toi.

Aux **Bledards**, pour votre excellente hospitalité dont nous avons si souvent profité, pour avoir toujours été jaloux d'être à Miramar ce que l'union sportive Quevillaise est au Barça. A **Hugo**, pour toutes les vidéos scabreuses « qu'un copain m'a montrées » et dont tu sais si bien nous faire profiter, pour ton humour pince-sans-rire réellement exceptionnel et pour ta façon toute personnelle de refaire la déco des chiottes des filles en boîte après une soirée arrosée au calva. A **Guitou**, la « massine », pour tes expressions complètement improbables, ton cul de black qui te procure un centre de gravité permettant de réaliser des dribles improbables au bonitofoot. A **Salim**, accusé d'un bon tiers des vols commis dans les environs de l'ENVT mais jamais condamné, pour tous les combats que tu mènes, en particulier ton engagement parfois extrême contre la surdose de sel dans les plats, pour ta générosité infinie. A **Toinou**, éternel rêveur mais toujours capable d'une agression verbale bien sentie (question de survie), pour tes talents de dresseur canin et féminin.

A **Bibo**, ma boss pendant cette année à l'Amical'amity Jane, pour le boulot phénoménal que tu as fourni au cours de cette année et pour avoir été toujours positive quelles que soient les circonstances. Ca a tellement été un plaisir de bosser avec toi que l'on a remis ça l'année suivante en recréant le club de zythologie avec **Largeau**. Merci à toutes les deux pour cette aventure maltée, pour les soirées dégustation et surtout les préparations desdites soirées au VB's.

A **Cuquos**, parce que t'es un type en or, pour être un peu le MacGyver de l'ENVT avec ton attirail à faire pâlir d'envie les services techniques de la mairie de Toulouse. Merci pour toutes les fois où tu nous as hébergé dans ton appart' de la cité.

A toute ma promo Trouillet, en particulier **Duruss'**, pour être toujours aussi fun, pour les soirées géniales passées à l'ENVT et sur Paris, **Diane**, pour ton remake de loft story dans la piscine de chez **Marie**, aux nombreux habitants du **Jungle Touch'**, **Grard**, mon cousin du Nord avec qui je pourrais faire la nouvelle saison des « ch'tis dans la jet-set », **Darty** et ses shorts même en hiver, **Lulu**, **Brugel**, **Bujaud**, **Meerleuh**, **Caroline** et **Duval**, **Malledan** qui m'a permis de tenir 4 ans avec la même blague, cette bonne vieille **Redeuil**, toujours classe et trash, excellent compagnon de fin de boom, mamie **Gully**, **Yakov'**, pour les soirées jeux de société, et **Diane**, qui a accepté de prendre la responsabilité des Brimades, merci pour ça.

Aux vieux, avec qui on a dû partager nos docs mais qu'on aime bien quand même : **Mulach'**, **Cheyland**, **Leroy**, **Charroin**, **Andraud**, **Rou'**, faut qu'on se fasse la revanche du ricard trophy un de ces jours, **Aude** et sa passion partagée des mini-burgers, **Zbikette**, pour son accueil à l'ENVT en première année, **Belin** croquez du bien, **Julie** et **Marine**, mes quasi-voisines de la cité, pour nos repas du bâtiment A.

A **Caro** et **Julie**, grâce à qui on rentre (presque) partout le samedi soir dans Toulouse.

A mes docs, en particulier les anciens de Miramar, **Fixou** et son endurance au jeu du doigt, **Gueyd'** « angel face », **Mumu** et son imitation de Jacouille, **Zézette**, **Fargeon**, ainsi que papa **Javard**, **Laz'**, **Lulu**, **Retournard**, **Michou**, **Trappou**, **Claire**, **Pauline**, **La Péliquette**, **Frazelle**, **Fauchon**, **tata Lolo**, **Gaston**, **Hélène** et tous les autres qui ont participé à ces inoubliables brimades pour nous souhaiter la bienvenue à l'ENVT.

A la promo d'en dessous qu'on aime quand même, même si ils sont bêtes, à **Jeff**, je crois que l'on ne saura jamais qui avait vomi dans les toilettes du haut au cours de cette fameuse soirée, on attend toujours le match retour, à **Piiii-eeeerre** que je connais depuis la prépa et son syndrome de Stockholm à mon égard, à **JB** pour nos concours de tire-poils devant le cercle avec le précédent et **Gozlan**, à **Hirsh** le Jacky-tuning et **Mika** pour cette belle équipe du VHB que nous formions, à **H** et sa finesse, à **Claire**, pour ta crédulité attendrissante et pour ne pas avoir foutu trop de bordel pendant ton séjour à Miramar.

A la promo d'encore en dessous, parce que vous êtes moins bêtes que ceux d'au-dessus, **Albert'**, **Burger**, **Carlac** (open the doooooor), **Dudulle**, **Espi**, **Floutre**, **Grifeuille**, **La Chatte**, **Lemaitre**, **Alex**, **Momo** un hamburger, **Olivia Deol'** et tous les autres trop nombreux pour être tous cités ici. Vous êtes une super promo, j'aurais aimé être présent pour voir si vous êtes toujours aussi bons en docteurs.

Aux poulots, pour ces brimades inoubliables, à **p'tit Bastaro**, pour ton sens du rythme et de la musicalité, à **Fab la bagarre**, tu passeras le bonjour à Johnny Cadillac de ma part, à ce **Con de mime** pour m'avoir appris à slider comme un vrai rider (même si y'a encore du boulot), à **Soulier** et ta volubilité ricard-dépendante, à **Braquemaaaaaaaaaaaaaraard**, un jour faudra qu'on officialise notre liaison, à **Flavie**, la p'tite beurette de Miramar qui a toujours un parole gentille (du genre « casse-toi sale merde ») mais qui commence à nous casse les couilles à poster des photos de son chat sur facebook tous les deux jours, **Bassine** toujours prêt à nous faire goûter ses spécialités régionales, **Caro** qui fuit de partout en clandé, **Salomé** et son goût pour le saut en parachute du bar, sans parachute... **Colgate**, **Autuoro**, **Mathilde** toujours plus, **Chloé** et **Gadenne**, **Perrin** et **Mika**, à **Girbal** et ses adresses underground du Royal's. Merci pour la seule année que j'ai eu la chance de passer avec vous, j'aurais aimé qu'il y en ait d'autres mais ainsi va la vie. On se donne rendez-vous au plus tard pour la reprise en main l'année prochaine.

A **Jean-Luc**, pour tes nombreux conseils et ton soutien dans le parcours chaotique qui mène à la recherche après une école véto, également parce que tu sans doute un des profs les plus sympa de l'ENVT, on se croiera en congrès maintenant qu'on fait le même métier.

A **Michiel**, pour toutes ces soirées Halloween que tu nous as permis d'organiser. Sans doute le meilleur représentant de labo du Sud-Ouest, t'as tout compris.

A toutes les personnes qui ont accepté de m'accueillir en stage, en particulier **Sharma** et **François**, qui m'ont les premiers fait découvrir le monde de la recherche dans des conditions idylliques, et **Elodie** pour l'expérience sur les animaux de laboratoire que tu m'as apportée et qui me sert régulièrement aujourd'hui.

A mes collègues de labo de l'Institut Pasteur, **Philippe**, **Marie-Pascale**, **Nathalie**, **Sylvie**, **Elisabeth**, pour votre aide pendant la réalisation de ce travail, **Mélanie** pour m'avoir appris la culture cell' et les ravages d'un excès de calva, **Cécile** et toutes les pauses café passées et des trois prochaines années, **Essia**, pour essayer de me piquer ma directrice de thèse et pour ta passion des pompiers et **Alix**, la blondinette, pour nos rendez-vous hebdomadaires quizz au Bréguet/beer hour de la STAPA. Merci à tous.

A **Alex**, mon alter-ego véto du master de viro, dommage que t'es choisi la mauvaise école et que tu sois parti t'enterrer à Glasgow. Reviens de temps en temps pour aller pisser au jardin botanique.

A mes deux compères doctorants de l'Institut Pasteur, **Thomas** et **Matthieu**, pour m'avoir fait découvrir la seule authentique baraque à frites belge du 13^{ème}, parce que je pense qu'on va bien rigoler pendant 3 ans avec des types comme vous.

A **Renald**, grâce à qui je peux suivre l'actualité cyclistique au jour le jour, et à **Tony**, pour toutes les fois où il a réussi à se ramener tout seul de soirée, pour les repas/barbeuk sur la terrasse du KB, merci à tous les deux de m'avoir accepté dans la colloc.

Au groupe des bretons, en particulier **Alice** et **Grozeau**, **Bourreau**, **LN**, **Tomtom**, **Cornu**, **Angèle**, **Lionel**, **Guillo** et **Yann**. Pour m'avoir fait me sentir bien à Paris dès mon arrivée. J'ai eu de la chance de tomber sur des joyeux lurons comme vous, changez-pas. On se retrouve quand je rentre au 2bis et c'est moi qui paye la tournée de Jägers.

A l'ENVT, cette belle école où j'ai atterri un peu par hasard un matin de septembre 2009 et que je regrette aujourd'hui de quitter.

Abréviations

CHIKV : Virus du chikungunya

DENV4 : Sérotype 4 du virus de la dengue

RT-PCRq : Transcription inverse et réaction de polymérisation en chaine quantitative

PBS 1X : Tampon phosphate salin 1X

BSA : Albumine de sérum bovin

PFA : Paraformaldéhyde

iTRAQ : réactifs isobariques permettant une quantification absolue et relative

AF : Acide formique

ACN : Acétonitrile

Table des matières

LISTE DES ENSEIGNANTS	2
REMERCIEMENTS	4
DEDICACES	6
ABREVIATIONS	12
TABLE DES MATIERES	13
TABLE DES ILLUSTRATIONS	16
PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	21
1. Le virus du chikungunya	21
1.2. Taxonomie.....	21
1.3. Biologie moléculaire.....	22
1.3.1. Structure du virion.....	22
1.3.2. Génome	23
1.3.3. Cycle infectieux et réplication virale	24
1.3. Epidémiologie.....	26
1.3.1. Historique	26
1.3.2. Re-émergence du chikungunya	26
1.3.3. Vecteurs et réservoirs	27
1.4. Physiopathologie de l'infection.....	29
1.4.1. Symptômes.....	29
1.4.2. Dissémination du virus chez l'hôte vertébré	31
1.5. Traitements et vaccins	33
2. Le virus de la dengue	34
2.1. Taxonomie.....	34
2.2. Biologie moléculaire.....	34
2.2.1. Structure du virion.....	34
2.2.2. Génome	35
2.2.3. Cycle infectieux et réplication virale	36
2.3. Epidémiologie.....	39
2.3.1. Historique	39
2.3.2. Situation actuelle.....	41

2.3.3.	Vecteurs et réservoirs	43
2.4.	Physiopathologie de l'infection	45
2.4.1.	Symptômes	45
2.4.2.	Dissémination du virus chez l'hôte vertébré	46
2.4.3.	Facteurs de risque associés à la survenue de dengue sévère	47
2.5.	Traitements et vaccins	48
3.	Un vecteur commun : <i>Aedes albopictus</i>.....	50
3.1.	Position systématique	50
3.2.	Description morphologique	51
3.2.1.	Adulte	51
3.2.2.	Œuf	55
3.2.3.	Larve	56
3.2.4.	Nymphe	56
3.3.	Cycle de développement.....	57
3.4.	Répartition géographique	59
3.5.	Importance en santé publique	63
3.5.1.	Nuisance et pathogénie non vectorielle.....	63
3.5.2.	Le vecteur de nombreux arbovirus	64
3.5.2.1.	Capacité vectorielle.....	64
3.5.2.2.	Modalité du repas sanguin et transmission d'un arbovirus.....	66
3.5.2.3.	Agents pathogènes transmis par <i>Aedes albopictus</i>	68
3.5.2.4.	Rôle de la salive dans la transmission et la pathogénicité des arbovirus	70
3.6.	Moyens de lutte contre <i>Aedes albopictus</i>	71
4.	Objectifs du projet.....	75
PARTIE II : ETUDE EXPERIMENTALE.....		76
1.	Matériels et méthodes	76
1.1.	Matériels d'étude.....	76
1.1.1.	Elevage des <i>Aedes albopictus</i>	76
1.1.2.	Souches virales utilisées	77
1.1.2.1.	Virus CHIK.....	77
1.1.2.2.	Virus DEN4	77
1.2.	Protocole d'infection expérimentale des <i>Aedes albopictus</i>	78
1.3.	Prélèvements des échantillons	79
1.3.1.	Prélèvements de moustiques entiers pour immunohistochimie	79
1.3.2.	Prélèvements des échantillons pour immunofluorescence	79
1.3.3.	Prélèvements pour quantification du nombre de particules virales	80
1.3.4.	Prélèvements pour analyse protéomique	80
1.3.5.	Prélèvement de salive de moustique	80
1.4.	Immunohistochimie et immunofluorescence	81
1.5.	Quantification du nombre de copies d'ARN viral par RT-PCRq.....	82
1.5.1.	Extraction de l'ARN de l'échantillon	82
1.5.2.	RT-PCRq	82

1.6.	Titration des échantillons	83
1.7.	Analyse protéomique	83
1.7.1.	Préparation des échantillons	84
1.7.2.	Analyse par spectrométrie de masse	84
2.	Résultats	86
2.1.	Présence de CHIKV et de DENV4 dans l'organisme d' <i>Aedes albopictus</i> infectés expérimentalement	86
2.2.	Présence de CHIKV et DENV4 dans la salive d' <i>Aedes albopictus</i> infectés expérimentalement	91
2.3.	Cinétique d'infection d' <i>Aedes albopictus</i> par CHIKV et DENV4	92
2.3.1.	Cinétique d'infection d' <i>Aedes albopictus</i> par CHIKV	92
2.3.2.	Cinétique d'infection d' <i>Aedes albopictus</i> par DENV4	94
2.3.3.	Cinétique de co-infection d' <i>Aedes albopictus</i> par CHIKV et DENV4	96
2.4.	Protéomes de glandes salivaires et d'intestins moyens d' <i>Aedes albopictus</i>	97
2.4.1.	Protéomes obtenus par la technique iTRAQ	98
2.4.2.	Protéomes obtenus par la technique « label-free »	98
2.5.	Protéomes d' <i>Aedes albopictus</i> infectés expérimentalement	98
2.5.1.	Modulation de la synthèse protéique de l'intestin moyen	99
2.5.1.1.	Par CHIKV	99
2.5.1.2.	Par DENV4	101
2.5.2.	Modulation de la synthèse protéique des glandes salivaires par CHIKV et DENV4	102
2.5.2.1.	Par CHIKV	103
2.5.2.2.	Par DENV4	104
3.	Discussion	107
3.1.	Les moustiques <i>Aedes albopictus</i> présents dans la région de Nice sont capables de transmettre à la fois CHIKV et DENV4	107
3.1.1.	Compétence vectorielle pour CHIKV	107
3.1.2.	Compétence vectorielle pour DENV4	108
3.2.	La co-infection de moustique <i>Aedes albopictus</i> par CHIKV et DENV4 potentialise l'infection du moustique par CHIKV au détriment de DENV4	109
3.3.	Les virus CHIKV et DENV4 influencent l'expression protéique de l'intestin moyen et des glandes salivaires	110
3.3.1.	Comparaison des résultats obtenus par la technique iTRAQ et par la technique « label-free »	110
3.3.2.	Signification biologique de la modulation de la synthèse protéique	111
3.3.3.	Conséquences de la modulation de la synthèse protéique sur la transmission d'arbovirus	114
	CONCLUSION	116
	BIBLIOGRAPHIE	118

Table des illustrations

FIGURE 1 : STRUCTURE DE CHIKV..	22
FIGURE 2 : STRUCTURE GENOMIQUE D'UN <i>ALPHAVIRUS</i> ..	23
FIGURE 3 : CYCLE DE REPLICATION DU CHIKV.	25
FIGURE 4 : REEMERGENCE DU VIRUS DU CHIKUNGUNYA.....	27
FIGURE 5 : ASPECT MACROSCOPIQUE DE MOUSTIQUE <i>Aedes aegypti</i> ET <i>Aedes albopictus</i>	28
FIGURE 6 : CYCLE DE TRANSMISSION DU VIRUS DU CHIKUNGUNYA	29
FIGURE 7 : EVOLUTION CLINIQUE D'UN PATIENT INFECTE PAR LE VIRUS DU CHIKUNGUNYA.....	30
FIGURE 8 : DISSEMINATION DU VIRUS DU CHIKUNGUNYA DANS UN ORGANISME HUMAIN.	32
FIGURE 9 : STRUCTURE DE DENV.....	35
FIGURE 10 : STRUCTURE GENOMIQUE D'UN <i>FLAVIVIRUS</i>	36
FIGURE 11 : CYCLE INFECTIEUX INTRACELLULAIRE DE DENV	38
FIGURE 12 : DISTRIBUTION D' <i>Aedes aegypti</i> SUR LE CONTINENT AMERICAIN	40
FIGURE 13: NOMBRE MOYEN ANNUEL DES CAS DE DENGUE SEVERE RAPPORTES A L'OMS ET NOMBRE MOYEN ANNUEL DE PAYS RAPPORTANT DES CAS DE DENGUE.....	41
FIGURE 14 : REPARTITION MONDIALE DU VIRUS DE LA DENGUE.....	42
FIGURE 15 : LOCALISATION DU VIRUS DE LA DENGUE ET DE SON VECTEUR PRINCIPAL : <i>Aedes aegypti</i> (60).....	43
FIGURE 16 : CYCLES DE TRANSMISSION DU VIRUS DE LA DENGUE.....	45
FIGURE 17 : VUES MACROSCOPIQUES DE MOUSTIQUES <i>Aedes albopictus</i> FEMELLES	51
FIGURE 18 : SCHEMA D'UN MOUSTIQUE FEMELLE ADULTE.....	52
FIGURE 19 : DIMORPHISME SEXUEL DE LA TETE DE MOUSTIQUES MALES ET FEMELLES.....	53
FIGURE 20 : PIECES BUCCALES D'UN MOUSTIQUE FEMELLE.	54
FIGURE 21 : VUE MACROSCOPIQUE D'ŒUFS D' <i>Aedes albopictus</i>	55
FIGURE 22 : VUE MACROSCOPIQUE DE LARVES <i>Aedes albopictus</i> RESPIRANT A LA SURFACE DE L'EAU.....	56
FIGURE 23 : VUE MACROSCOPIQUE D'UNE NYMPHE <i>Aedes albopictus</i> RESPIRANT A LA SURFACE DE L'EAU.....	57
FIGURE 24 : LES DIFFERENTES ETAPES DU DEVELOPPEMENT.....	58
FIGURE 25 : DISTRIBUTION CONNUE D' <i>Aedes albopictus</i> PAR PAYS EN 2011.....	60
FIGURE 26 : DISSEMINATION DU MOUSTIQUE <i>Aedes albopictus</i> DANS LE SUD DE L'EUROPE DE 1995 A 2012.....	61
FIGURE 27 : LOCALISATION CONNUE D' <i>Aedes albopictus</i> EN EUROPE, JANVIER 2014.....	62
FIGURE 28 : PROBABILITE DE PRESENCE D' <i>Aedes albopictus</i> EN FONCTION DES CONDITIONS METEOROLOGIQUES ACTUELLES ET CELLES PREVUES PAR LE MODELE GLOBAL.	63
FIGURE 29 : INFECTION ET DISSEMINATION D'UN ARBOVIRUS DANS L'ORGANISME D'UN MOUSTIQUE VECTEUR.....	67
FIGURE 30: LA TRANSMISSION VECTORIELLE D'UN ARBOVIRUS.....	67
FIGURE 31 : TABLEAU RECAPITULATIF DES ARBOVIRUS POUR LESQUELS LE STATUT DE VECTEUR D' <i>Aedes albopictus</i> A ETE DEMONTE (128).....	69
FIGURE 32 : COMPOSES ADULTICIDES UTILISES DANS LA LUTTE ANTI-VECTORIELLE	73
FIGURE 33: TABLEAU DONNANT LA COMPOSITION DU MELANGE PAR GORGEUR ET PAR INFECTION	78
FIGURE 34 : DISPOSITIF COMPLET NECESSAIRE A L'INFECTION ORALE EXPERIMENTALE DE MOUSTIQUES <i>Aedes albopictus</i>	79
FIGURE 35 : MARQUAGES IMMUNOHISTOCHEMISTIQUES D'UN MOUSTIQUE ENTIER INFECTE PAR CHIKV.	86
FIGURE 36 : MARQUAGES IMMUNOHISTOCHEMISTIQUES DE MOUSTIQUES ENTIERES INFECTES PAR DENV4.....	87

FIGURE 37 : MARQUAGE IMMUNOFLOUORESCENT D'UNE GLANDE SALIVAIRE D'UN <i>Aedes albopictus</i> PRELEVEE CINQ JOURS APRES INFECTION PAR CHIKV	88
FIGURE 38: MARQUAGE IMMUNOFLOUORESCENT DE GLANDES SALIVAIRES D'UN <i>Aedes albopictus</i>	89
FIGURE 39 : DYNAMIQUE D'INFECTION DE CHIKV DANS LES INTESTINS MOYENS D' <i>Aedes albopictus</i>	90
FIGURE 40: NOMBRE DE COPIES D'ARN VIRAL PAR ML RETROUVEES DANS LA SALIVE DE MOUSTIQUE <i>Aedes albopictus</i> 20 JOURS APRES INFECTION EXPERIMENTALE PAR DENV4.	91
FIGURE 41 : NOMBRE DE COPIES D'ARN VIRAL DE CHIKV DANS LES INTESTINS MOYENS OU LES GLANDES SALIVAIRES EN FONCTION DU TEMPS	93
FIGURE 42 : NOMBRE DE COPIES D'ARN VIRAL DE DENV4 DANS LES L'INTESTIN MOYEN EN FONCTION DU TEMPS....	94
FIGURE 43 : NOMBRE DE COPIES D'ARN VIRAL DE DENV4 DANS LES GLANDES SALIVAIRES EN FONCTION DU TEMPS	95
FIGURE 44 : POURCENTAGE DE PAIRES DE GLANDES SALIVAIRES INFECTEES.....	96
FIGURE 45 : NOMBRE DE COPIES D'ARN VIRAL DANS LES GLANDES SALIVAIRES D' <i>Aedes albopictus</i> CO-INFECTES PAR CHIKV ET DENV4	97
FIGURE 46 : NOMBRE DE PROTEINES DONT LA QUANTITE VARIE DANS LES GLANDES SALIVAIRES OU DANS L'INTESTIN MOYEN D' <i>Aedes albopictus</i> INFECTES PAR CHIKV OU PAR DENV4 (« LABEL-FREE »)	99
FIGURE 47 : FONCTIONS DES PROTEINES DE L'INTESTIN MOYEN DONT L'EXPRESSION EST DIMINUEE EN PRESENCE DE CHIKV	100
FIGURE 48 : FONCTIONS DES PROTEINES DE L'INTESTIN MOYEN DONT L'EXPRESSION EST AUGMENTEE EN PRESENCE DE CHIKV	101
FIGURE 49 : FONCTIONS DES PROTEINES DE L'INTESTIN MOYEN DONT L'EXPRESSION EST DIMINUEE EN PRESENCE DE DENV4	101
FIGURE 50 : FONCTIONS DES PROTEINES DE L'INTESTIN MOYEN DONT L'EXPRESSION EST AUGMENTEE EN PRESENCE DE DENV4	102
FIGURE 51 : FONCTIONS DES PROTEINES DES GLANDES SALIVAIRES DONT L'EXPRESSION EST DIMINUEE EN PRESENCE DE CHIKV	103
FIGURE 52 : FONCTIONS DES PROTEINES DES GLANDES SALIVAIRES DONT L'EXPRESSION EST AUGMENTEE EN PRESENCE DE CHIKV	104
FIGURE 53 : FONCTIONS DES PROTEINES DES GLANDES SALIVAIRES DONT L'EXPRESSION EST DIMINUEE EN PRESENCE DE DENV4	105
FIGURE 54 : FONCTIONS DES PROTEINES DES GLANDES SALIVAIRES DONT L'EXPRESSION EST AUGMENTEE EN PRESENCE DE DENV4.....	106

INTRODUCTION

En 1933, Charles Nicolle, prix Nobel de médecine pour avoir mis en évidence le rôle du pou comme vecteur de transmission du typhus, publiait *Destin des maladies infectieuses*. Dans cet ouvrage resté célèbre dans l'histoire de la médecine, il affirmait : « *Il y aura donc des maladies nouvelles. C'est un fait fatal. [...] Elles apparaîtront comme Athéna parut, sortant toute armée du cerveau de Zeus.* ». Près d'un siècle plus tard, force est de constater le caractère prophétique de cette intuition, avec l'émergence de nombreuses maladies infectieuses, comme le syndrome respiratoire du Moyen-Orient (MERS), ou, dernièrement, l'épidémie de fièvre hémorragique due au virus Ebola en Afrique de l'Ouest. Une maladie émergente se définit comme une infection nouvelle, causée par l'évolution ou la modification d'un agent pathogène, qui se traduit par un changement d'hôte, de vecteur, de pathogénicité ou de souche. Le terme s'applique également à l'apparition d'une infection ou d'une maladie non encore signalée (1). On parle de maladie ré-émergente lorsqu'une maladie connue fait irruption dans un nouveau contexte géographique, élargit sa gamme d'hôtes ou enregistre une forte progression de sa prévalence. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le rythme d'apparition des maladies émergentes ou ré-émergentes serait en augmentation depuis ces dernières décennies, principalement du fait du réchauffement climatique, de l'augmentation de la population mondiale et de l'essor des échanges commerciaux entre les différentes parties du globe (1). Dans la recherche, la prévention et la gestion de ces maladies infectieuses, les vétérinaires ont une responsabilité importante, puisque les zoonoses représentent environ 75% des maladies émergentes (2). Si leur caractère imprévisible frappe, parfois à tort, l'imagination des populations des pays du Nord, il n'en reste pas moins vrai qu'elles représentent un nombre de décès ainsi qu'un poids social et économique extrêmement lourd pour les pays du Sud. Ainsi, lorsque l'on examine les principales causes de réduction de l'espérance de vie en bonne santé, la part des maladies émergentes représente 10% de cette diminution dans les pays les plus pauvres, contre seulement 0,02% dans les pays développés (3).

Parmi ces maladies émergentes, les virus transmis par un vecteur arthropode, appelés *arthropode-borne-virus* ou arbovirus, sont particulièrement préoccupants en raison de leur potentiel élevé de transmission et d'une vitesse d'expansion géographique pouvant être

fulgurante. Le vecteur est un arthropode hématophage (moustique, tique, puce ou culicoïde) qui s'infecte au cours d'un repas sanguin effectué sur un hôte vertébré porteur du virus, puis transmet celui-ci à un nouvel hôte à l'occasion d'une autre piqûre. Malgré ce caractère commun, les arbovirus sont extrêmement divers d'un point de vue taxonomique, puisqu'ils appartiennent à six familles virales différentes. On compte environ 500 arbovirus, parmi lesquels 50 présentent un danger pour la santé humaine (4). De par leur mode de transmission original, l'épidémiologie des arbovirus est très particulière et prédire où se produiront les prochaines épidémies ainsi que la forme qu'elles prendront reste un défi. Un exemple issu de la médecine vétérinaire illustre parfaitement ces difficultés : l'épizootie européenne de fièvre catarrhale ovine (FCO). Cette maladie, endémique en zone tropicale, est due à un *Reoviridae* du genre *Orbivirus*, le virus bluetongue (BTV) (5). Dès les années 2000, sa progression vers les pays du nord était connue des épidémiologistes et un plan d'éradication avait été mis en place en cas d'apparition de foyers dans le sud de l'Europe (6). Ce que les modèles étaient incapables de prévoir, c'est que le virus apparaîtrait pour la première fois en Europe du Nord. L'origine de cette introduction reste à ce jour encore indéterminée, mais impliquerait certainement le transport de vecteurs infectés (7). Au cours de l'été 2006, plusieurs foyers ont été recensés aux Pays-Bas, en Belgique, en Allemagne, puis dans le nord de la France. Son émergence a de plus été associée à un changement de vecteur qui a entraîné une modification sensible de sa pathogénicité (8). Ainsi, alors que la maladie touchait principalement les ovins, une virulence accrue envers les bovins a très vite été rapportée (9). Entre 2006 et 2008, le virus s'est étendu inexorablement au reste de l'Europe, occasionnant des dizaines de milliers de foyers infectieux et des pertes économiques considérables (10). En effet, l'utilisation d'insecticides sensée limiter la diffusion de la maladie s'est révélée inefficace, un avis de l'Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments (Afssa) remettant même en cause sa pertinence dans le cadre de la lutte contre la FCO (11). Seule la mise en place d'une campagne de vaccination obligatoire a permis d'enrayer efficacement sa progression. Cet exemple d'émergence virale est loin d'être unique dans le monde des arbovirus. La diffusion du virus du Nil occidental aux Etats-Unis à partir de 1999 est tout aussi emblématique de la difficulté à lutter contre l'introduction de maladies vectorielles en l'absence de protocoles de vaccination efficaces (12).

Malheureusement, il n'existe que peu de vaccins disponibles contre des arboviroses. Seules la fièvre jaune, l'encéphalite japonaise et l'encéphalite à tiques peuvent être prévenues de façon plus ou moins efficace. Pour les autres, dans l'attente de la mise au point d'un vaccin, le seul recours est la lutte antivectorielle. Si l'utilité des insecticides a été démontrée par le passé, avec l'éradication du paludisme de nombreux pays suite à leur utilisation massive, l'apparition de résistances dans les populations de moustiques est venue progressivement remettre en cause leur efficacité. Ainsi, la mise au point de nouvelles méthodes de contrôle de ces insectes vecteurs et des virus qu'ils transmettent devient urgente. Pour être efficaces, ces approches innovantes doivent tenir compte des interactions complexes entre le vecteur, le pathogène et l'hôte vertébré. Dans cette perspective, nous avons choisi deux arbovirus émergents, le virus de la dengue (DENV) et le virus du chikungunya (CHIKV), et nous avons tenté de comprendre leur influence sur l'un de leur principal vecteur : *Aedes albopictus*. Pour cela, nous avons choisi une approche protéomique dans le but d'identifier les protéines synthétisées et de quantifier leur production dans deux organes du moustique. Ces deux organes, les glandes salivaires et l'intestin moyen, jouent un rôle clé au cours du cycle de transmission des arbovirus. En effet, l'infection de l'intestin moyen constitue une première étape obligatoire à la dissémination de l'arbovirus dans l'organisme du moustique. Les glandes salivaires représentent quant à elles l'ultime barrière à franchir avant que le virus soit excrété dans la salive et donc potentiellement transmis à un nouvel hôte. Les approches protéomiques présentées ici permettent d'identifier les protéines dont l'expression est modulée en cas d'infection et de quantifier l'intensité de cette modulation. Cette étude présente dans un premier temps une synthèse bibliographique des connaissances actuelles sur DENV, CHIKV et *Aedes albopictus*. Dans un second temps, nous détaillons la démarche expérimentale appliquée à notre problématique puis nous présentons les principaux résultats obtenus. Ces résultats sont ensuite discutés à la lumière de travaux antérieurs du laboratoire ainsi que de ceux disponibles dans la littérature scientifique.

Partie I : Synthèse bibliographique

1. Le virus du chikungunya

Le virus du chikungunya est un arbovirus appartenant à la famille des *Togaviridae* et au genre *Alphavirus*. Le terme « chikungunya », qui peut se traduire en langue Makondé par « qui marche courbé », a été donné au virus en raison du caractère fortement invalidant des douleurs articulaires couramment associées à la maladie. En effet, il entraîne le plus souvent un syndrome fébrile accompagné de myalgies et d'arthralgies très sévères et pouvant revêtir un caractère chronique. CHIKV est connu depuis les années 50 en Afrique et en Asie. Il a récemment ré-émergé dans l'Océan Indien en 2005-2006 puis, plus récemment, aux Caraïbes en décembre 2013. Ce virus est transmis principalement par des moustiques du genre *Aedes*. L'un d'eux, *Aedes albopictus*, est désormais parfaitement installé dans de nombreux pays d'Europe et dans une large part des Etats-Unis, laissant craindre une émergence du CHIKV dans ces régions. Jusqu'à présent, il n'existe aucun vaccin ou traitement spécifiques commercialisés.

1.2. Taxonomie

Le virus du chikungunya appartient à la famille des *Togaviridae* et au genre *Alphavirus*. Ce genre est constitué de 29 espèces virales réparties en sept complexes antigéniques. CHIKV appartient au complexe antigénique du virus de la forêt de Semliki (SFV) qui comprend également le virus de la rivière Ross (RRV) (2). Ce dernier est très proche de CHIKV, c'est pourquoi il est souvent utilisé comme modèle, en particulier dans l'étude des myopathies et arthrites chroniques liées à CHIKV (3). Dans la classification de Baltimore, il est situé dans le groupe IV qui comprend les virus à ARN simple brin et à polarité positive. Ce virus est transmis via un moustique vecteur, il s'agit donc d'un *arthropode-borne-virus* (ou arbovirus).

1.3. Biologie moléculaire

1.3.1. Structure du virion

La capside de CHIKV est sphérique, de symétrie icosaédrique ($T=4$) et mesure 65-70 nm de diamètre. Elle est formée de 240 monomères et possède une enveloppe. Cette enveloppe est constituée d'une bicouche lipidique provenant de la membrane plasmique de la cellule hôte dans laquelle sont enchâssés 80 trimères formés par des hétérodimères de protéines virales E1 et E2 (fig. 1) (2).

VIRION

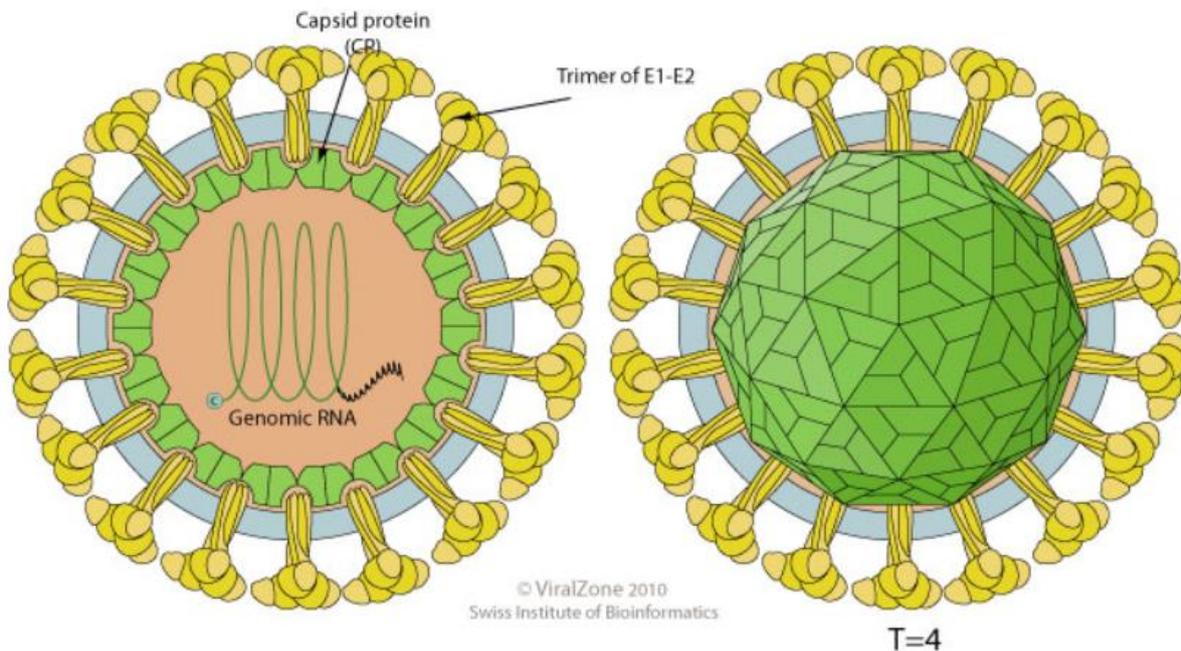


Figure 1 : Structure de CHIKV. La particule virale est sphérique, enveloppée, de symétrie icosaédrique et possède un diamètre de 65-70nm. La capside est constituée de 240 monomères, l'enveloppe contient quant à elle 80 trimères de dimères de E1-E2 (ViralZone).

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html

1.3.2. Génome

Le génome de CHIKV est constitué par un ARN simple brin de polarité positive d'une longueur d'environ 11,8 kb (4). Il possède une coiffe de type I (m7GpppA) et une queue polyadénylée. L'ARN du virion est infectieux et sert à la fois d'ARN génomique et d'ARN messager (fig. 2). Il est traduit selon deux cadres de lecture non-chevauchants qui permettent la synthèse de polyprotéines. Celles-ci seront ensuite fragmentées en différentes protéines sous l'effet de protéases virales et cellulaires. Le premier cadre de lecture à partir de l'extrémité 5' aboutit à la formation d'une polyprotéine nsP123 et de la protéine nsP4. La polyprotéine nsP123 est le précurseur des protéines non-structurales nsP1, nsP2 et nsP3. Les protéines nsP sont multifonctionnelles et permettent en particulier la synthèse du brin d'ARN négatif, indispensable à la réplication virale. Le second cadre de lecture permet la synthèse d'une autre polyprotéine à partir d'un intermédiaire appelé ARN 26S. Celui-ci est un ARN subgénomique de polarité positive qui sert de matrice à la synthèse de la polyprotéine. Une fois clivée, elle libère les protéines structurales.

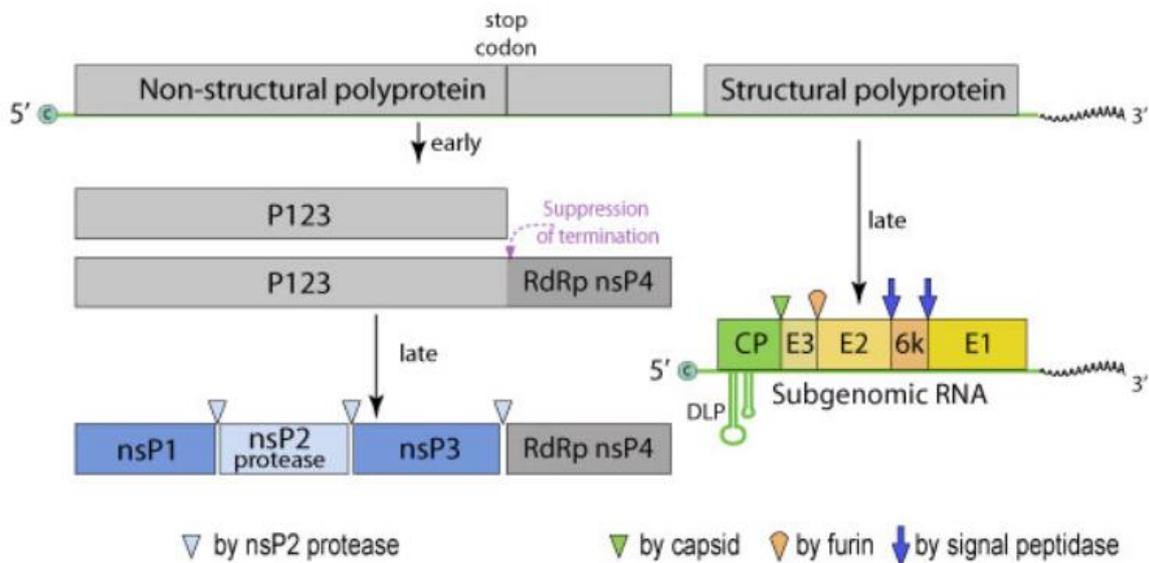


Figure 2 : Structure génomique d'un *Alphavirus*. Le génome est sous forme d'un ARN simple brin, de polarité positive, coiffé et polyadénylé. Il est traduit selon deux cadres de lecture permettant la synthèse des protéines virales non structurales d'une part, et structurales d'autre part via le passage par un intermédiaire subgénomique (ViralZone).

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html

1.3.3. Cycle infectieux et réplication virale

Les mécanismes moléculaires de la transmission et de la réplication du CHIKV dans les cellules de mammifères ont été relativement peu investigués et sont donc mal connus. L'essentiel des informations dont nous disposons a été déduit de l'étude du cycle des *Alphavirus*.

L'entrée de la particule virale de CHIKV dans la cellule hôte se fait via un récepteur qui permet l'endocytose du virion via un mécanisme clathrine-dépendant (5) (fig.3). A ce jour, l'identité du ou des récepteur(s) demeure inconnue (6). La vésicule ainsi formée migre vers l'intérieur de la cellule et subit au cours de ce transfert une acidification. La diminution du pH de la vésicule provoque une réorganisation de la structure des trimères de E1/E2 de l'enveloppe virale. Il y a alors exposition du peptide de fusion de la protéine E1, ce qui entraîne la fusion de l'enveloppe virale avec la membrane de la vésicule. Par ce mécanisme, la nucléocapside est libérée dans le cytoplasme de la cellule infectée (4), ce qui permet la traduction de l'ARN viral. Les deux premières molécules synthétisées sont la polyprotéine nsP123 et de la protéine nsP4 (phase précoce). Ces 2 molécules se lient entre elles ainsi qu'avec des protéines cellulaires pour former le complexe de réplication (7). Le complexe de réplication commence alors la synthèse de brin d'ARN antisens (antigénome) à l'origine de la réplication virale. Dès que la concentration en polyprotéine nsP123 est suffisante, celle-ci est clivée par des protéases virales et cellulaires en protéines matures nsP1, nsP2 et nsP3. Ces protéines forment alors un nouveau complexe de réplication avec nsP4 et d'autres protéines cellulaires à l'origine de la synthèse de nombreuses copies d'ARN subgénomique 26S (phase tardive). Pour former cet ARN subgénomique, le complexe de réplication utilise comme matrice l'ARN antisens synthétisé précédemment (8). Cet ARN 26S est traduit en une polyprotéine précurseur des protéines structurales. En effet, elle est clivée en C, pE2, 6K et E1. D'après l'analyse de la conservation des séquences entre d'autres *Alphavirus* et CHIKV, la protéine de capsid C serait une protéase à sérine ayant une activité autoprotéolytique (9). Après la formation de la nucléocapside, une séquence signal présente sur pE2 permet l'enchâssement de celle-ci dans la membrane du réticulum endoplasmique. Une protéine cellulaire localisée dans la lumière du réticulum endoplasmique clive alors la polyprotéine entre pE2 et 6K. Le complexe pE2-E1 est ensuite conduit vers la surface via l'appareil de Golgi pour se localiser à la membrane plasmique de la cellule. Au cours de cette étape, pE2 est clivée en E2 et E3 (10). Parallèlement, l'assemblage de

la nucléocapside est réalisé dans le cytoplasme et aboutit à la formation d'une structure comprenant 120 dimères de protéine C entourant un brin d'ARN génomique (11). Les nucléocapsides virales migrent ensuite vers la membrane plasmique où elles bourgeonnent. La sortie de la cellule permet donc l'acquisition d'une bicouche lipidique dans laquelle sont enchâssés 80 trimères formés de dimères de E1/E2 (12). L'ensemble du cycle est extrêmement rapide puisque celui-ci est complété en quatre heures à partir de l'entrée du virus dans la cellule (13).

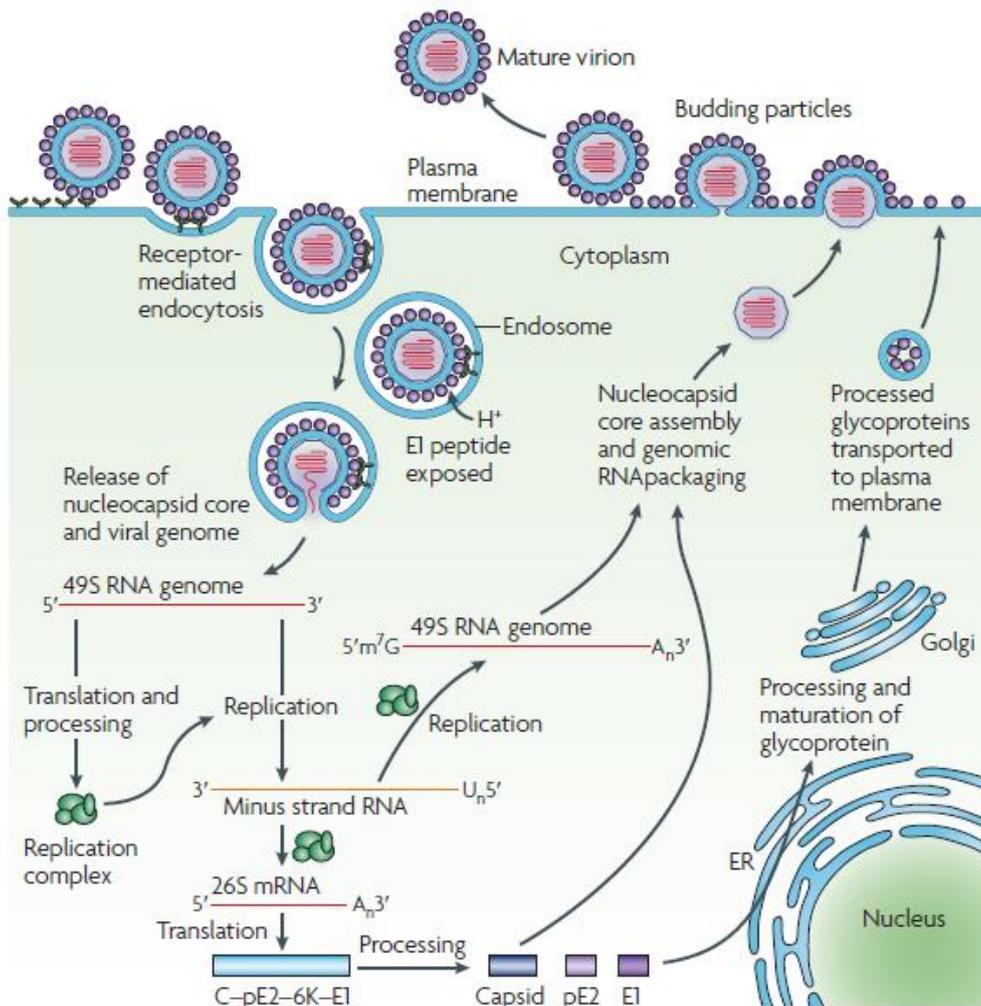


Figure 3 : Cycle de réplication du CHIKV. Le virus pénètre dans la cellule par endocytose, l'acidification de la vésicule provoque un changement de conformation des protéines virales d'enveloppe qui expose le peptide de fusion de E1. Il y a alors fusion entre les membranes de l'hôte et du virus, permettant la sortie de la capsid dans le cytoplasme de la cellule. La réplication se fait alors en deux phases, la première est qualifiée de phase précoce, la seconde de phase tardive. Au cours de ces phases, différentes polyprotéines sont synthétisées puis clivées et aboutissent à la synthèse des protéines non-structurales et structurales. Les protéines d'enveloppe sont adressées à la membrane plasmique via l'appareil de Golgi. La capsid s'autoassemble dans le cytoplasme avant de migrer vers la périphérie de la cellule. La sortie de la cellule infectée se fait par bourgeonnement à la membrane (14).

1.3. Epidémiologie

1.3.1. Historique

Le virus a été isolé pour la première fois en 1953 au cours d'une épidémie de fièvre sévissant sur le plateau de Makonde dans le Tanganyika, l'actuelle Tanzanie (15). Il est cependant probable que de nombreuses épidémies attribuées au virus de la dengue aient en réalité été provoquées par le virus du chikungunya car les symptômes provoqués par les deux virus sont très similaires (16). Il a ensuite été isolé une seconde fois en 1958 chez des patients vivant à Bangkok, en Thaïlande (17). Depuis ces deux premiers cas documentés, le virus a été à l'origine de nombreuses épidémies sporadiques dans plusieurs pays d'Afrique et d'Asie.

1.3.2. Re-émergence du chikungunya

En avril 2005, il est confirmé que l'agent responsable d'une épidémie sur la côte Est du Kenya entraînant des symptômes proches de ceux de la dengue est en réalité CHIKV, ce qui en faisait sa première apparition dans le Sud-ouest de l'Océan Indien (18). Peu de temps après, d'autres cas furent signalés aux Comores, à Mayotte, sur l'île Maurice et à l'île de La Réunion. Très rapidement, le nombre de cas s'est accru considérablement et on estime aujourd'hui que plus de 35% de la population de l'île de La Réunion a été infectée par le virus, avec 267 décès associés (19). De même, à la fin de l'année 2005 et après avoir en apparence disparu d'Inde depuis près de 32 ans, le virus du chikungunya a été simultanément détecté dans plusieurs états du sous-continent (20). A la fin de l'épidémie, le nombre officiel de cas s'élevait à plus de 1,3 millions. L'épidémie de CHIKV s'est alors encore étendue dans plusieurs pays d'Asie parmi lesquels le Sri Lanka où il a causé une épidémie très importante en 2006 (21). C'est au cours de cette épidémie que le virus a été introduit dans des zones jusqu'alors non-endémiques. Il a ainsi été détecté en Nouvelle-Calédonie, en Papouasie-Nouvelle-Guinée, au Bhoutan et au Yémen. En 2007, le continent européen connaît la première épidémie locale de chikungunya, tout d'abord en Emilie-Romagne, en Italie (22), puis dans le département Français du Var en 2010 (19). Enfin, en décembre 2013, l'OMS rapporte la première transmission locale de CHIKV dans l'hémisphère Ouest avec des cas dans l'île de Saint Martin, dans les Caraïbes. Entre son apparition et le 22 août 2014, le virus a causé plus de 583 504 cas dans de nombreux pays de la zone des Caraïbes, de l'Amérique Centrale et du Sud (23). Le 17 juillet 2014, le Center for

Disease Control and Prevention (CDC) annonce le premier cas de transmission locale sur le territoire des Etats-Unis, en Floride (24). Ainsi, en moins de 10 ans, CHIKV s'est propagé à partir du Kenya à l'Océan Indien, à l'Océan Pacifique et aux Caraïbes (fig. 4), causant au passage plusieurs millions de cas dans plus de 50 pays différents (25).

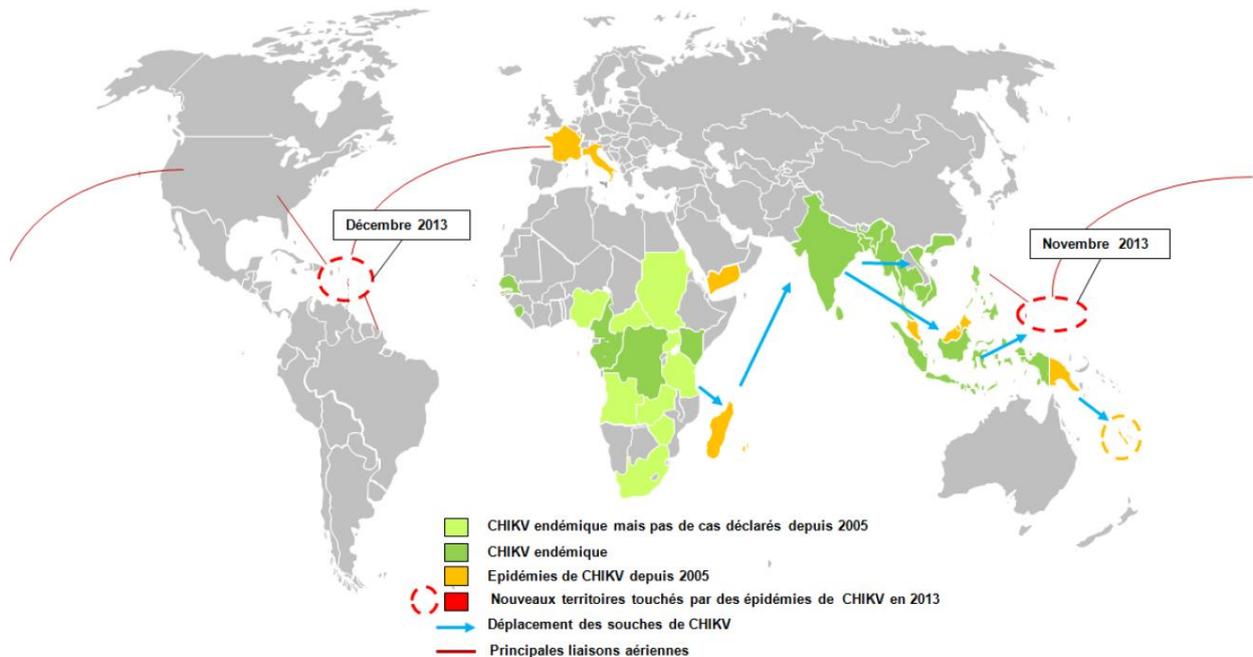


Figure 4 : Réémergence du virus du chikungunya. Suite à l'épidémie de 2005-2006 dans les îles de l'ouest de l'Océan Indien, le virus s'est rapidement propagé à l'Inde, à l'Asie du Sud-est, puis aux îles de l'Océan Pacifique et enfin aux Caraïbes. La circulation des souches virales s'est probablement effectuée par le déplacement de voyageurs infectés, principalement via un transport aérien (Desprès et al, 2014).

1.3.3. Vecteurs et réservoirs

Deux types de cycles peuvent être distingués concernant le mode de transmission de CHIKV. Le premier est sylvatique et enzootique et n'a été mis en évidence qu'en Afrique. Il se déroule entre des primates non-humains et des moustiques du genre *Aedes*. Parmi les moustiques impliqués, on compte notamment *Aedes furcifer*, *Aedes vittatus*, *Aedes fulgens*, *Aedes luteocephalus*, *Aedes dalzieli*, *Aedes taylori*, *Aedes africanus*, *Aedes vigilax* et *Aedes camptorhynchite* (13). Les primates jouent alors le rôle de réservoirs et d'hôtes d'amplification mais ne semblent pas développer de symptômes sévères (26). En Asie, la mise en évidence récente d'anticorps spécifiques anti-CHIKV chez des primates non-humains suggère qu'un tel cycle est possible sur ce continent (27). De tels anticorps ont également été détectés chez de nombreuses espèces de rongeurs, d'oiseaux et de mammifères domestiques sans que l'on puisse

préciser s'il s'agit de réservoirs ou de simples hôtes accidentels. Le second type de cycle peut être soit endémique soit épidémique et se situe généralement en zone urbaine (fig. 6). Les moustiques impliqués sont très différents puisque l'on retrouve essentiellement *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Ce sont des moustiques très similaires qui se distinguent par un motif en forme de lyre sur la partie dorsale du thorax pour *Aedes aegypti* alors qu'*Aedes albopictus* n'arbore qu'une simple ligne blanche (fig. 5).



Figure 5 : Aspect macroscopique de moustique *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. *Aedes aegypti*, à gauche, présente une coloration plus claire qu'*Aedes albopictus* ainsi qu'un motif en forme de lyre sur la face dorsale du thorax. *Aedes albopictus*, à droite, est plus sombre et possède une ligne blanche située dans l'axe longitudinal du thorax (Florida Medical Entomology, University of Florida).

<http://fmeal.ifas.ufl.edu/research/exotic.shtml>

Ces moustiques ont des comportements qui entraînent une forte exposition de l'Homme aux piqûres, provoquant rapidement un nombre de cas important après introduction du virus dans l'environnement. En effet, ces deux espèces vivent dans les habitations ou à proximité de celles-ci, sont anthropophiles (c'est-à-dire qu'elles choisissent préférentiellement un hôte humain plutôt que animal pour se nourrir), prennent plusieurs repas sanguins au cours du même cycle gonotrophique et utilisent des sites de pontes artificiels (28).

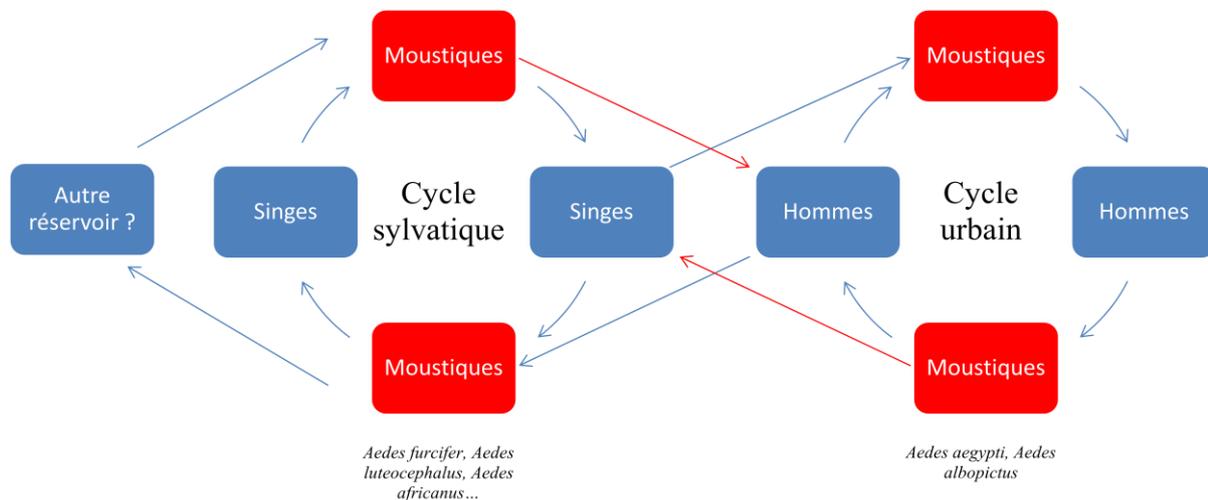


Figure 6 : Cycle de transmission du virus du chikungunya. CHIKV est un arbovirus zoonotique qui possède un cycle sylvatique (uniquement en Afrique) et un cycle urbain. Dans le cycle sylvatique, le virus est transmis entre des primates non-humains et des moustiques forestiers alors que dans le cycle urbain, le cycle s’effectue entre des espèces de moustiques urbaines et des hôtes humains. Les primates non-humains constituent le réservoir du virus en période non-épidémique, possiblement en association avec d’autres espèces animales. En période épidémique, le seul hôte réservoir est l’humain (29).

Jusqu’à récemment, on considérait que le principal vecteur du CHIKV était *Aedes aegypti*. Cependant, l’analyse de la séquence de CHIKV à l’origine de l’épidémie de La Réunion en 2005-2006 a montré des substitutions nucléotidiques, l’une d’elles entraînant un remplacement de l’Alanine (A) en Valine (V) en position 226 de la glycoprotéine d’enveloppe E1 (E1 226V). Ce remplacement a été associé plus tard à une plus grande affinité de CHIKV pour *Aedes albopictus*, permettant d’expliquer que ce dernier ait joué le rôle de vecteur principal de l’épidémie sur l’île (30). Les études épidémiologiques menées depuis tendent à confirmer que lorsque la mutation E1 226V est présente, *Aedes albopictus* est responsable de la majeure partie des transmissions. En son absence, c’est *Aedes aegypti* qui est le vecteur principal (25).

1.4. Physiopathologie de l’infection

1.4.1. Symptômes

L’apparition des premiers symptômes se fait après une période d’incubation de 1 à 12 jours, en moyenne entre 2 et 4 jours post-infection (31). Une fièvre intense apparaît alors brutalement, associée à des maux de tête, de dos, des douleurs abdominales, des myalgies et des arthralgies. Ces dernières affectent principalement les extrémités des membres comme les poignets, les chevilles et les phalanges (28). Des troubles de la peau sont présents dans 40 à 50%

des cas, avec des éruptions maculopapuleuses prurigineuses principalement sur le thorax ou des défauts de pigmentation. Des manifestations oculaires peuvent survenir, parmi lesquelles on retrouve principalement des iridocyclite et des rétinites, plus rarement des épisclérites. Ces symptômes oculaires se résolvent en six à huit semaines et n'entraîne jamais la perte de la vision (32). Si la fièvre disparaît en quelques jours, il est courant de constater que les arthralgies peuvent revêtir un caractère chronique (fig. 7). Ainsi, 33% des patients interrogés se plaignent d'arthralgies ou d'arthrites persistantes plus de quatre mois post-infection, et ils sont encore près de 12% à déclarer de telles douleurs plus de trois ans après avoir été infectés par CHIKV (16).

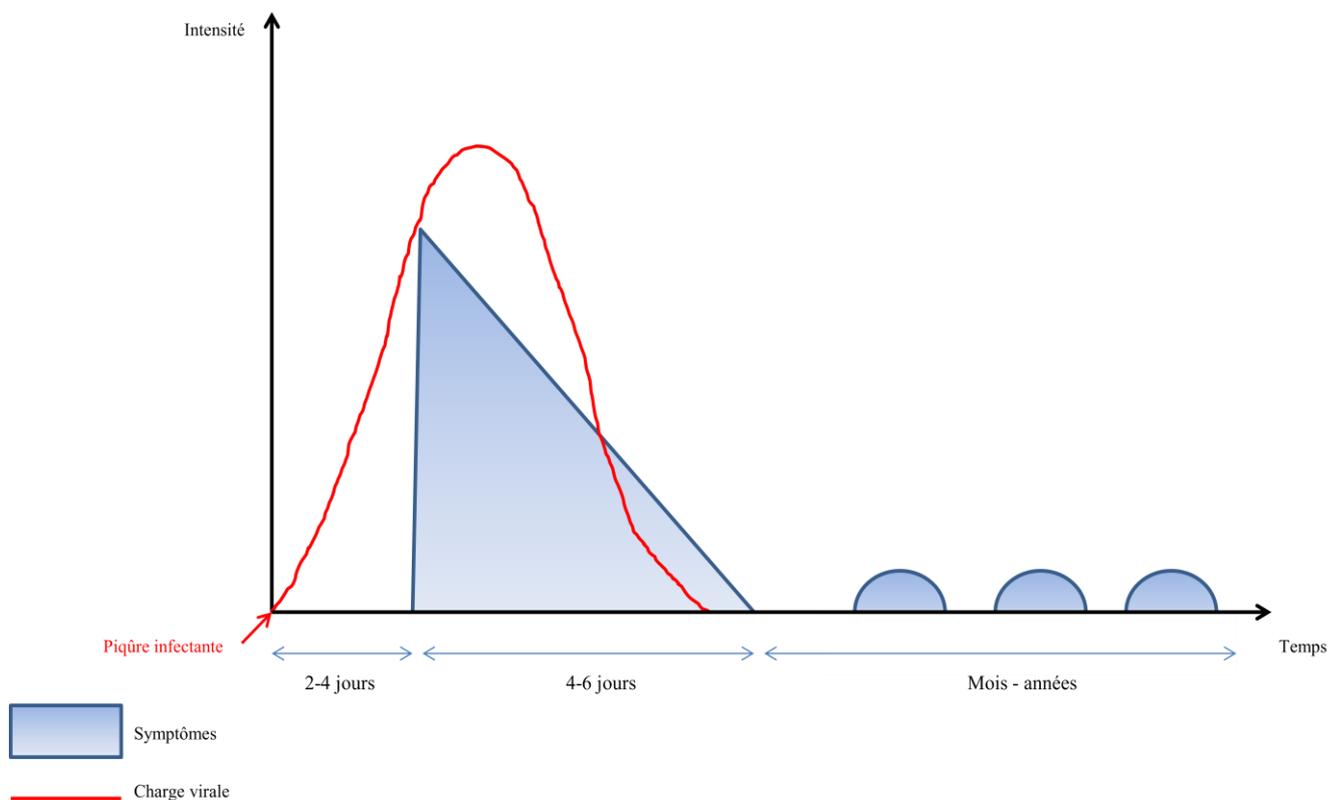


Figure 7 : Evolution clinique d'un patient infecté par le virus du chikungunya. Suite à une piqûre par un moustique infecté par CHIKV, on observe une période d'incubation de 2 à 4 jours qui précède un épisode de fièvre très intense et d'apparition brutale. Les symptômes les plus courants comprennent de la fièvre, des maux de tête, de dos, des douleurs abdominales, musculaires et articulaires ainsi que des éruptions maculopapuleuses. L'apparition des symptômes coïncide avec l'augmentation très importante de la virémie, le virus étant éliminé de l'organisme en moins d'une semaine. De même, les symptômes disparaissent rapidement mais, chez plus de 30% des patients infectés, on observe des résurgences de la maladie sous forme d'arthralgies voir d'arthrites chroniques (14).

Les personnes âgées et les individus présentant des affections articulaires semblent développer plus fréquemment une forme chronique que le reste de la population. Des exemples d'atteintes sévères de chikungunya sont également décrits dans la littérature. Ainsi, des cas de méningo-encéphalites liées au CHIKV ont été rapportés chez quelques patients, principalement au cours d'épidémies ayant eu lieu en Inde en 1973 et en 2006. Le CHIKV a même pu être isolé chez deux enfants atteints de méningite ou d'encéphalite (33). Jusqu'à l'épidémie survenue sur l'île de La Réunion, le virus n'était pas considéré comme étant potentiellement mortel. Cependant, près de 203 décès ont pu être reliés à l'infection par CHIKV. Les raisons de cet accroissement apparent de la pathogénicité ne sont pas claires pour le moment et peuvent être multiples. Si une mutation du virus entraînant une sévérité accrue de la maladie n'est pas exclue, il est aussi possible d'envisager des facteurs favorisant chez les patients. On peut également penser que la détection des cas mortels de chikungunya a été rendue possible par un système d'épidémiosurveillance renforcé, système qui n'avait jamais été mis en place dans les pays où le virus sévissait auparavant.

1.4.2. Dissémination du virus chez l'hôte vertébré

Suite à une piqûre par un moustique infecté, le virus pénètre dans les capillaires sous-cutanés où il débute sa réplication avec l'infection de certaines cellules présentes dans le derme, comme les macrophages, les cellules endothéliales ou les fibroblastes (34). La réplication locale semble limitée en intensité et dans le temps. Le virus dissémine rapidement aux nœuds lymphatiques locaux puis on note l'apparition d'une virémie qui serait à l'origine d'une infection secondaire des organes cibles : le foie, les muscles, les articulations et, parfois, le cerveau (13) (fig. 8). Les macrophages seraient les cellules à l'origine de l'infection des articulations, par un mécanisme de cheval de Troie (35). Pendant la première semaine de l'infection, la virémie peut atteindre des valeurs très élevées avec une charge virale du sang de voyageurs infectés évaluée à $3,3 \cdot 10^9$ particules virales par mL (36).

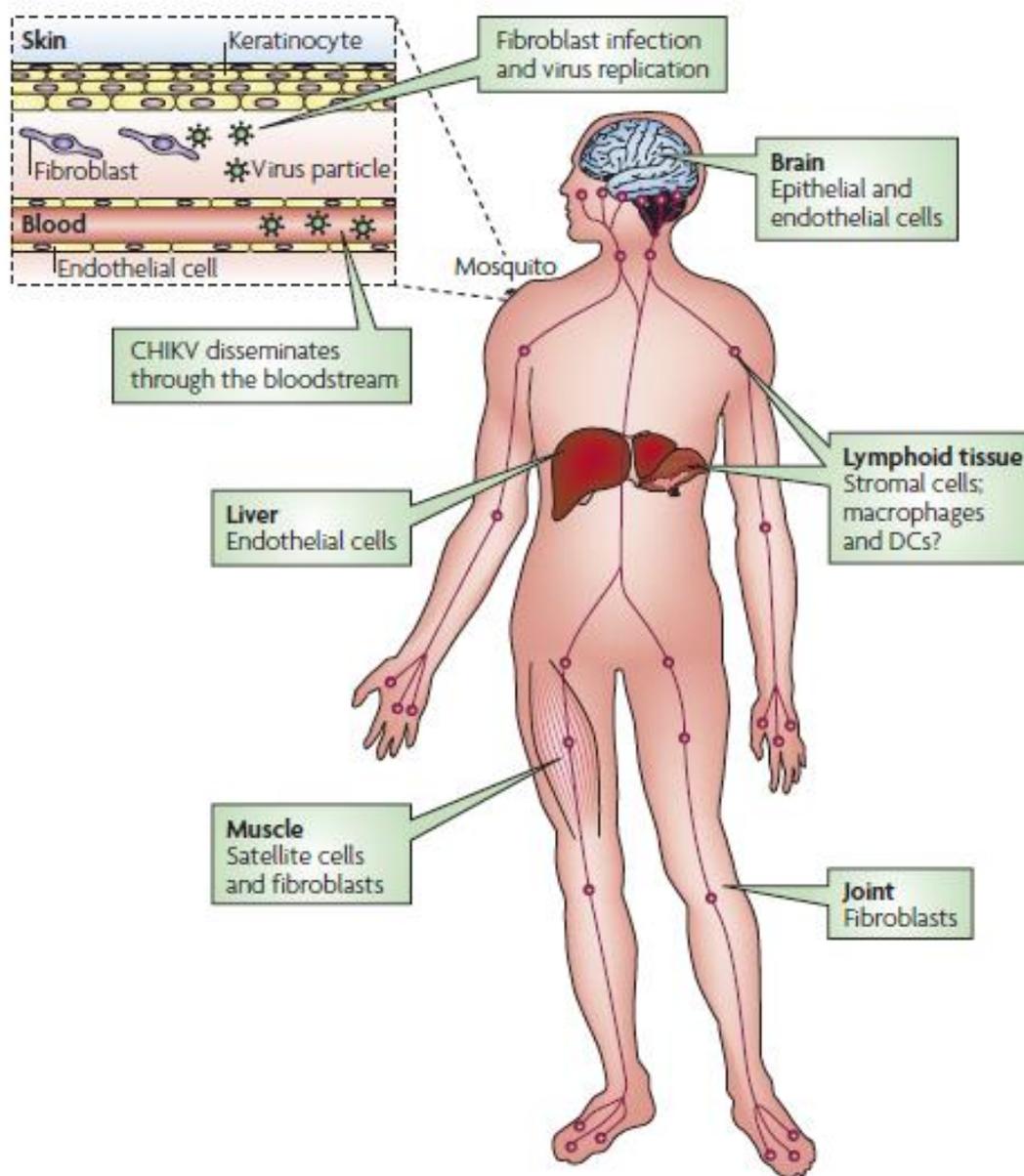


Figure 8 : Dissémination du virus du chikungunya dans un organisme humain. La transmission de CHIKV se fait à la suite d'une piqûre par un moustique du genre *Aedes* infecté. Le virus se réplique tout d'abord localement, au niveau du site d'inoculation. Pour cela, il infecte certaines cellules de la peau comme les fibroblastes ou les macrophages. Il dissémine ensuite au foie, aux muscles, aux articulations aux tissus lymphoïdes ainsi qu'au cerveau. L'identité des cellules cibles connues est indiquée pour chaque tissu (14).

1.5. Traitements et vaccins

Il n'existe jusqu'à présent aucun traitement spécifique pour soigner cette maladie. La prise en charge des malades se fait donc uniquement par un traitement symptomatique visant à limiter la fièvre et à soulager les douleurs articulaires. Les patients les plus atteints sont mis sous perfusion et reçoivent des anti-inflammatoires non stéroïdiens, auxquels s'ajoutent un antipyrétique tel que l'ibuprofène ou le paracétamol. L'utilisation de chloroquine, habituellement utilisée dans le traitement et la prévention du paludisme, a été testée. Celle-ci a donné des résultats encourageants dans le traitement de l'arthrite chronique due à CHIKV (37) mais des essais réalisés à La Réunion ont montré son inefficacité dans le traitement de la phase aiguë (38). De même, la ribavirine, donnée à raison de 200mg deux fois par jours pendant sept jours, a été associée à une rémission plus rapide des douleurs articulaires chez les patients atteints de la forme chronique (39).

L'effort principal des recherches actuellement menées se porte sur la mise au point d'un vaccin prophylactique. On a très vite remarqué la mise en place d'une immunité spécifique de longue durée chez les patients infectés par CHIKV. Si cette information était encourageante dans un premier temps, les espoirs de mise au point rapide d'un vaccin se sont révélés vains. Ainsi, aucun vaccin n'est actuellement commercialisé, certains vaccins candidats ayant fait l'objet d'essais cliniques ont même été abandonnés depuis (40). Les recherches concernant la mise au point d'un vaccin sont donc toujours en cours. Deux vaccins prometteurs sont actuellement en développement. Le premier, mis au point par le National Institute of Health (NIH) aux Etats-Unis, repose sur l'injection de pseudo-particules virales (VLP), a passé avec succès la phase I d'essai clinique (40). Le second se fonde sur l'utilisation d'un virus recombinant de la rougeole qui exprime des VLP de CHIKV. Il est développé par l'Institut Pasteur et a démontré son efficacité chez la souris (41). En l'absence de vaccin, la prophylaxie la plus efficace reste la lutte contre le vecteur et la prévention des piqûres.

2. Le virus de la dengue

Le virus de la dengue est un virus de la famille des *Flaviviridae* transmis par des moustiques du genre *Aedes*. Il s'agit de l'arbovirose la plus répandue au monde puisqu'elle est présente dans toutes les régions intertropicales (42). Ainsi, on estime que près de 55% de la population mondiale vit dans une zone exposée au virus, celui-ci étant à l'origine d'environ 390 millions d'infections par an (43). La dengue est une infection virale systémique aiguë, le plus souvent autorésolutive mais qui peut se compliquer en dengue sévère sous la forme d'une fièvre hémorragique ou d'un syndrome de choc (42). Il existe quatre sérotypes de DENV, l'infection par l'un d'eux permettant d'acquérir une immunité de longue durée uniquement vis-à-vis de ce sérotype (44). A l'heure actuelle, il n'existe ni traitement ni vaccin.

2.1. Taxonomie

Le virus de la dengue appartient à la famille des *Flaviviridae* et au genre *Flavivirus*. Ce genre comprend de nombreux arbovirus comme le virus du Nil occidental (WNV), le virus de la fièvre jaune (YFV), le virus de l'encéphalite japonaise (JEV) ou encore le virus Zika (ZV) qui a émergé récemment (45). A l'heure actuelle quatre sérotypes de dengue ont été décrits (DENV-1 à DENV-4), chacun comprenant de très nombreux génotypes. L'annonce de la découverte d'un cinquième sérotype au cours de la troisième conférence internationale sur la dengue et la dengue hémorragique en octobre 2013 à Bangkok a semblé dans un premier temps remettre en cause ce constat mais aucune publication n'est venue confirmer cette annonce par la suite (46). Tout comme CHIKV, DENV appartient au groupe IV de la classification de Baltimore.

2.2. Biologie moléculaire

2.2.1. Structure du virion

La particule virale de DENV est globalement sphérique, elle possède une capsid de symétrie icosaédrique ($T=3$) d'un diamètre d'environ 50 nm. La capsid est entourée d'une bicouche lipidique dérivée de la membrane du réticulum endoplasmique de la cellule-hôte (47). On trouve dans cette bicouche des homodimères de protéines d'enveloppe E orientés perpendiculairement à l'axe du diamètre du virion ainsi qu'une protéine de membrane M (fig. 9).

Les protéines d'enveloppe E, de membrane M et de capsid C sont présent en quantité stœchiométrique (48).

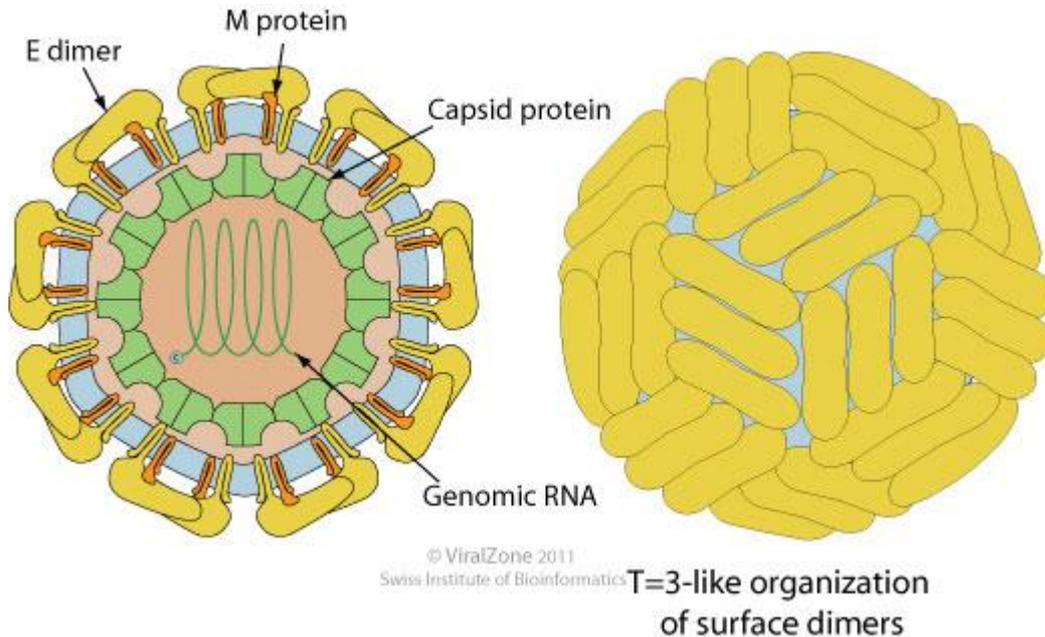


Figure 9 : Structure de DENV. La particule virale est sphérique, enveloppée, de symétrie icosaédrique et possède un diamètre de 50 nm. A la surface de l'enveloppe, on retrouve des dimères de protéine E (ViralZone).

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/43.html

2.2.2. Génome

Le génome de DENV se présente sous la forme d'un ARN simple brin de polarité positive et d'une longueur d'environ 10 700 paires de bases. Deux régions non-codantes situées aux extrémités 5' et 3' entourent un unique cadre de lecture codant une polyprotéine unique (42). Cette polyprotéine est ensuite clivée co- et post-traductionnellement par des protéases virales et cellulaires et permet la synthèse des différentes protéines virales (fig. 10). Les protéines structurales comprennent la protéine d'enveloppe E, la protéine de prM (protéine précurseur de la protéine de membrane M) et la protéine de capsid C. Les protéines non-structurales sont au nombre de sept : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5. L'ARN possède à son extrémité 5' une coiffe de type I (m7GpppA) précédant une structure tige-boucle. Il n'y a aucune queue polyadénylée à son extrémité 3' (49).

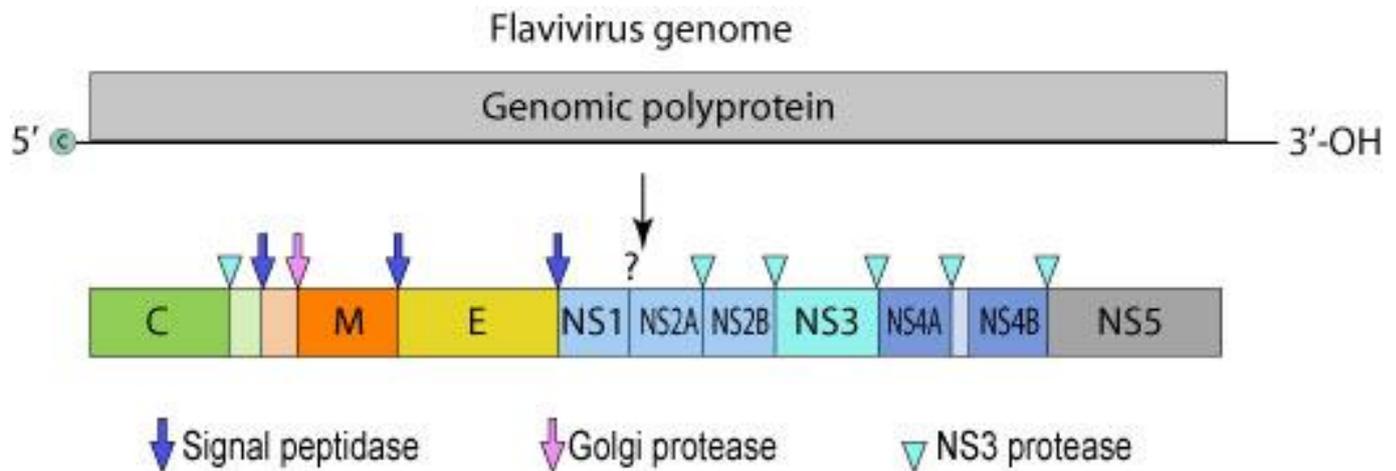


Figure 10 : Structure génomique d'un *Flavivirus*. Le génome de DENV est sous forme d'un ARN simple brin, de polarité positive et code trois protéines structurales (la protéine de capsid C, la protéine de membrane M et d'enveloppe), ainsi que sept protéines non-structurales : NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (ViralZone).

http://viralzone.expasy.org/all_by_species/43.html

2.2.3. Cycle infectieux et réplication virale

L'entrée du virion dans la cellule hôte fait suite à une reconnaissance entre les protéines d'enveloppe E et des récepteurs spécifiques (fig. 11). L'identité de ces récepteurs cellulaires reste relativement obscure bien que certains candidats aient été avancés. Les premiers récepteurs proposés sont des sulfates d'héparane qui permettraient la concentration des particules virales à la surface de la cellule (50). D'autres récepteurs ont également été mis en avant, comme certaines protéines de stress thermique (HSP) ou le récepteur aux lipopolysaccharides CD14, mais leur implication dans l'entrée du virus reste peu claire (51). A l'heure actuelle, les seuls récepteurs du virus de la dengue dont le rôle dans la promotion de l'infection a été reconnu sont DC-SIGN pour les cellules dendritiques, L-SIGN pour les hépatocytes (52), le récepteur au mannose pour les macrophages (53) et des phosphatidylsérines des familles TIM et TAM (54). Suite à la reconnaissance entre les récepteurs cellulaires et la protéine E de DENV, une vésicule d'endocytose se forme par un mécanisme clathrine-dépendant (55). L'acidification de la vésicule conduit à un changement de conformation qui provoque une trimérisation de la protéine E. Celle-ci expose son peptide de fusion par un mécanisme analogue à celui décrit chez les *Alphavirus* (56). L'enveloppe de la particule virale fusionne alors avec la membrane de la vésicule ce qui conduit au relargage de la nucléocapside dans le cytoplasme (57). Il y a ensuite décapsidation de

la molécule d'ARN viral et sa traduction en une polyprotéine par des enzymes cellulaires débute immédiatement. Au cours de sa synthèse, la polyprotéine est clivée en protéines structurales et non-structurales par des protéases de l'hôte et du virus. Suite à cette protéolyse, les protéines néo-synthétisées induisent un remaniement des membranes de la cellule-hôte. Celles-ci s'hypertrophient et forment ensuite des vésicules intracellulaires dans lesquelles des complexes de réplication s'accumulent. Ceux-ci sont formés par l'association de la protéine NS5, qui a une activité ARN-polymérase ARN-dépendante, la protéine-hélicase NS3, d'autres protéines NS et très probablement des facteurs cellulaires (58). La réplication de l'ARN se fait alors en relation étroite avec les membranes cellulaires. L'ARN est transcrit en un brin d'ARN de polarité négative qui servira de matrice à la synthèse de nouveaux brins d'ARN positifs (59). Plus de 90% des brins d'ARN synthétisés dans la cellule infectée sont ainsi des ARN positifs, les brins d'ARN négatifs étant uniquement présents sous forme d'intermédiaires répliatifs cycliques (60). L'ARN viral nouvellement synthétisé s'associe ensuite avec la protéine de capsid C par un mécanisme non élucidé à l'heure actuelle (49). La nucléocapsid bourgeonne alors dans la lumière du réticulum endoplasmique et acquiert par ce phénomène son enveloppe lipidique dans laquelle sont enchâssées prM et E. Le clivage protéolytique de prM en M mature se fait par l'intermédiaire de furines cellulaires présentes dans la lumière de l'appareil de Golgi. Ce clivage permet l'homodimérisation de E et confère au virion la capacité d'infecter une nouvelle cellule-hôte (61). Comparativement aux *Alphavirus*, la durée du cycle viral est relativement longue puisqu'il faut une dizaine d'heures au DENV pour compléter un cycle infectieux contre seulement quatre heures pour CHIKV.

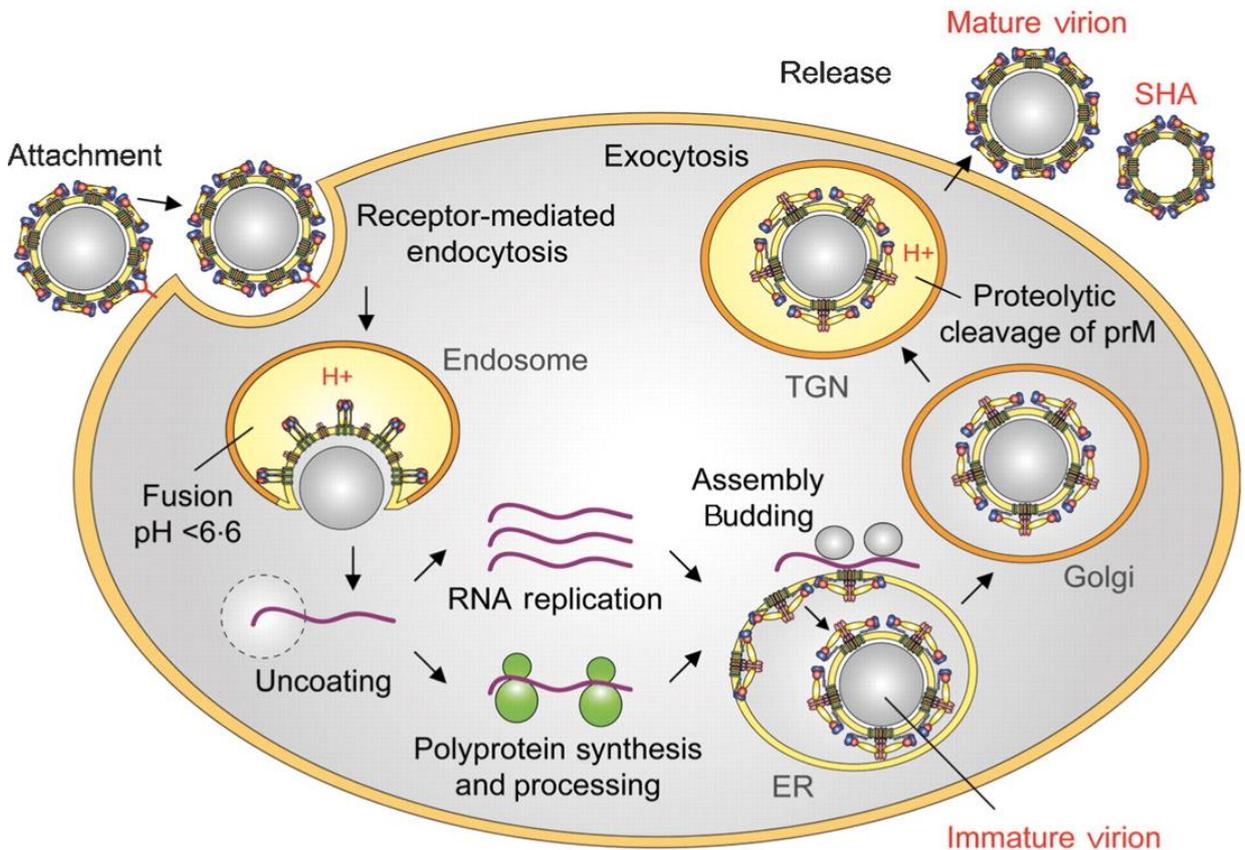


Figure 11 : Cycle infectieux intracellulaire de DENV. Le virus se lie dans un premier temps à un récepteur spécifique puis pénètre dans la cellule par un mécanisme d'endocytose dépendant des clathrines. Ensuite, l'acidification de l'endosome entraîne la trimérisation de la protéine E qui expose alors son peptide de fusion. La nucléocapside se retrouve dans le cytoplasme où la réplication débute par la synthèse d'une polyprotéine. Celle-ci est ensuite clivée en protéines structurales et non-structurales. Le complexe de réplication, formé de protéines non-structurales et de facteurs cellulaires, synthétise un intermédiaire de réplication qui permet la synthèse de nouveaux brins d'ARN viraux. La nucléocapside s'assemble puis bourgeonne dans la lumière du réticulum. Les protéines prM sont alors maturées après clivage par des furines situées dans l'appareil de Golgi. Le virion, désormais infectieux, emprunte les voies de sécrétion cellulaires pour sortir de la cellule (57).

2.3. Epidémiologie

2.3.1. Historique

La première description de symptômes compatibles avec la dengue a été retrouvée dans une encyclopédie médicale chinoise rédigée au cours de la dynastie Jin (265-420 après J-C). A cette époque, le rôle des insectes volants dans la transmission de cette maladie était déjà pointé du doigt (62). Des symptômes ressemblant fortement à ceux provoqués par la dengue associés à des caractéristiques épidémiologiques semblables font penser que les deux épidémies qui se sont produites en 1635 et en 1699, respectivement en Inde et en Amérique Centrale, sont dues au DENV (63). Une épidémie majeure a également eu lieu à Philadelphie en 1780. Dès lors, le virus est devenu endémique et a provoqué de nombreuses épidémies sur le territoire des Etats-Unis, la dernière épidémie ayant eu lieu en 1945 à la Nouvelle-Orléans (64). La première phase d'expansion de la dengue a eu lieu au cours de la Seconde Guerre mondiale à l'occasion des importants déplacements de troupes et l'utilisation de moyens de transport modernes. Des foyers d'hyperendémicité (présence de plusieurs sérotypes dans la même zone géographique) ont alors été pour la première fois détectés en Asie du sud-est (65). Après la guerre, DENV a été en net recul en Amérique du sud en raison d'efforts importants de démoustication dans le cadre de la lutte contre la fièvre jaune (66). Cependant, à partir des années 1970, les campagnes d'éradication se sont espacées et, en 1995, la situation était la même que celle d'avant la mise en place de systèmes de contrôle vectoriel (65) (fig. 12).

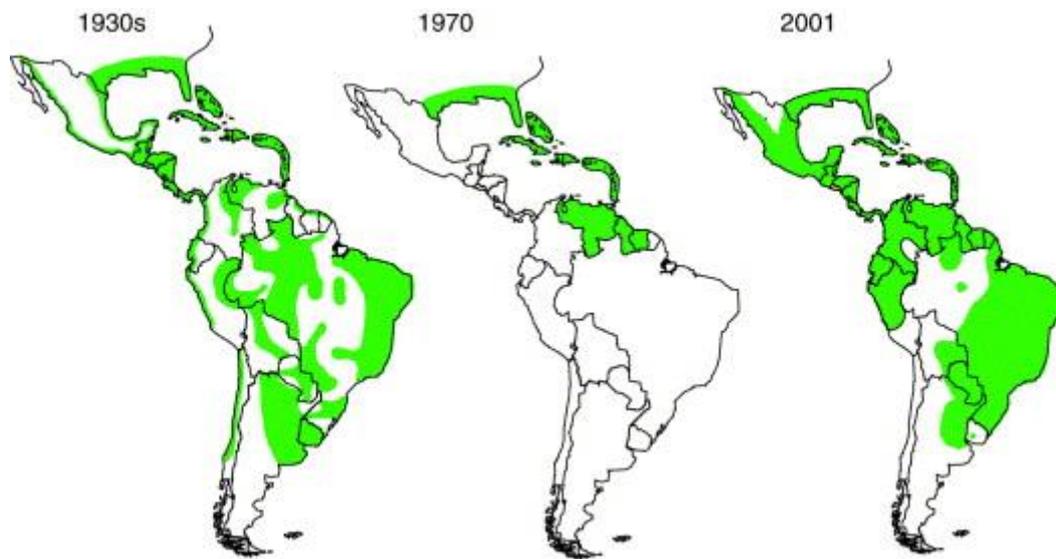


Figure 12 : Distribution d'*Aedes aegypti* sur le continent américain. A gauche : 1930, au centre : 1970, à droite : 2001 (Center for Disease Control and Prevention).

<http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/4/3/98-0326-f4>

De façon globale, la situation mondiale s'est considérablement dégradée en 50 ans, de nombreux pays passant d'une situation non-endémique puis hypoendémique et enfin hyperendémique (67). Parallèlement, le nombre de cas de dengue sévère a explosé depuis les années 70 : seulement neuf pays connaissaient cette forme de la maladie, ils sont désormais plus de 6 fois plus nombreux (fig. 13).

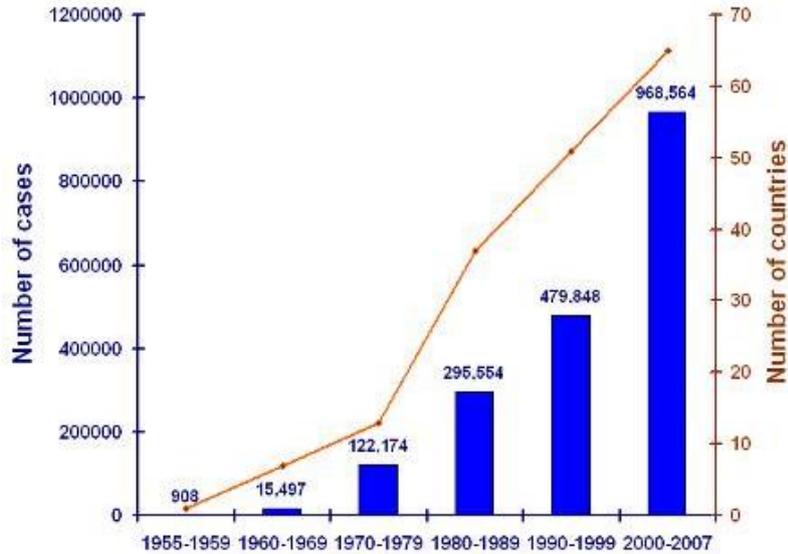


Figure 13: Nombre moyen annuel des cas de dengue sévère rapportés à l’OMS et nombre moyen annuel de pays rapportant des cas de dengue (OMS)

<http://www.who.int/csr/disease/dengue/impact/en/>

2.3.2. Situation actuelle

Selon l’OMS, 3.6 milliard de personnes réparties dans 126 pays vivaient en zone d’endémicité de dengue, celle-ci provoquant chaque année de 50 à 200 millions d’infections, 500 000 cas de dengue sévère et plus de 20 000 décès, principalement des enfants (68). Globalement, les zones où la dengue peut être contractée se situent en régions intertropicales, latitudes où *Aedes aegypti* (le principal vecteur) est connu pour pouvoir survivre toute l’année (fig. 14).

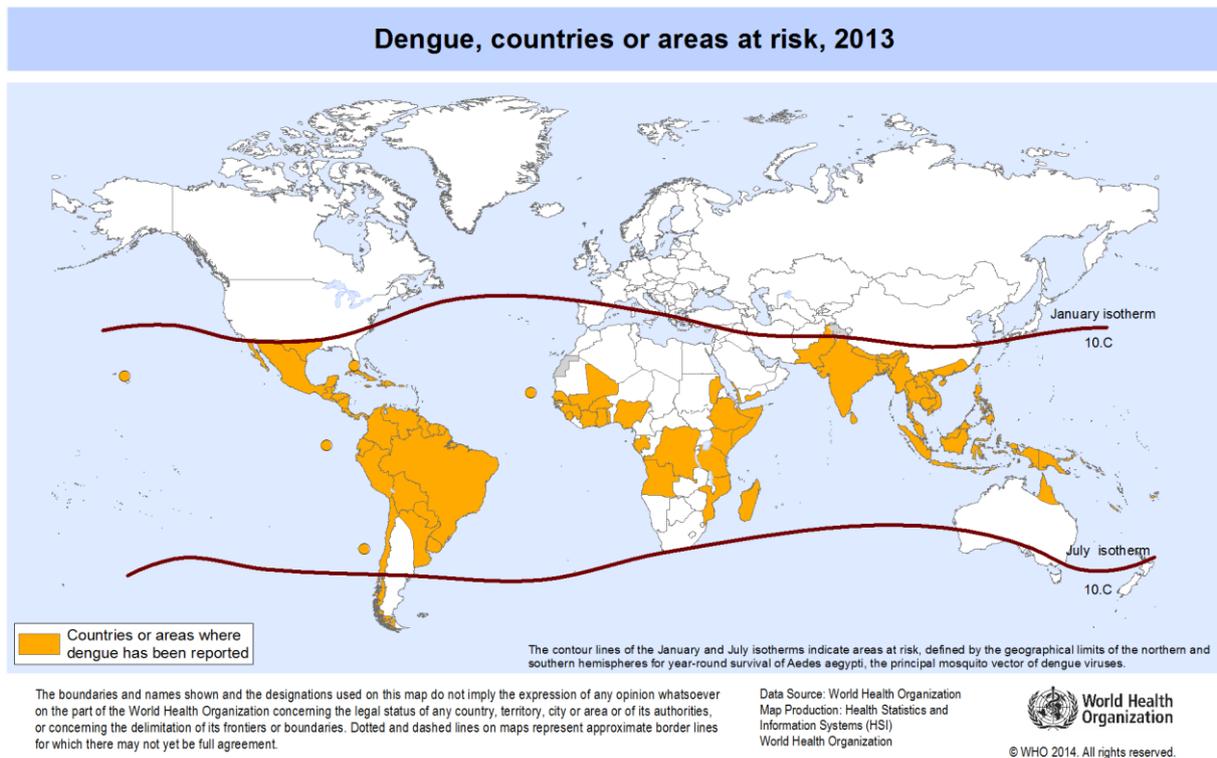


Figure 14 : Répartition mondiale du virus de la dengue (en jaune). Les lignes rouges représentent les isothermes de janvier et d'août délimitant une zone où la température ne descend pas en dessous de 10°C, température à laquelle *Aedes aegypti* peut survivre (OMS).

<http://www.who.int/ith/>

Ces chiffres, associés à l'expansion rapide de la maladie, ont conduit l'OMS à qualifier la dengue d'arbovirose la plus préoccupante en termes de santé publique à l'heure actuelle. De plus, en raison de la faiblesse du réseau de surveillance, le nombre de cas de dengue avancé est très approximatif et pourrait être beaucoup plus important. Ainsi, une étude se fondant sur une estimation du nombre de cas réellement rapportés et sur une approche cartographique propose que le nombre de cas annuel de dengue se rapprocherait plutôt de 390 millions pour 128 pays en situation d'endémie (43). 75% des personnes exposées à la dengue vivent en Asie du sud-est, où elle constitue l'une des causes majeures d'hospitalisations et de décès chez les enfants (67).

En Europe, le risque d'émergence de la dengue est pris très au sérieux en raison du nombre de cas importés et de la présence sur le continent d'une espèce vectrice de la maladie : *Aedes albopictus*. En 2010, les premières infections locales ont été rapportées, à la fois en Croatie (69) et en France, dans le Var (70). Entre octobre 2012 et février 2013, une épidémie sur

l'île de Madère, au Portugal, a provoqué 2164 cas (71). Enfin, entre le 20 août et le 19 septembre 2014, deux cas autochtones de dengue ont été confirmés dans le département du Var (72) et un dans celui des Bouches-du-Rhône (73). L'Europe, qui a été épargnée par la dengue pendant la majeure partie du 20^{ème} siècle, est désormais elle aussi concernée par cette maladie.

2.3.3. Vecteurs et réservoirs

Bien que le rôle des insectes volants dans la transmission de la dengue ait très tôt été suspecté, il a fallu attendre le 20^{ème} siècle pour que le statut de maladie vectorielle soit définitivement attribué à la dengue (71). Deux vecteurs sont majoritairement impliqués dans la transmission de DENV à l'Homme. Il s'agit d'*Aedes aegypti*, le vecteur principal, et d'*Aedes albopictus* (74). Ce constat est notamment corroboré par le fait que les zones d'endémies de dengue recourent de façon quasi-systématique les zones où *Aedes aegypti* est présent (fig. 15).

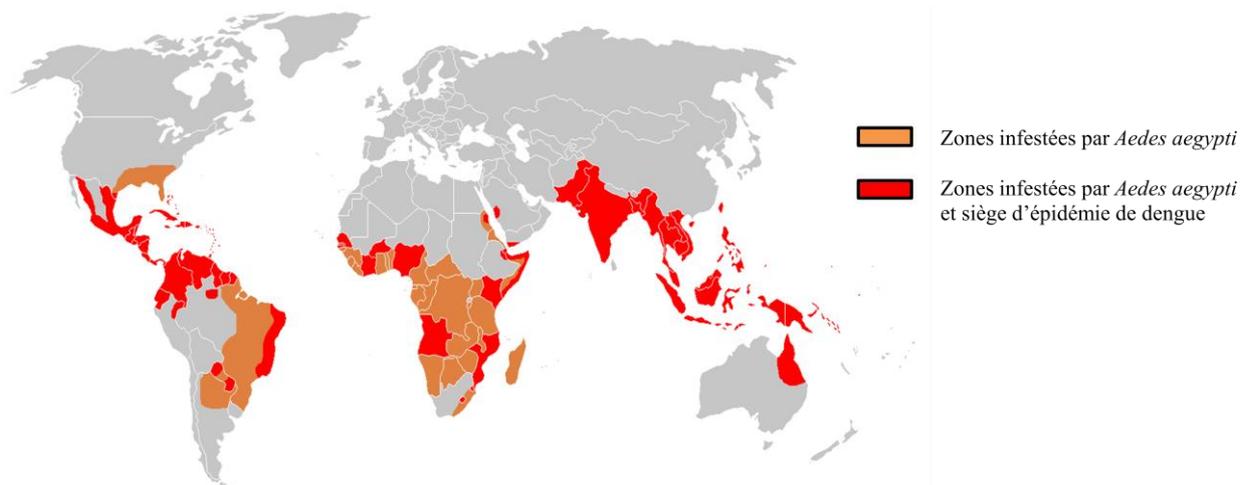


Figure 15 : Localisation du virus de la dengue et de son vecteur principal : *Aedes aegypti* (63)

De façon générale, *Aedes aegypti* apparaît comme moins susceptible à l'infection par DENV qu'*Aedes albopictus*, ce qui pourrait agir comme un mécanisme de sélection des souches les plus virulentes. L'hypothèse est qu'une moindre susceptibilité au virus entraîne une capacité à être infecté seulement après gorgement sur un hôte présentant des titres viraux élevés. Or, une virémie élevée a été corrélée à une plus forte probabilité de dengue sévère. Au contraire, *Aedes albopictus* peut facilement transmettre des souches qui ne se répliquent pas intensément, il en résulterait donc moins de cas sévères. Ainsi, *Aedes albopictus* aurait un rôle de maintenance de DENV entre les épidémies en transmettant le virus de façon silencieuse (42).

Cependant, la survenue de cas sévères ne dépend pas uniquement de la souche transmise mais également de multiples interactions entre le virus, le vecteur et l'hôte, interrelations qui demeurent largement méconnues à l'heure actuelle (75). Comme pour CHIKV, l'infection de la femelle moustique se fait au cours du repas sanguin sur un hôte virémique. Dès le deuxième jour suivant l'ingestion du repas sanguin, le virus se multiplie dans les cellules épithéliales de l'intestin moyen puis dissémine aux autres organes du moustique. Parmi ces organes, on compte les glandes salivaires, où le virus se réplique activement, avant de franchir la barrière de transmission et qu'il soit retrouvé dans la salive. Le moustique est dès lors infectant et capable de transmettre le virus au cours d'une piqûre. On estime à une dizaine de jours la période d'incubation extrinsèque de la dengue, mais cette durée varie en fonction de l'espèce de moustique étudiée, du sérotype du virus, de la souche, de la température, *etc...* (76)

Le cycle de transmission de la dengue peut prendre trois formes différentes selon l'environnement dans lequel il se déroule (fig. 16). La première est une forme sylvatique qui implique des primates non-humains et des moustiques du genre *Aedes*, principalement en Afrique et en Asie. En Afrique, les moustiques impliqués sont *Aedes micropterus* et la forme sylvatique d'*Aedes aegypti*. En Asie, on retrouve toujours cette dernière, accompagnée d'*Aedes japonicus*. Un épisode de transmission peut alors avoir lieu vers une zone rurale ou vers un village, où un cycle rural épidémique peut se dérouler. En plus d'*Aedes aegypti*, on retrouve alors impliqué dans le cycle *Aedes albopictus*, *Aedes polynesiensis* et *Aedes mediovittatus*. Le dernier cycle est uniquement urbain et peut avoir une forme endémique ou épidémique. Le cycle s'enclenche le plus souvent lorsqu'un individu infecté se trouve en zone citadine. Le principal vecteur impliqué est la forme urbaine d'*Aedes aegypti* auquel s'ajoute ou se substitue parfois *Aedes albopictus* (63).

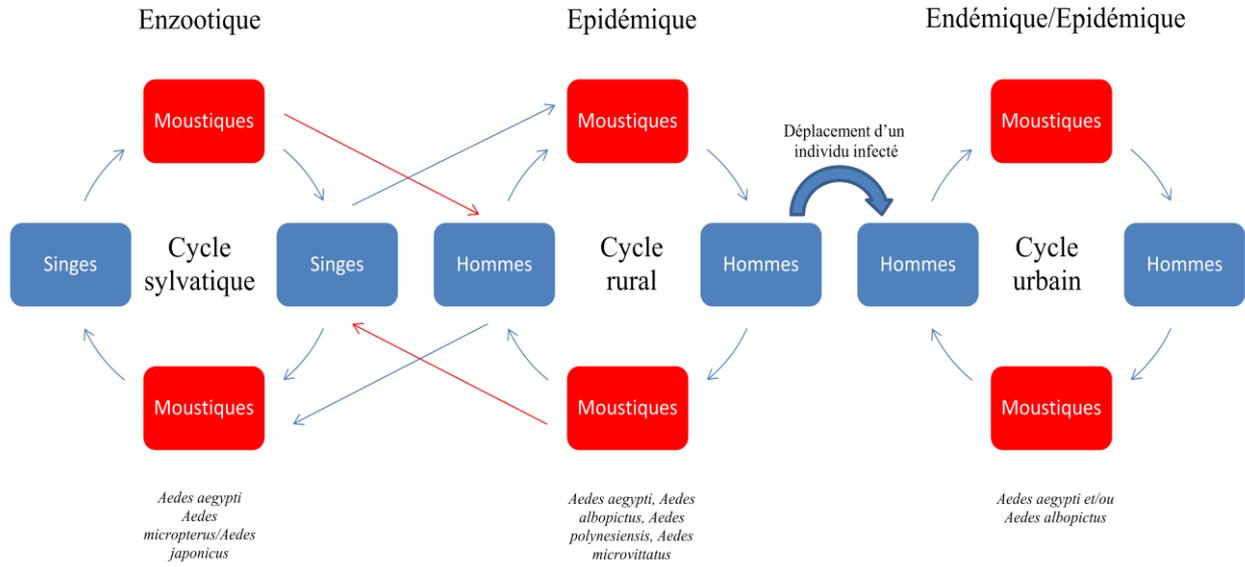


Figure 16 : Cycles de transmission du virus de la dengue. DENV possède trois types de cycles de transmission. Le premier est enzootique, se situe en zone forestière et implique des primates non-humains. Le second est épidémique et situé en zone rurale. Le troisième est urbain, épidémique ou endémique et dépend principalement d'*Aedes aegypti* et, dans une moindre mesure, d'*Aedes albopictus* (63).

2.4. Physiopathologie de l'infection

2.4.1. Symptômes

En raison de la présentation clinique initiale, la dengue est parfois qualifiée de « grippe tropicale » ou de « petit palu ». Après une période d'incubation de 3 à 15 jours (en général 5 à 8 jours), les formes classiques de dengue commencent par un épisode aigu de fièvre élevée, avec une température régulièrement retrouvée supérieure à 40°C. La phase fébrile s'accompagne parfois d'une déshydratation pouvant entraîner la survenue de troubles neurologiques, particulièrement chez l'enfant (77). Au cours de la phase clinique, le patient est souvent atteint de violents maux de tête, de douleurs rétro-orbitaires, de myalgies et d'arthralgies. On observe généralement une phase de rémission de deux à trois jours puis une reprise de la symptomatologie initiale. Des pétéchies et des éruptions cutanées plus ou moins prurigineuses se développent parfois 3 à 5 jours après le début de la fièvre, le plus souvent du tronc vers les extrémités (44). La plupart du temps, les symptômes disparaissent en une semaine.

L'infection par DENV peut cependant prendre une forme beaucoup plus sévère, avec une dengue hémorragique ou un syndrome de choc de dengue. Ces formes sévères sont le plus

souvent observées chez les enfants (78). Les formes de dengue hémorragique se manifestent par des pétéchies, des saignements des gencives ou gastro-intestinaux, de l'épistaxis ou des ménorragies. Le patient présente également une thrombocytopénie plus ou moins sévère (comptage plaquettaire $\leq 100\ 000$ plaquettes. mm^{-3} de sang). Sans prise en charge adaptée, la plupart des patients évoluent vers un syndrome de choc de dengue en raison des pertes plasmatiques subies (63). Le taux de mortalité chez les patients atteints par une forme symptomatique se situe entre 1% et 2,5%, mais peut s'élever à près de 20% pour ceux présentant une forme sévère (42).

2.4.2. Dissémination du virus chez l'hôte vertébré

Après inoculation du virus par une piqûre infectante, les premières cellules cibles du virus semblent être les kératinocytes (79), population cellulaire la plus nombreuse dans les couches superficielles de la peau. Une autre population a été présentée comme étant la cible principale de DENV dans les phases précoces de l'infection. Il s'agit des précurseurs des cellules dendritiques (80). Ces cellules s'activent au cours de leur migration vers les nœuds lymphatiques et seraient responsables de l'infection de ces organes lymphoïdes secondaires et d'une intense amplification virale (81). D'autres types cellulaires, comme les monocytes ont également été évoqués (82). L'infection des autres organes cibles se ferait alors par l'infiltration de monocytes infectés. Par ce mécanisme, la rate, le foie et la moelle osseuse sont secondairement infectés (83).

Le rôle des cellules endothéliales dans l'évolution vers une forme sévère de dengue n'est pas encore tranché. La survenue de forme hémorragique ou de syndrome de choc de dengue s'accompagne d'une perte systémique de la perméabilité vasculaire. Or, si le virus de la dengue est capable d'infecter et de provoquer la lyse des cellules endothéliales (84), il est possible d'observer des patients présentant une forme sévère de dengue en l'absence de lyse des cellules endothéliales (85). Le consensus qui se dégage actuellement est que l'infection des cellules endothéliales perturberait fortement leur capacité à combler les brèches vasculaires sans que leur propre intégrité soit forcément menacée. Cette perturbation expliquerait les pertes plasmatiques importantes observées chez les patients atteints de dengue sévère.

2.4.3. Facteurs de risque associés à la survenue de dengue sévère

L'étude des facteurs de risque permettant d'anticiper une complication en dengue sévère constitue à l'heure actuelle un champ de recherche prioritaire. Malgré l'intensité des efforts consentis, de nombreuses données sont encore manquantes. Cependant, de multiples facteurs de risque ont pu être mis en évidence avec, parfois, une description des mécanismes associés. Ainsi, il est couramment admis qu'un jeune âge est associé à un risque plus élevé de dengue sévère (86), probablement en raison d'une plus grande fragilité du réseau vasculaire. Cependant, il n'y a pas de réel consensus, certaines études montrant une prévalence relative plus élevée chez les adultes (87). De même, si chaque sérotype peut potentiellement provoquer une dengue sévère, certains ont démontré une pathogénicité comparativement plus importante. Ainsi, une étude prospective réalisée de 1994 à 2006 à Bangkok, en Thaïlande, a révélé que les sérotypes 2 et 3 ont été plus souvent associés à des cas de dengue sévères, alors que les sérotypes 1 et 4 occasionnaient des manifestations généralement moins graves de la maladie (88). De même, certains génotypes sont connus pour être particulièrement pathogènes (89). Cependant, ce type d'études se limite très souvent à une zone géographique précise, pour une population aux caractéristiques génétiques données, il est donc hasardeux d'extrapoler ces conclusions à un cas général.

Outre les facteurs génétiques (90), l'une des prédispositions les mieux documentées à une dengue sévère est une infection secondaire par un sérotype différent. En effet, lorsqu'un individu est infecté par un sérotype, il acquiert certes une immunité de longue durée contre ce dernier, mais il présente également 15 à 80 fois plus de risques de déclencher une dengue sévère en cas d'infection par un sérotype différent (91). Deux hypothèses ont été proposées pour expliquer ces observations. La première, appelée « péché antigénique originel », se base sur l'observation que la forme sévère de la maladie est associée à une sur-activation des lymphocytes T mémoires. L'infection par un sérotype hétérologue stimulerait la population de lymphocyte T préexistante, de faible spécificité pour le nouveau sérotype. Cette sur-activation aboutirait à la production de taux très élevés de cytokines comme le *tumor necrosis factor α* (TNF α) à l'origine des dommages vasculaires, sans neutralisation du virus (92). La seconde hypothèse avancée propose là encore un dysfonctionnement du système immunitaire pour expliquer l'incidence élevée de

dengue sévère en cas de seconde infection. Ici, l'infection par un sérotype hétérologue provoque une réponse mémoire massive en anticorps de faible avidité pour le nouveau sérotype. Ainsi, non-seulement le virus n'est pas neutralisé efficacement, mais l'infection des macrophages est facilitée par un mécanisme d'opsonisation (93). La recherche concernant les facteurs de risque doit se poursuivre de façon à permettre au personnel médical d'apporter au plus tôt un traitement adapté aux patients susceptibles d'évoluer vers une forme de dengue grave.

2.5. Traitements et vaccins

Il n'existe à l'heure actuelle ni traitements spécifiques ni vaccins permettant de prendre en charge ou de prévenir une infection par DENV. Le protocole de soin inclut le plus souvent du repos, une réhydratation par voie orale ainsi qu'une prescription d'antipyrétiques et d'analgésiques. En raison des risques de pertes plasmatiques et de gastrites, le paracétamol doit être préféré à l'acide acétylsalicylique (aspirine) ou aux anti-inflammatoires non-stéroïdiens (94). En cas de suspicion de dengue hémorragique ou de syndrome de choc de dengue, il est vital de mettre en place une réhydratation par voie intraveineuse, à l'aide de lactate de Ringer ou, dans les cas les plus préoccupants, un colloïde isotonique (95). La ribavirine a été testée contre DENV mais les essais cliniques se sont révélés décevants (96). La mise au point de thérapeutiques antivirales ciblées se concentre principalement sur les changements conformationnels de la protéine d'enveloppe E et ses conséquences sur son interaction avec prM et M. Par ce biais, il serait potentiellement possible de cibler l'entrée du virus dans la cellule, ainsi que la phase d'assemblage et de maturation de la particule virale (97). Cependant, ce type de recherche n'a toujours pas abouti et se heurte à de nombreuses difficultés, la principale étant l'importante variabilité génétique des protéines d'enveloppe.

Cette variabilité est également un obstacle majeur à la mise au point d'un vaccin. En effet, pour être efficace, un vaccin doit induire une immunité de longue durée contre chacun des quatre sérotypes DENV. Pour autant, certains tentent de relever ce défi. Au cours de ces dix dernières années, près de 25 candidats ont été testés, sans qu'aucun ne soit commercialisé (42). Le projet le plus avancé à l'heure actuelle est un vaccin constitué de 4 virus atténués produits par recombinaison entre le virus du vaccin contre la fièvre jaune (virus 17D) et les 4 sérotypes de DENV. Ce vaccin, développé par Sanofi Pasteur a démontré son innocuité mais son efficacité est critiquée car il apporte une protection dans seulement 56,5% des cas (98). Le principal intérêt de

ce vaccin pourrait résider dans la prévention des cas sévères puisque l'essai clinique rend compte d'une diminution de près de 90% des cas de dengue hémorragique ou de syndrome de choc de dengue après vaccination (99). Ainsi, aucune protection spécifique contre DENV n'est encore disponible, et la lutte anti-vectorielle constitue toujours la meilleure prévention malgré les difficultés croissantes rencontrées dans l'éradication des moustiques.

3. Un vecteur commun : *Aedes albopictus*

3.1. Position systématique

Embranchement des Arthropodes : lignée des Invertébrés à squelette chitineux externe, caractérisés par un corps segmenté, un exosquelette et dont les membres ou appendices sont constitués d'articles.

Sous embranchement des Antennates : possèdent une paire de mandibules, 1 ou 2 paires d'antennes, un système respiratoire branchial ou trachéen.

Classe des Insectes : désignent un animal invertébré, arthropode de petite taille, et constitué de trois parties avec une tête, un thorax et un abdomen et de trois paires de pattes à l'état adulte.

Sous classe des Ptérygotes : désignent tout insecte fondamentalement pourvu d'ailes. Les ailes pouvant disparaître secondairement.

Ordre des Diptères : Insectes qui possèdent deux ailes antérieures, les ailes postérieures étant transformées en balancier (ou haltères).

Sous-ordre des Nématocères : sous-ordre d'Insectes Diptères caractérisés par leurs longues antennes.

Famille des Culicidae : caractérisés par des antennes longues et fines à multiples articles, par des ailes pourvues d'écailles, et par des femelles possédant de longues pièces buccales en forme de trompe rigide de type piqueur-suceur.

Sous-famille des Culicinae.

Genre : *Aedes*.

Sous-genre : *Aedes (Stegomyia)*.

Espèce : *Aedes albopictus* (100).

3.2. Description morphologique

3.2.1. Adulte

Aedes albopictus, également appelé « moustique tigre » ou « moustique tigré d'Asie », porte des rayures blanches caractéristiques sur ses pattes (fig. 17). Il se distingue des moustiques du même genre par la présence d'une ligne longitudinale blanche sur son thorax noir, visible à l'œil nu. Ce moustique mesure à l'âge adulte de 5 à 10 mm de longueur (101). Les mâles sont légèrement plus petits que les femelles mais présentent la même morphologie générale à l'exception des antennes et des pièces buccales (102).

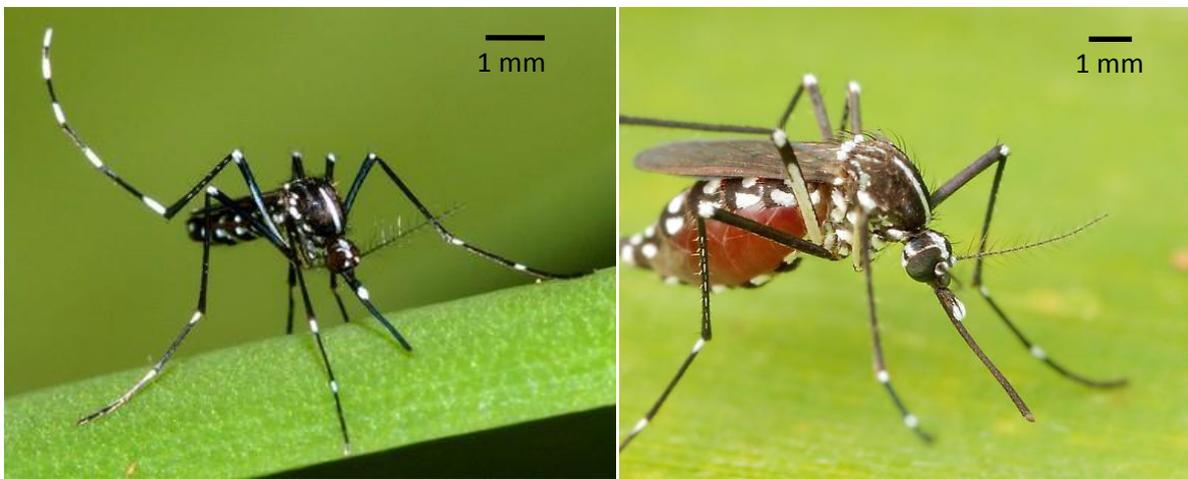


Figure 17 : Vues macroscopiques de moustiques *Aedes albopictus* femelles non-gorgée (à gauche) et gorgée (à droite). La ligne blanche présente sur le thorax des *Aedes albopictus*, est caractéristique de l'espèce.

<http://bugguide.net/node/view/445573/bgpage>

Comme tous les Insectes, le corps d'*Aedes albopictus* est divisé en trois parties distinctes : la tête, le thorax et l'abdomen (fig.18).

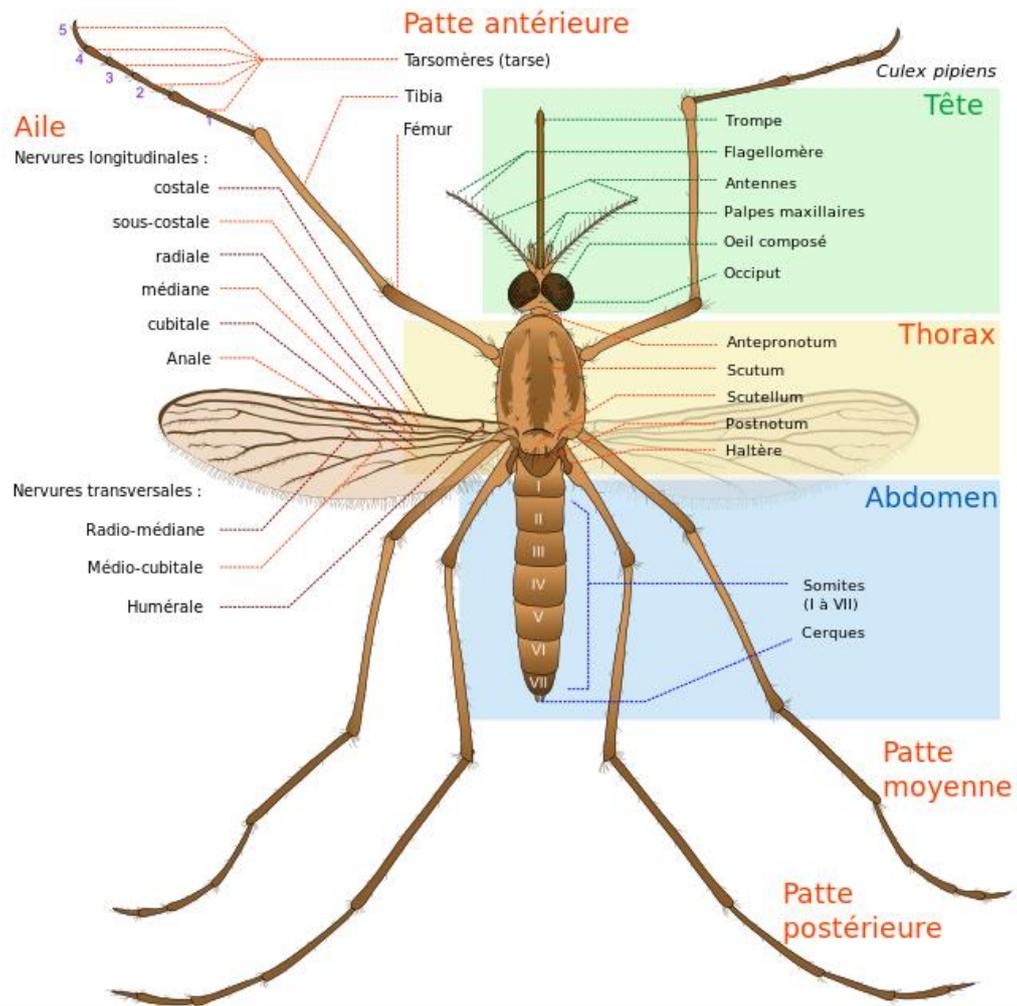


Figure 18 : Schéma d'un moustique femelle adulte

http://en.wikipedia.org/wiki/File:Culex_pipiens_diagram_en.svg#mediaviewer/File:Culex_pipiens_diagram_fr.svg

La tête présente une paire d'yeux composés, les pièces buccales ainsi qu'une paire d'antennes. Chez les mâles, ces antennes sont ornées de multiples et longues soies qui donnent un aspect plumeux à ces appendices. Chez la femelle, elles sont plus courtes et moins nombreuses (fig. 19).

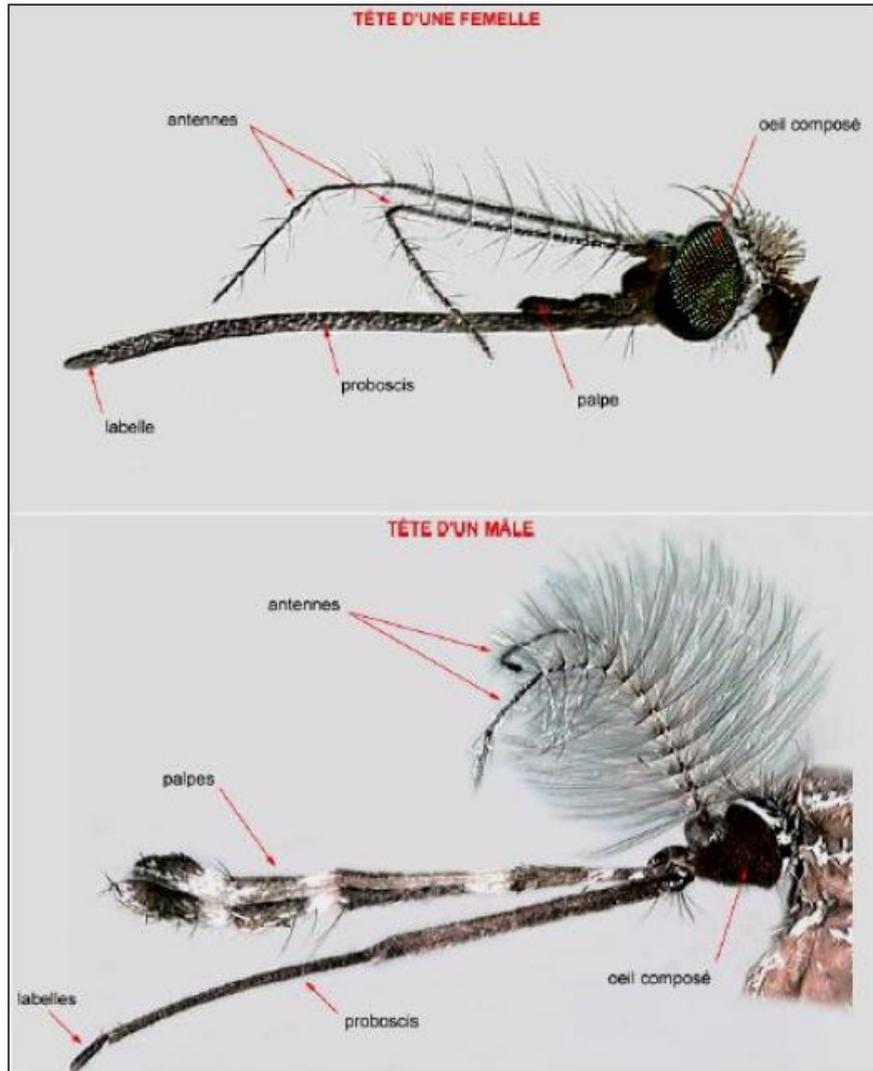


Figure 19 : Dimorphisme sexuel de la tête de moustiques mâles et femelles. Chez la femelle, les antennes sont presque glabres alors que chez le mâle, elles arborent de longues soies qui leurs donnent un aspect touffues (Institut pour la recherche et le développement).

http://www.inma.fr/files/file/diplome/dip_mem/dip_mem_2012_26_vacus.pdf

Les pièces buccales sont de type piqueur-suceur (fig. 20). La trompe est un organe impair situé dans la partie inféro-médiane. Sa structure est différente selon les sexes : chez la femelle, hématoophage, la trompe est composée de trois pièces impaires: l'épipharynx, l'hypopharynx et le labium, et de quatre pièces paires et symétriques, deux mandibules en haut, deux maxilles en bas. Chez les mâles, qui ne se nourrissent pas de sang mais de sucs végétaux, seuls persistent l'épipharynx et le labium.

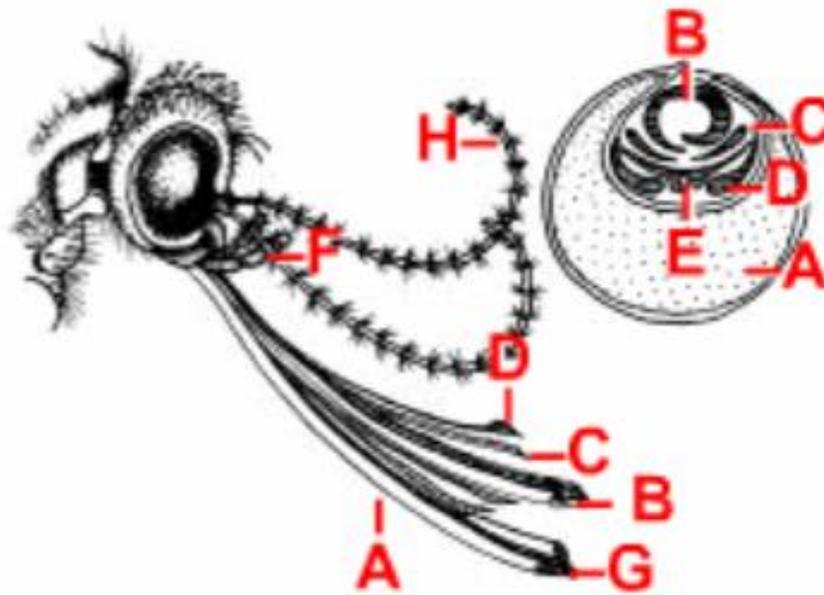


Figure 20 : Pièces buccales d'un moustique femelle. A : Labium, B : Labre, C : Maxille, D : Mandibule, E : Hypopharynx, F : Palpe maxillaire, G : Labelle, H : Antenne.

http://simulium.bio.uottawa.ca/bio2525/Notes/Les_Arthropodes.htm

Le thorax est composé de trois segments soudés (de la tête vers l'abdomen : mésonotum, scutellum et postnotum). Il porte trois paires de pattes, une paire d'ailes membraneuses et une paire de balanciers (ou haltères). Les balanciers sont les vestiges des ailes antérieures et permettent l'équilibre du moustique en vol (fig. 18).

L'abdomen est formé de dix segments dont huit sont visibles, les deux derniers segments formant les appendices génitaux. Le dixième segment porte le pénis chez le mâle, les cerques chez la femelle. Le corps du moustique est recouvert d'un tégument composé de plaques rigides appelées sclérites. Elles sont reliées par une membrane chitineuse souple qui permet leur articulation. Chaque métamère est formé par un sclérite dorsal (tergite) et un sclérite ventral (sternite).

3.2.2. Œuf

Les œufs, fusiformes, sont de couleur noire et dépourvus de flotteurs latéraux (fig. 21). Ils mesurent environ 1 mm de longueur. La coque épaisse permet une résistance importante à la dessiccation. Le pôle antérieur de l'œuf est pourvu d'un micropyle.



Figure 21 : Vue macroscopique d'œufs d'*Aedes albopictus*

<http://previews.agefotostock.com/previewimage/bajaage/f84a71213eabff01c61d2ce0948176f5/195-637171.jpg>

3.2.3. Larve

La larve, mesurant de 2 à 12 mm, est vermiforme, cylindro-conique et apode (fig. 22). La larve d'*Aedes albopictus* est très similaire à celle d'*Aedes aegypti* mais elle est de couleur brun clair (102). Elle est mobile et a un mode de vie exclusivement aquatique. La respiration est permise par la présence d'un siphon à l'extrémité de l'abdomen ce qui explique sa position oblique par rapport à la surface de l'eau lorsqu'elle respire (103) (fig. 22). Elle présente trois parties distinctes : tête, thorax, abdomen. Au cours de son développement, elle subit trois mues successives avant de se transformer en nymphe.



Figure 22 : Vue macroscopique de larves *Aedes albopictus* respirant à la surface de l'eau

<http://www.todayonline.com/singapore/more-seeking-pest-control-services-amid-dengue-epidemic>

3.2.4. Nymphe

La nymphe est une puppe apode en forme de virgule (fig. 23). Elle est mobile mais ne se nourrit pas. Elle est formée d'un abdomen et d'un céphalothorax globuleux. Sur celui-ci, on remarque deux trompes siphonothoraciques respiratoires.



Figure 23 : Vue macroscopique d'une nymphe *Aedes albopictus* respirant à la surface de l'eau

http://fmel.ifas.ufl.edu/key/genus/aedes_albo.shtml

3.3. Cycle de développement

Comme tous les moustiques, *Aedes albopictus* a une activité rythmée, saisonnière et nycthémérale. Il est retrouvé principalement en zone urbaine où il profite de gîtes anthropiques, c'est-à-dire créés par l'Homme, pour pondre. Ainsi, des soucoupes, des vases ou des pneus contenant de l'eau stagnante sont des sites de ponte idéaux pour les femelles *Aedes albopictus*. L'émergence, qui caractérise le passage du stade nymphal au stade imaginal, correspond également à la transition entre un mode de vie aquatique et un mode de vie aérien (fig. 24). Elle

est rapidement suivie par l'accouplement. Chaque femelle s'accouple une unique fois, les spermatozoïdes étant stockés temporairement dans une spermathèque.

Concernant l'alimentation, les adultes se nourrissent principalement de sucres végétaux (nectar, sève). Néanmoins, alors que les mâles utilisent uniquement cette source d'alimentation, l'appareil buccal des femelles est adapté à la prise d'un repas de sang sur un hôte vertébré. Celui-ci permet au moustique tigre femelle d'obtenir les nutriments indispensables à la maturation des œufs. Ainsi, 48 heures après le repas de sang, les femelles fécondées pondent leurs œufs sur les parois sèches de gîtes larvaires potentiels, c'est-à-dire situés à proximité immédiate de points d'eaux stagnantes. Chaque femelle peut déposer de 100 à 400 œufs par ponte, avec une fécondité totale variant de 800 à 2500 œufs. Ceux-ci peuvent résister jusqu'à 243 jours à la dessiccation puis éclore à la faveur d'une mise en eau (104).

Ils éclosent alors 24 à 48 heures après la ponte en fonction des conditions météorologiques et libèrent des larves mobiles qui s'alimentent ou se maintiennent au repos sous la surface de l'eau. Les larves ont une croissance discontinue et passent par trois mues successives puis se transforment en nymphes (nympheose) six à dix jours après l'éclosion. Ces nymphes sont également mobiles mais ne se nourrissent pas. Elles effectuent leur mue imaginale en 24 à 48 heures et libèrent à la surface de l'eau un moustique adulte mâle ou femelle (fig. 24).

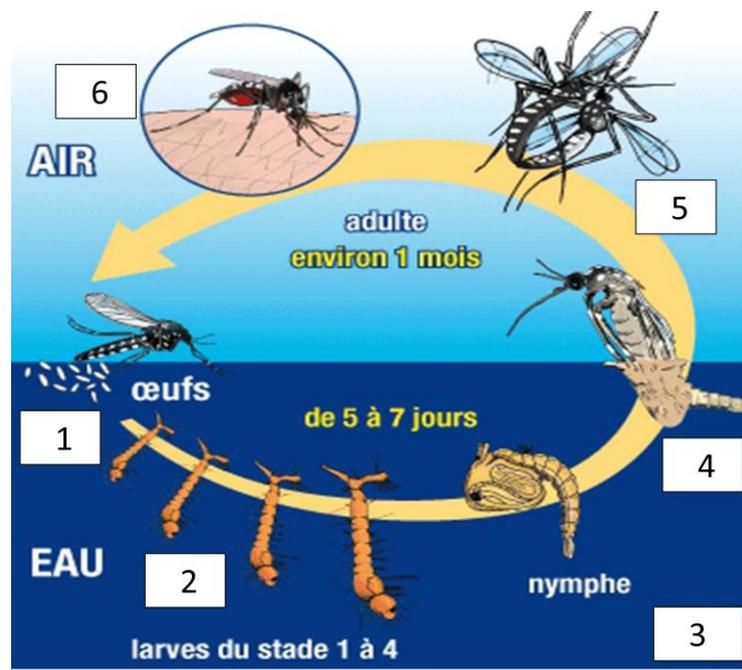


Figure 24 : Les différentes étapes du développement : 1-Ponte sur l'eau ou à proximité immédiate de l'eau, 2-Eclosion, les œufs libèrent les larves, 3-La larve, suivant quatre stades, se transforme en nymphe (nymphose), 4-Emergence de la forme adulte (ou imago) mâle ou femelle, 5 et 6-Vie extra-aquatique de l'adulte (copulation et repas de sang par la femelle).

<http://www.brigade-verte.fr/demoustication/les-moustiques>

Les femelles ont une durée de vie moyenne estimée de 30 à 40 jours en captivité avec une longévité maximale de 117 jours. Les mâles ont une durée de vie sensiblement plus courte (102). En milieu naturel, l'espérance de vie est beaucoup plus faible, une étude réalisée dans le Missouri évaluant celle-ci à 8,2 jours pour les femelles et 3,9 jours pour les mâles (105).

3.4. Répartition géographique

Le moustique tigre est classé parmi les cents espèces les plus invasives du monde en raison de sa grande capacité d'adaptation et du nombre de régions du monde qu'il a déjà colonisées (101). Les conditions optimales pour sa reproduction sont des températures situées entre 25 et 30°C mais le moustique tigre est capable de survivre à des températures comprises entre 10 et 40°C (106). Ainsi, son aire de répartition s'est considérablement étendue ces quarante dernières années (107). Présent à l'origine uniquement en Asie du Sud Est, on le trouve désormais en Amérique du Nord, Centrale et du Sud, dans certaines régions d'Afrique (Cameroun, Guinée équatoriale, Gabon, Madagascar, Nigéria, Afrique du Sud), dans le Nord de l'Australie ainsi que dans de nombreux pays d'Europe (fig. 25). Aux Etats-Unis, sa présence a été rapportée pour la première fois en 1985 dans l'état du Texas (108) et il occupe désormais tout le quart Sud-Ouest du pays (109). Son arrivée sur le continent européen s'est produite en 1979 en Albanie puis en 1990 en Italie (110).

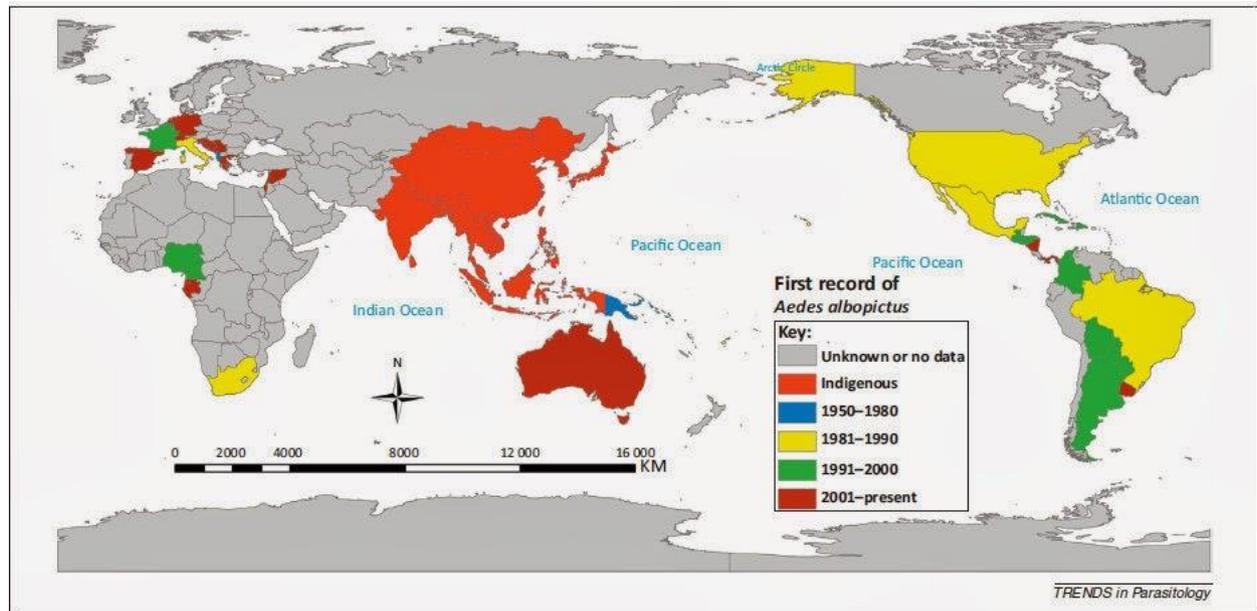


Figure 25 : Distribution connue d'*Aedes albopictus* par pays en 2011. Ce moustique, originaire d'Asie du Sud Est, a disséminé au cours de la deuxième moitié du XXème siècle et colonise désormais tous les continents du globe, à l'exception de l'Antarctique (111)

<http://inspectinginvaders.blogspot.fr/2013/12/invasive-species-and-human-health.html>

Depuis, plus de vingt pays européens ont signalé sa présence sur leur territoire parmi lesquels on compte la Belgique (non établi), la Bosnie Herzégovine, la République Tchèque (non établi), la Croatie, la France, l'Allemagne (non établi), la Grèce, Malte, Monaco, le Monténégro, les Pays-Bas (non établi), Saint-Marin, la Serbie, la Slovénie, l'Espagne, la Suisse, la cité du Vatican, la Turquie et la Bulgarie (112) (fig.26). Le moustique tigre est particulièrement bien implanté en Italie, en Espagne et en France où il est responsable de sérieuses nuisances (113).

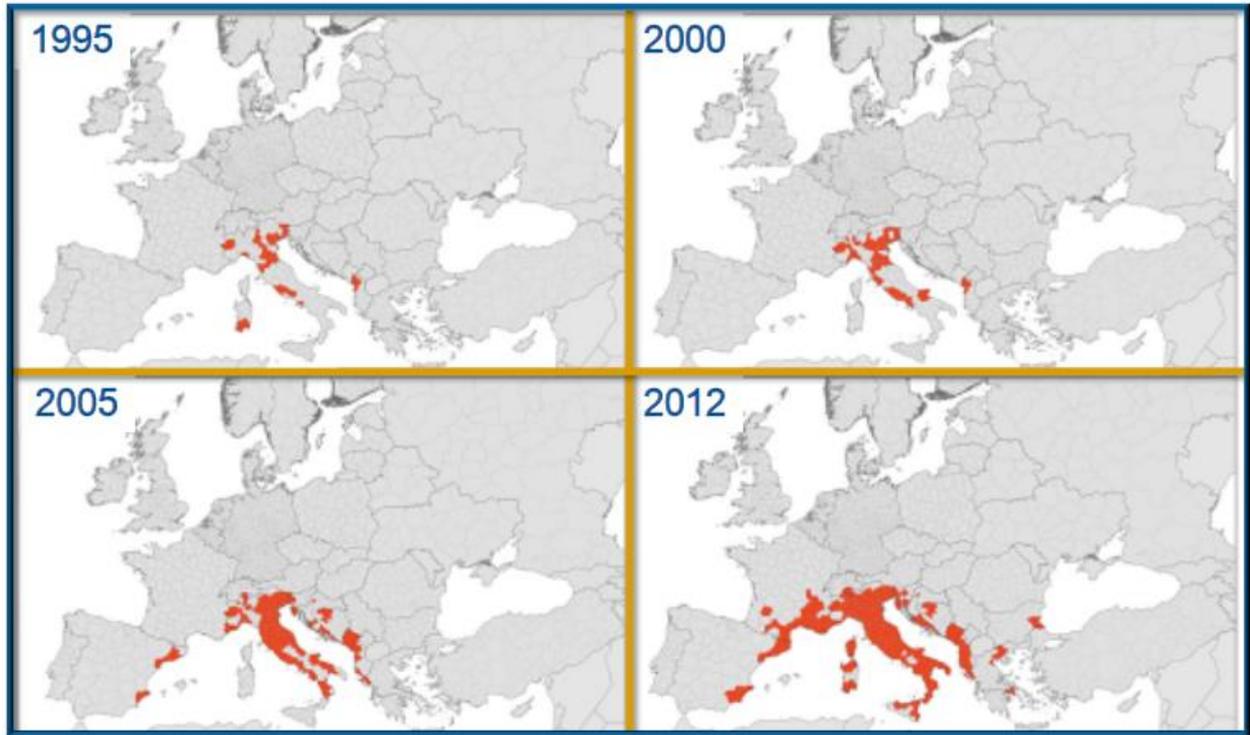


Figure 26 : Dissémination du moustique *Aedes albopictus* dans le sud de l'Europe de 1995 à 2012 (Schaffer et al., 2013).

Dans l'Hexagone, la première observation d'*Aedes albopictus* a eu lieu en octobre 1999 avec la collecte d'individus de tous stades (œufs, larves, pupes et adultes) dans un centre de recyclage de pneus dont un grand nombre provenait des Etats-Unis, d'Italie et du Japon. Des opérations de démoustication importantes ont néanmoins permis de se débarrasser du vecteur. Il a fallu attendre l'année 2004 pour que le moustique soit déclaré définitivement implanté en France métropolitaine, plus précisément dans les Alpes-Maritimes. Ensuite, sa présence a été signalée en Haute-Corse en 2006, puis en Corse du Sud et dans le Var l'année suivante. En 2010, il a colonisé les Alpes-de-Haute-Provence et les Bouches-du-Rhône avant de s'établir dans le Gard, l'Hérault et le Vaucluse en 2011. En 2012, un grand nombre de nouveaux départements français ont été touchés avec le Lot-et-Garonne, les Pyrénées orientales, l'Aude, la Haute-Garonne, la Drôme, l'Ardèche, l'Isère et le Rhône. Enfin, le dernier département français à avoir déclaré des populations d'*Aedes albopictus* implantées est la Gironde en 2013. On compte ainsi dix-huit départements français métropolitains dans lesquels *Aedes albopictus* est considéré comme établi (114). Cependant, il n'est pas rare de le rencontrer occasionnellement dans d'autres départements et il a même été signalé aux portes de Paris (115) (fig.27).

Figure 27 : Localisation connue d'*Aedes albopictus* en Europe, janvier 2014 (European Center for Disease Prevention and Control).

http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/vector-maps/Pages/VBORNET_maps.aspx

Dans les départements d'outre-mer, la présence du moustique tigre est beaucoup plus ancienne et il est régulièrement responsable d'épidémies de dengue ou de chikungunya en Guyane, en Martinique et à La Réunion.

Les facteurs expliquant son expansion rapide sont multiples. L'impact du réchauffement climatique est difficilement évaluable mais semble toutefois jouer un rôle en raison d'un développement plus rapide des larves à des températures supérieures à 25°C (116). L'essor des échanges commerciaux au niveau mondial a également été mis en cause. En particulier, le commerce des pneus usagés dans lesquels des œufs non-éclos ont été retrouvés expliquerait l'arrivée de ce vecteur aux Etats-Unis et en Italie. De fait, ce commerce est actuellement considéré comme le principal responsable de l'expansion d'*Aedes albopictus* dans le monde. Par

ailleurs, le commerce des bambous porte-bonheur en provenance de Chine a lui-aussi été impliqué, par exemple aux Pays-Bas et en Floride (42).

La plasticité physiologique et écologique du moustique tigre laisse craindre une expansion encore plus importante de ce vecteur dans les prochaines années. Ainsi, en fonction des conditions climatiques des régions du globe, il est possible de prévoir celles qui sont le plus à risque concernant une invasion par le moustique tigre (fig. 28) (117).

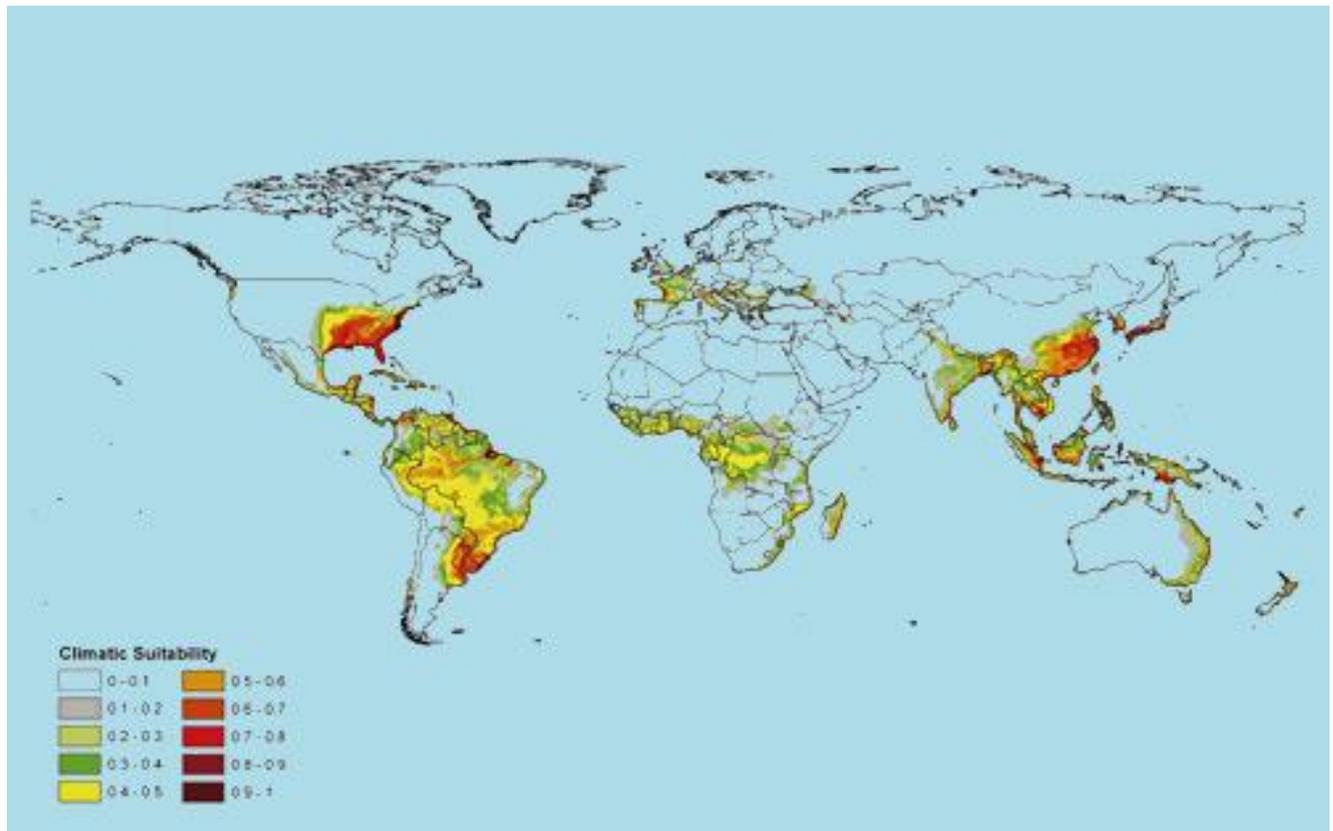


Figure 28 : Probabilité de présence d'*Aedes albopictus* en fonction des conditions météorologiques actuelles et celles prévues par le modèle Global. Les couleurs représentent le caractère plus ou moins favorables (classées sur une échelle de 0 à 1) des conditions météorologiques pour la survie d'*Aedes albopictus*, 0 étant les conditions les moins favorables et 1 les plus favorables (118).

<https://www.elitenetzwerk.bayern.de/elitenetzwerk-home/forschungsarbeiten/naturwissenschaften/2009/niemitz-tigermosquito/>

3.5. Importance en santé publique

3.5.1. Nuisance et pathogénie non vectorielle

Bien que la préoccupation majeure concernant l'implantation d'*Aedes albopictus* dans de nouvelles régions soit celle du risque vectoriel, il n'en demeure pas moins que ce moustique est

responsable de nuisances très importantes. Selon une étude italienne réalisée en Emilie-Romagne, une personne sur deux déclare passer moins de temps à l'extérieur en raison de la présence du moustique (119). Il est en effet reconnu comme étant un Insecte piqueur particulièrement agressif.

On remarque deux pics d'activité, au lever et au coucher du soleil, mais il reste actif toute la journée. Les piqûres d'*Aedes albopictus* occasionnent des lésions et des symptômes plus intenses que les piqûres de la plupart des autres moustiques. Elles se compliquent parfois d'infections secondaires. De plus, les réactions d'hypersensibilité de type I (hypersensibilité immédiate) seraient également plus fréquentes (120).

3.5.2. Le vecteur de nombreux arbovirus

Le vecteur ne doit donc pas être considéré comme un simple agent de transmission mécanique, mais bien comme un acteur à part entière du cycle infectieux du virus. En effet, la dissémination du virus dans l'organisme du vecteur s'accompagne d'une intense réplication de celui-ci dans les cellules de l'insecte (42). Il y a donc amplification du nombre de particules virales au cours du passage par le moustique. L'infection est également le théâtre de multiples interactions entre le virus et le vecteur qui sont susceptibles de modifier l'infectiosité et la pathogénicité de l'agent infectieux (121). Enfin, au cours de la piqûre, le moustique injecte une dose de salive contenant des molécules aux propriétés variées. Leur rôle dans la transmission d'arbovirus par un vecteur commence seulement à être exploré mais apparaît déjà comme pouvant moduler de façon importante le tropisme (122) ainsi que la pathogénicité du virus (123). Inversement, le virus apparaît capable de modifier l'expression protéique dans les glandes salivaires, donc de modifier la composition de la salive injectée au moment de la piqûre (124). Cependant, les propriétés biologiques de cette salive ainsi modifiée restent largement inconnues.

3.5.2.1. Capacité vectorielle

L'Académie de Médecine définit la capacité vectorielle comme « *l'aptitude plus ou moins grande d'un vecteur à transmettre un agent infectieux en fonction de sa bio-écologie et des conditions de l'environnement* ». Ainsi, la capacité vectorielle est la résultante de la compétence vectorielle (ensemble des relations existant entre un agent infectieux et son vecteur)

et de la bio-écologie du vecteur (abondance, longévité, préférences trophiques, etc.) sur lesquelles s'exerce l'action des facteurs environnementaux.

On définit classiquement le taux de reproduction comme le nombre moyen de cas secondaires générés par une personne lorsqu'elle est infectieuse. Lors de l'introduction d'une maladie infectieuse dans une population entièrement susceptible, on parle de taux de reproduction de base, ou R_0 . Pour les maladies vectorielles, R_0 est déterminé à la fois par [1] les propriétés biologiques de l'arbovirus (capacité de transmission entre l'hôte et le vecteur, durée de la virémie chez l'hôte, rapidité de dissémination chez le vecteur, en particulier aux glandes salivaires), [2] le comportement de l'hôte (degré d'exposition au vecteur) et [3] la bioécologie du vecteur (fréquence et lieux de piqûre, préférences trophiques, taux de survie, taux d'infectiosité, etc.).

Ainsi, le R_0 peut être calculé en utilisant la formule suivante :

$$R_0 = \frac{m \times a^2 \times p^n}{-\ln(p)} \times b \times c \times \frac{1}{r}$$

Avec : m = nombre de vecteurs en relation avec un individu donné
 a = nombre de piqûres par jour et par moustique
 p = taux de survie quotidien d'une population de moustique
 n = durée du cycle extrinsèque
 b = compétence vectorielle
 c = probabilité de transmission du virus à un sujet infectieux au cours d'une piqûre
 r = taux de guérison de l'hôte

Parmi ces paramètres, la compétence vectorielle, b , tient aux seuls facteurs intrinsèques au système. Il s'agit des facteurs d'ordre mécanique, physico-chimique, moléculaire et génétique, tels qu'on peut les étudier dans les conditions expérimentales. La compétence vectorielle est la résultante de l'aptitude du vecteur à s'infecter (réceptivité), de son aptitude à assurer le développement de l'agent infectieux et de son aptitude à le transmettre. Elle représente le degré de compatibilité (ou de coadaptation) entre l'arbovirus et son vecteur. Elle est donc propre à ce système biologique et susceptible de variations dès que l'une des deux populations concernées change (125). Ainsi, la compétence vectorielle, et donc la capacité vectorielle, peuvent varier entre différentes souches (ou différents sérotypes) d'un même virus (126).

3.5.2.2. Modalité du repas sanguin et transmission d'un arbovirus

Au cours de la piqûre, les pièces buccales du vecteur pénètrent la barrière cutanée du vertébré, injectent de la salive (phase de sondage ou *probing*) puis aspirent le sang vers l'œsophage de l'arthropode. Le repas sanguin peut se faire selon deux mécanismes. Certains arthropodes sont telmophages : les pièces buccales provoquent la formation d'un micro-hématome dans lequel l'arthropode puise le sang. Il s'agit par exemple de la tique du genre *Hyalomma* qui transmet le virus de la fièvre hémorragique Crimée-Congo (127). Les solénophages, comme les moustiques, se nourrissent en prélevant le sang directement dans les capillaires cutanés. Les pièces buccales de ces arthropodes sont adaptées à leur mode de repas sanguin. Elles sont allongées et possèdent une souplesse qui leur permet de sonder le tissu cutané à la recherche d'un capillaire sanguin et de le cathétériser.

Au cours du repas, on estime que le moustique prélève 4 à 10 mm³ de sang pour une durée moyenne de 1 à 2 min (128). Le virus présent dans le sang parvient alors jusqu'à l'intestin moyen de l'arthropode (fig. 30). Il dispose alors de quelques heures pour franchir la paroi du tube digestif avant de disséminer vers les autres organes. Il y a formation d'une barrière dans l'intestin du moustique moins de 24h après le repas. Cette barrière, appelée *midgut escape barrier*, est souvent qualifiée de « barrière de l'infection ». En effet, elle forme un revêtement étanche sur la face luminale de l'épithélium digestif du moustique, empêchant le passage de tout arbovirus vers la cavité abdominale de l'insecte, donc une infection de celui-ci (129). Si le virus parvient à traverser la paroi de l'intestin moyen avant la mise en place de cette barrière, il est capable de disséminer vers les organes du moustique, en particulier les glandes salivaires. Une fois celles-ci atteintes, le virus doit franchir une seconde barrière située à l'interface entre les cellules productrices de salive et le canal salivaire.

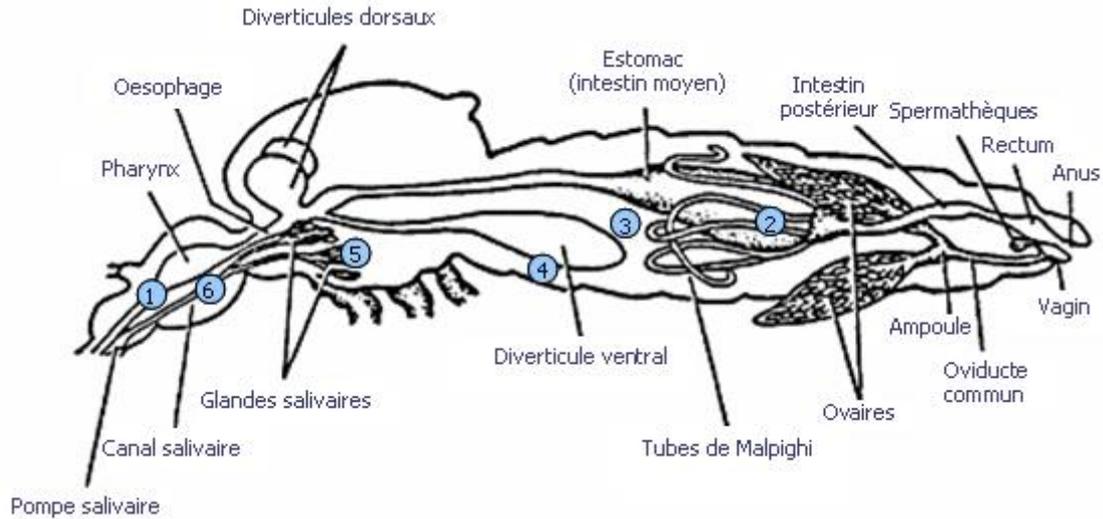


Figure 29 : Infection et dissémination d'un arbovirus dans l'organisme d'un moustique vecteur. [1] Repas sanguin, [2] Arrivée du virus avec le bol alimentaire dans l'intestin moyen, [3] Franchissement de la paroi de l'intestin et dissémination aux organes, [4] Infection des cellules du tissu adipeux, [5] Infection des glandes salivaires, [6] Excrétion et transmission du virus à un nouvel hôte via la salive.

<http://www.ilm.pf/Dengueetvecteurs-vecteurs>

En cas de franchissement de cette seconde barrière, le virus peut être excrété dans la salive, lui permettant d'infecter un nouvel hôte vertébré. Ainsi, on qualifie généralement cette seconde barrière de « barrière de transmission ». Le temps nécessaire au virus pour infecter les glandes salivaires après son arrivée dans l'intestin moyen est appelé période d'incubation extrinsèque (fig. 30) et joue un rôle capital dans la compétence vectorielle de l'arthropode concerné (76).

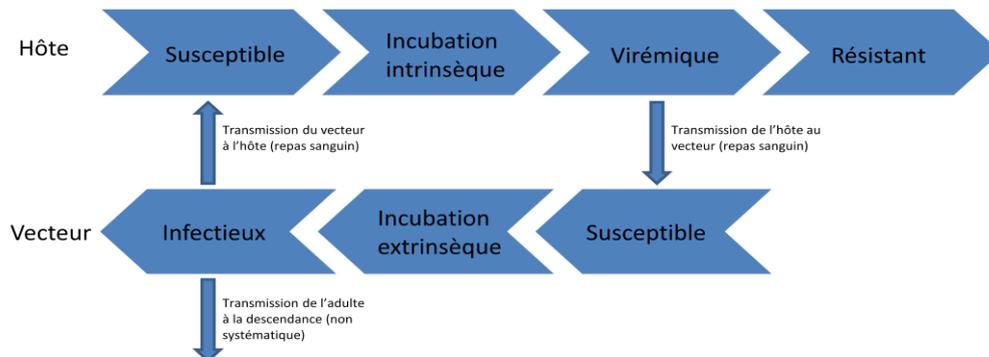


Figure 30 : La Transmission vectorielle d'un arbovirus.

3.5.2.3. Agents pathogènes transmis par *Aedes albopictus*

La définition du statut vectoriel d'un moustique a été proposée par Mitchell *et al.* en 1995. Pour qu'un moustique soit reconnu comme étant le vecteur d'un arbovirus, il faut : [1] Isoler le virus à partir de moustiques prélevés sur le terrain, [2] Démontrer la capacité du moustique à être infecté suite à un repas sanguin sur un hôte virémique ou sur une suspension virale, [3] Mettre en évidence des particules virales dans la salive émise par le moustique ou démontrer l'infection d'un hôte vertébré suite à une morsure par un moustique infecté, [4] Fournir des preuves épidémiologiques confirmant l'association entre la présence du moustique et celle d'une population de vertébrés dans laquelle une épidémie a lieu (130).

Il est parfois délicat de réunir l'ensemble de ces critères, en particulier lorsque plusieurs espèces de moustiques sont des vecteurs potentiels et cohabitent dans la même zone. Pour autant, le statut vectoriel d'*Aedes albopictus* est désormais bien documenté et on considère qu'il est capable de transmettre au moins 26 arbovirus (107) (fig. 31). Parmi ces arbovirus, le moustique tigre a une importance particulière dans la transmission de DENV (les quatre sérotypes) et de CHIKV. Des moustiques co-infectés par CHIKV et DENV ont été retrouvés dans les zones où les deux virus sont présents sans que l'on ne puisse prédire les conséquences de cette co-infection sur la pathogénicité ou la transmissibilité de l'un ou de l'autre virus (131).

Classification	Virus	Isolements de terrain	Compétence vectorielle		
			Infection	Transmission	
<i>Flaviviridae</i>					
Genre <i>Flavivirus</i>	Dengue (sérototype 1-4)	+	Asie, Amériques, Afrique	+	+
	Fièvre jaune			+	+
	Fièvre du Nil Occidental	+	Etats-Unis	+	+
	Encéphalite japonaise	+	Taiwan	+	+
	Encéphalite de Saint Louis			+	+
<i>Togaviridae</i>					
Genre <i>Alphavirus</i>	Chikungunya	+	Afrique, Océan indien, Asie, Italie	+	+
	Encéphalite équine de l'Est	+	Etats-Unis	+	+
	Encéphalite équine			+	+
	Vénézuélienne				
	Encéphalite équine de l'Ouest			+	+
	Ross River			+	+
	Sind Bis			+	+
	Mayaro			+	+
	Getah			+	+
<i>Bunyaviridae</i>					
Genre <i>Bunyavirus</i>					
Sérogroupe Potosi	+	Etats-Unis	+	+	
Bunyamwera	Vallée de la Cache	+	Etats-Unis	?	?
	Tensaw	+	Etats-Unis	?	?
Sérogroupe California	Keystone	+	Etats-Unis	+	-
	San Angelo			+	+
	La Crosse	+	Etats-Unis	+	+
	Canyon de Jamestown	+	Etats-Unis	+	+
	Trivittatus			+	-
Sérogroupe Simbu	Oropouche			+	-
Genre <i>Phlebovirus</i>	Fièvre de la vallée du Rift			+	+
<i>Reoviridae</i>					
Genre <i>Orbivirus</i>	Orungo			+	+
<i>Nodaviridae</i>					
Genre <i>Alphanodaviridae</i>	Nodamura			+	?

Figure 29 : Tableau récapitulatif des arbovirus pour lesquels le statut de vecteur *d'Aedes albopictus* a été démontré (d'après (107))

Aedes albopictus est également capable de transmettre plusieurs filarioses comme *Dirofilaria immitis* (132), *Dirofilaria repens* et *Setaria labiatopapillosa* (133).

3.5.2.4. Rôle de la salive dans la transmission et la pathogénicité des arbovirus

Au cours de la phase de sondage du repas sanguin, les insectes hématophages injectent de la salive au vertébré dont ils prélèvent le sang. Cette salive joue de nombreux rôles et permet notamment de contrecarrer les défenses mises en place par l'hôte au moment de la piqûre, comme la coagulation sanguine ou la réponse immunitaire. Ainsi, il a été mis en évidence dans la salive de nombreuses protéines aux actions angiogéniques, anti-hémostatiques, anti-inflammatoires et immunomodulatrice (134).

Parmi ces protéines, on compte notamment l'apyrase qui est la protéine salivaire la mieux conservée entre les différentes espèces d'arthropodes hématophages. Elle possède plusieurs rôles dont le principal est de minimiser l'activation des plaquettes. Elle intervient également dans l'inhibition de la réaction inflammatoire et dans le temps de sondage. Ainsi, la quantité d'apyrase présente dans les glandes salivaires au moment de la piqûre est inversement proportionnelle au temps de sondage (135).

Les moustiques du genre *Aedes* possèdent deux tachykinines appelées sialokinine 1 & 2 qui stimulent la production de l'oxyde nitrique (NO) par les cellules endothéliales, engendrant ainsi une dilatation des vaisseaux sanguins (136). Ces peptides possèdent également des activités immunomodulatrices en agissant sur l'activation des macrophages et la présentation d'antigènes (137).

Les femelles *Aedes albopictus* synthétisent également des protéines de la famille D7 (deux formes longues et 4 formes courtes), des protéines inhibitrices des protéases à sérine (ou serpine), des protéines de la famille de l'*antigen-5-related protein* (AG5) et des protéines de différents poids moléculaires (30kDa, 62kDa, etc.) dont le rôle est parfois non connu.

Depuis quelques années, de nombreuses études ont démontré le rôle capital de la salive dans la potentialisation de l'infection de l'hôte vertébré par certains virus, comme le virus de la fièvre de la vallée du Rift (122) ou celui de la fièvre du Nil occidental (138). La salive de

moustique pourrait donc être un élément important à prendre en compte dans la transmission des arbovirus. Si les mécanismes à l'origine de l'augmentation de la pathogénicité commencent à être étudiés (139), l'identité et le rôle précis des molécules contenues dans la salive sur le système immunitaire de l'hôte sont encore largement inconnus. Deux hypothèses sont généralement avancées pour expliquer la potentialisation de l'infection. La première suggère que les nombreuses molécules anti-inflammatoires induisent une immunosuppression locale qui favoriserait les premières étapes de l'infection virale. La seconde hypothèse propose une modification de la réponse immunitaire par les composés salivaires du moustique. Cette réponse immunitaire pourra être soit exacerbée soit inadaptée au pathogène. Ainsi, le virus pourra par exemple infecter les cellules immunitaires et donc disséminer rapidement au reste de l'organisme. Ces deux hypothèses ne s'excluent pas l'une l'autre et laissent place à d'autres explications comme par exemple une augmentation de la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique dans le cas du virus de la fièvre de la vallée du Rift (122).

De même, peu d'équipes se sont intéressées au rôle potentiel du virus sur la composition de la salive du vecteur. Quelques études ont été publiées et rapportent des modifications des niveaux d'expression protéique dans les glandes salivaires d'*Aedes aegypti* suite à une infection par le virus du chikungunya ou par le sérotype 2 du virus de la dengue (140) (124). Ces modifications protéiques pourraient s'avérer d'une importance majeure dans le cadre de la compréhension du mécanisme à l'origine de l'augmentation de la pathogénicité des arbovirus en présence de salive. De même, si la présence du virus dans les glandes salivaires modifie en profondeur la composition de la salive produite par celles-ci, il s'agira d'un élément à prendre en compte dans la conduite des expérimentations.

3.6. Moyens de lutte contre *Aedes albopictus*

L'efficacité d'une lutte anti-vectorielle dépend essentiellement de la prise en compte globale et de l'élimination systématique de tous les facteurs favorisant le développement du vecteur. Ainsi, il convient de mettre en place un dispositif intégré permettant de s'attaquer à tous les stades (aquatiques et aérien) du moustique. Pour *Aedes albopictus*, un élément clé est la recherche et la destruction des gîtes larvaires potentiels. En effet, un aménagement adéquat du cadre de vie permet de réduire significativement la population de ce moustique, particulièrement en milieu urbain (141). Il est donc impératif de retirer tous les éléments susceptibles de contenir

des eaux stagnantes, à l'extérieur comme à l'intérieur des habitations. Il est également important de veiller au bon écoulement des eaux de pluie ainsi que des eaux usées et de nettoyer régulièrement les gouttières, regards et caniveaux. Enfin, lorsqu'ils sont indispensables, les réservoirs d'eau doivent être recouverts d'une moustiquaire.

Cependant, il est souvent impossible de retirer tous les gîtes. Il est alors nécessaire d'avoir recours à des insecticides larvicides ou adulticides. Les larvicides seront bien entendu appliqués sur les gîtes potentiels alors que les adulticides pourront être pulvérisés sur une zone beaucoup plus importante. Les larvicides les plus utilisés sont le téméphos, les spores de *Bacillus thuringiensis serovar Israelensis* (Bti) et le spinosad®. Le téméphos et le spinosad® agissent en provoquant une excitation du système nerveux central qui conduit à une paralysie de l'insecte. Tous deux sont relativement peu spécifiques, avec une toxicité particulière du spinosad® pour les abeilles, ce qui en limite l'utilisation. De plus, l'usage intensif de ces produits entraîne rapidement l'apparition de résistances chez les larves (142), conduisant à une efficacité décroissante. Ainsi, de nombreuses mutations sur la séquence de l'acétylcholinestérase sont capables d'inhiber le mode d'action du téméphos. Face à ce constat, le Bti est de plus en plus utilisé. Les spores de la bactérie contiennent des inclusions cristallines. Une fois ingérées par la larve, ces protoxines se solubilisent sous l'effet du pH alcalin de l'intestin et sont hydrolysées en toxines actives par les enzymes protéolytiques. Après fixation sur des récepteurs des cellules intestinales, les toxines de Bti entraînent une lyse complète de la muqueuse digestive (143). Les récepteurs impliqués sont très spécifiques, ce qui explique le spectre d'activité relativement étroit de ces toxines. Elles agissent uniquement sur les Diptères et n'ont qu'une activité très faible sur les autres groupes d'Insectes.

Généralement, il est tout de même nécessaire de procéder à une pulvérisation d'insecticides adulticides, car il s'agit de la seule méthode permettant une élimination rapide et massive des adultes (fig. 32). Elle constitue le plus souvent une mesure d'urgence en période d'épidémie. Pour que cette méthode soit efficace, il est préconisé d'effectuer des traitements tous les deux à trois jours sur dix jours. De plus, afin de limiter l'apparition de résistances, on recommande d'utiliser des insecticides de familles différentes en alternance.

Substance active	Famille chimique	Mode d'action	Résistance
Deltaméthrine	Pyréthroïdes	Perturbation de la cinétique d'activation du canal sodium	++/+++
Malathion	Organophosphorés	Inhibition de l'acétylcholinestérase	+ / ++
Pyrimiphosméthyl	Organophosphorés	Inhibition de l'acétylcholinestérase	+
Naled	Organophosphorés	Inhibition de l'acétylcholinestérase	+ / ++
Etofenprox	Pseudo-pyréthroïdes	Perturbation de la cinétique d'activation du canal sodium	++/+++

Figure 30 : Composés adulticides utilisés dans la lutte anti-vectorielle

Malgré ces recommandations, la mise en place de résistances est inévitable (144) comme par exemple la mise en évidence récente de la mutation *kdr* qui confère à *Aedes albopictus* une résistance aux pyrétroïdes (145). Ces résistances se retrouvent partout dans le monde, entravent la lutte anti-vectorielle et nuisent au développement de nouveaux insecticides. Il devient donc urgent de développer des méthodes de contrôle alternatives.

Plusieurs pistes sont à l'étude, avec des résultats encourageants pour certaines d'entre elles. La technique de l'insecte stérile (TIS) consiste à produire des mâles *Aedes albopictus* et à les relâcher massivement dans l'environnement après les avoir stérilisés à l'aide d'agents mutagènes. Chaque femelle n'étant fécondé qu'une seule fois, la copulation de ces mâles stériles avec des femelles de phénotype sauvage aboutit à la ponte d'œufs non fertilisés (146). Cette technique est actuellement testée dans l'état de Bahia au Brésil sur l'espèce *Aedes aegypti* (147) mais pourrait être facilement adaptée à *Aedes albopictus* en raison d'une capacité plus importante de ce dernier à être produit en laboratoire (148). Ainsi, il est prévu d'expérimenter le lâcher de mâles stériles sur l'île de La Réunion dès 2015 (149).

D'autres techniques sont encore à l'étude, comme l'utilisation d'un endosymbionte des moustiques du genre *Aedes* : *Wolbachia*. Cette bactérie est naturellement présente chez certains moustiques et est connue pour manipuler la reproduction des *Aedes* (150). La présence de cette bactérie dans les glandes salivaires des moustiques ayant été associée à une diminution de la

transmission du virus de la dengue (151) (152) et du chikungunya (153) par ces insectes. Il s'agirait ici d'un moyen pour limiter la transmission des arbovirus à l'Homme sans que la population de vecteur soit affectée. Cependant, les investigations doivent se poursuivre afin de mieux préciser les interrelations entre la bactérie, les vecteurs et les virus avant d'envisager une utilisation de cet endosymbionte dans la lutte contre la transmission des arbovirus.

4. Objectifs du projet

Les moyens de contrôle traditionnels des arbovirus sont soit inaccessibles (vaccins, traitements thérapeutiques, élimination totale des gîtes larvaires) soit devenus inefficaces (lutte vectorielle chimique). Il apparaît donc nécessaire de développer de nouvelles méthodes pour bloquer la transmission des maladies vectorielles. Pour être efficaces, ces approches innovantes doivent tenir compte des interactions complexes entre le vecteur, le pathogène et l'hôte vertébré. Nous nous proposons de mieux comprendre ces interactions en étudiant le cas des virus de la dengue et du chikungunya en relation avec l'un de leurs vecteurs principaux : *Aedes albopictus*. Plus précisément, nous avons choisi de nous intéresser à DENV4 et à une souche épidémique CHIKV d'autre part, en focalisant notre attention sur leur interaction éventuelle avec le vecteur au niveau de deux barrières de l'infection : l'intestin moyen et les glandes salivaires. Le choix s'est porté sur *Aedes albopictus* pour plusieurs raisons : ce moustique est *a priori* capable de transmettre efficacement les deux virus étudiés, il est présent en Europe et son aire de répartition s'étend chaque année davantage. Le CHIKV a été choisi car sa cinétique d'infection a été décrite chez ce vecteur ce qui permettra de valider notre approche en confrontant nos résultats à ceux de la littérature. En revanche, pour le DENV4, la cinétique d'infection n'est pas connue à ce jour chez ce vecteur. Notre projet permettra donc dans un premier temps de la préciser. Notre étude de l'interaction entre *Aedes albopictus* et ces arbovirus se fera en plusieurs étapes. Dans un premier temps, nous caractériserons la cinétique d'infection du vecteur par les différents arbovirus afin de déterminer la période où l'infection des organes est maximale. Puis nous réaliserons une analyse protéomique qui comparera les niveaux d'expression protéique entre des intestins moyens et des glandes salivaires infectés ou non par les virus DENV4 et CHIKV. Cette approche nous permettra d'obtenir des protéomes d'intestin moyen et de glandes salivaires provenant d'*Aedes albopictus* infectés, ce qui constitue une première mondiale. Cela nous permettra de comptabiliser et d'identifier les protéines surexprimées et sous-exprimées en cas d'infection virale de ces organes. Nous étudierons également le cas d'une co-infection du vecteur par DENV4 et CHIKV. Cette étude nous permettra de déterminer des protéines cibles dont nous pourrions étudier l'effet sur des systèmes *in vivo* et *in vitro*. Nous pensons pouvoir identifier deux types de protéines d'intérêts : des protéines ayant une activité antivirale potentielle (au moins chez *Aedes albopictus*) et des protéines susceptibles de perturber le système immunitaire de l'hôte vertébré.

Partie II : Etude expérimentale

1. Matériels et méthodes

1.1. Matériels d'étude

1.1.1. Elevage des *Aedes albopictus*

La plupart des études menées sur la compétence vectorielle de moustiques s'appuient sur l'utilisation de souches de laboratoire de moustiques. Ceux-ci sont parfois élevés depuis plusieurs dizaines d'années en insectarium et ont l'avantage de présenter des caractéristiques relativement homogènes. Cependant, on peut imaginer une dérive de certains caractères et donc un éloignement de la population d'origine à chaque génération. En particulier, une étude a montré que la compétence vectorielle d'*Aedes albopictus* augmentait en fonction du nombre de générations d'élevage en laboratoire (154). Afin d'éliminer ce biais et de pouvoir extrapoler nos résultats aux populations de moustiques présentes sur le territoire français, nous avons utilisé une population prélevée récemment.

L'élevage d'*Aedes albopictus* est issu d'adultes capturés en 2011 dans la région de Nice (Alpes-Maritimes). Les moustiques adultes sont élevés dans des cages recouvertes d'une moustiquaire dans une pièce dont la température est maintenue à 25°C±2, une hygrométrie de 80% ±5 et une photopériode de 12 heures de jour et 12 heures de nuit. Les moustiques destinés aux infections expérimentales sont nourris avec de l'eau sucrée (10% sucrose). Les insectes reproducteurs reçoivent en complément un repas sanguin qui consiste à exposer des souris SWISS anesthésiées à des femelles disposées dans une cage recouverte d'une moustiquaire pendant 15 minutes tous les deux jours. Les moustiques femelles pondent sur des papiers buvards humides qui sont ensuite récupérés pour être immergés dans des bassines contenant environ 1,5 litre d'eau. Après moins de 24h, les premières larves éclosent et sont nourries avec des croquettes pour animal de compagnie ainsi qu'un complément alimentaire à base de levure de bière. L'eau des bassines contenant les larves est renouvelée tous les deux jours. A l'issue de leur mue, les nymphes sont transférées dans une cage recouverte d'une moustiquaire où elles pourront effectuer leur métamorphose vers le stade adulte.

1.1.2. Souches virales utilisées

1.1.2.1. Virus CHIK

Le virus CHIK utilisé est la souche CHIK 05-049 isolée d'un cas humain lors de l'épidémie de 2005 à la Réunion. Il a été amplifié sur lignée cellulaire d'*Aedes albopictus* C6/36 et le titre viral a été évalué à 2.10^{10} ufp/mL par la méthode des plages de lyse sur Vero E6.

1.1.2.2. Virus DEN4

Le virus DEN4 a été isolé en 1976 par le Center for Disease Contrôle d'Hawaï à partir du foie d'un patient birman ayant développé une forme hémorragique fatale de dengue (souche 63632). Le stock viral a été obtenu sur une lignée cellulaire d'*Aedes albopictus* (cellules C6/36, passage 9) et titré sur cellules Vero E6. Le titre obtenu est de $4,5.10^6$ ufp/mL et se révèle insuffisant pour obtenir un taux d'infection satisfaisant après un protocole d'infection expérimentale classique. Il est donc nécessaire de concentrer le virus. Pour cela, une fiole de 150 cm² à bouchon ventilé (Becton-Dickinson) contenant des cellules C6/36 à 80% de confluence est incubée à 28°C avec 1 mL de suspension virale issue du stock de DENV4 mélangée à 2mL de milieu Leibovitz L15. Après 2 heures, on ajoute 23 mL de milieu Leibovitz L15 et la fiole est laissée en incubation pendant 4 jours à 28°C. Environ 20 mL de surnageant est récupéré et centrifugé 10 min à 450 g à 4°C. Le surnageant est conservé et on ajoute à celui-ci du milieu de Leibovitz L15 de façon à obtenir 30 mL de volume final. Puis 3 mL de cette suspension sont répartis dans 10 fioles T150 de cellules C6/36 à 80% de confluence. Ces fioles sont traitées selon le même protocole décrit précédemment. Après 4 jours, la suspension virale prélevée dans des tubes Falcon® de 15mL est centrifugée 10 min à 450 g à 4°C. On ajoute alors 0.25mL de polyéthylène glycol (PEG-6000) par mL de suspension virale et on laisse au repos pendant 12 heures à 4°C. Les tubes sont ensuite centrifugés à 3200g pendant 30 minutes à 4°C. Le surnageant est retiré et le culot est repris dans 1 mL de L15 + 2% de sérum de veau fœtal et stocké à -80°C. Le titre alors obtenu sur cellules Vero E6 est de $1,3.10^9$ ufp/mL et le nombre de copies mesurées par transcription inverse et réaction de polymérisation en chaîne quantitative (RT-PCRq) est de $1,3.10^{13}$ copies d'ARN.mL⁻¹.

1.2. Protocole d'infection expérimentale des *Aedes albopictus*

La veille du jour prévu de l'infection, les moustiques mâles et femelles sont triés. Les femelles sont placées dans des boîtes en plastiques munies d'un piston et d'une moustiquaire puis transférées dans le laboratoire L3 où l'infection est prévue pour une période d'acclimatation de 24 heures. Les mâles sont éliminés. Le jour de l'infection, du sang de lapin est prélevé dans un tube contenant 2% d'héparine. Ce sang est ensuite lavé et les hématies concentrées par 3 lavages successifs dans du tampon phosphate salin 1X (PBS 1X) alternés avec 3 centrifugations à 530g pendant 5 minutes à température ambiante. Les hématies obtenues sont ensuite stockées à 4°C. Dans le laboratoire L3, le sang est mélangé à une suspension virale, à du milieu de Leibovitz L15 et à un phagostimulant (ATP, concentration finale de 5.10^{-3} mol.L⁻¹) (fig. 33) et ensuite disposé dans un gorgeur constitué d'un réservoir de verre sur lequel une peau de poulet a été tendue (fig.34).

	Milieu de Leibovitz L15	Hématies de lapin purifiées	Surnageant viral	Phagostimulant (ATP)
Infection CHIKV	2 mL	1 mL	40 µL	30 µL
Infection DENV4	0,5 mL	1 mL	1,5 mL	30 µL
Co-infection CHIKV/DENV4	0,5 mL	1 mL	1,5 mL (DENV4) 40 µL (CHIKV)	30 µL
Témoin négatif	2 mL	1 mL	0	30 µL

Figure 31: Tableau donnant la composition du mélange par gorgeur et par infection

Le mélange infectieux présente donc un titre de $2,7.10^8$ ufp.mL⁻¹ pour CHIKV et de $6,5.10^8$ ufp.mL⁻¹ pour DENV4. Les moustiques sont mis au contact de la peau de poulet et se gorgent de sang de lapin infecté (fig. 34). Les moustiques gorgés sont conservés dans des boîtes en carton dans une pièce à 28°C +/-1, 80% +/-5 d'hygrométrie et nourris avec une solution de sucre 10%.

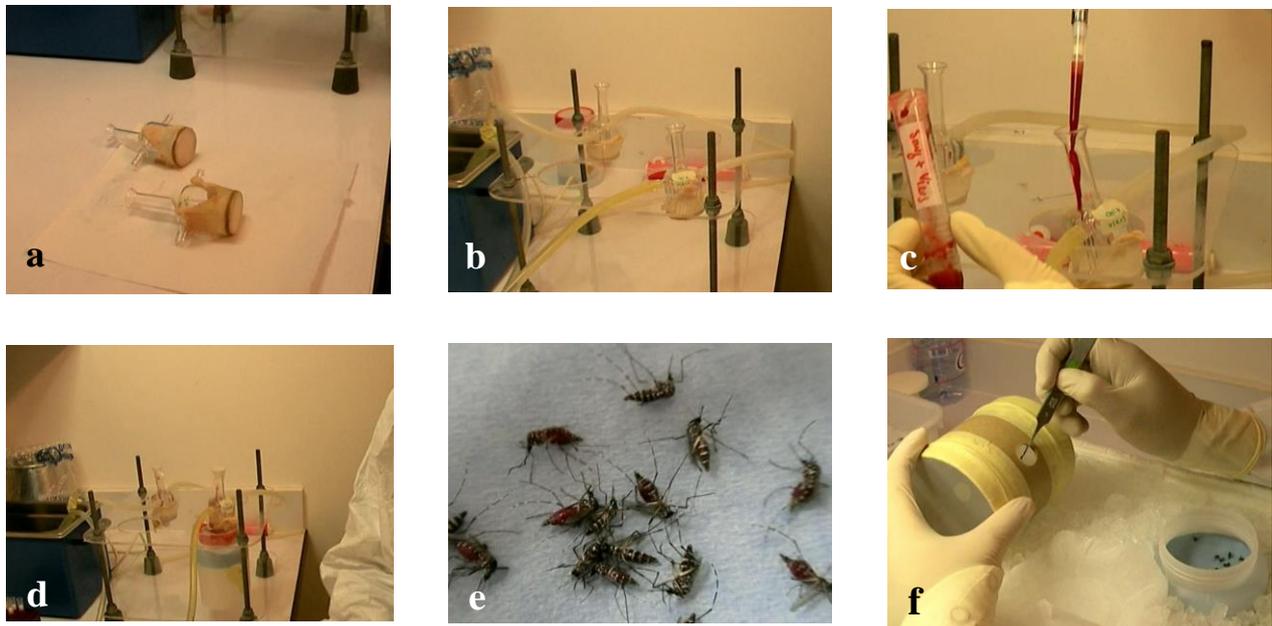


Figure 32 : Dispositif complet nécessaire à l'infection orale expérimentale de moustiques *Aedes albopictus*. (a) Gorgeur en verre fermé par une peau de poulet. (b) Gorgeur monté sur un dispositif de circulation d'eau chaude. (c) Introduction du sang infecté dans le gorgeur. (d) Gorgement des moustiques à travers la voile et la peau de poulet. (e) Moustiques gorgés anesthésiés. (f) Tri des moustiques gorgés.

Tous les deux jours pendant 15 à 17 jours, certains moustiques sont placés à 4°C afin de procéder à des prélèvements d'échantillons.

1.3. Prélèvements des échantillons

1.3.1. Prélèvements de moustiques entiers pour immunohistochimie

Des moustiques infectés sont anesthésiés et entièrement plongés dans un tube contenant du liquide de Carnoy. Les prélèvements sont conservés à température ambiante.

1.3.2. Prélèvements des échantillons pour immunofluorescence

Les moustiques sont disposés sur une lame de verre sous une loupe binoculaire et disséqués afin de prélever les glandes salivaires et les intestins moyens. Les organes sont disposés sur une lame et fixés 15 minutes dans du méthanol pour les intestins moyens ou dans du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pour les glandes salivaires puis conservés à 4°C.

1.3.3. Prélèvements pour quantification du nombre de particules virales

Deux méthodes de quantification du nombre de particules virales sont effectuées. Pour la quantification par RT-PCRq, les organes sont placés dans 350µL de tampon de lyse RA1 + 3.5µL de β-mercaptoéthanol. Pour les titrages, les organes sont prélevés dans des tubes contenant 350 µL de milieu DMEM + 2% sérum de veau fœtal. Les tubes de prélèvements contiennent des microbilles qui permettent de broyer l'échantillon prélevé après agitation. Les tubes sont ensuite stockés à -80°C.

1.3.4. Prélèvements pour analyse protéomique

L'analyse protéomique se fait selon deux méthodes différentes décrites plus loin : iTRAQ et « label-free ». Pour la technique « label-free », 50 estomacs ou 100 glandes salivaires sont transférés dans des tubes eppendorf® de 1,5 mL contenant 100 µL de tampon composé de 2-amino-2-hydroxyméthyl-1,3-propanediol (Tris) HCl à 50 mmol.L⁻¹ (pH 7,5) dans lequel de l'urée a été diluée à une concentration de 8 mol.L⁻¹. Pour la technique iTRAQ, la même quantité d'organes est placée dans des tubes contenant 50 µL de tampon RIPA (RadioImmunoPrecipitation Assay, Biobasic Canada Incorporation, pH 8) composé de 150 mmol.L⁻¹ de NaCl, 50 mmol.L⁻¹ de Tris-HCl, 1% de Nonidet P-40 (NP-40), 0,5% de deoxycholate de sodium et 0,1% de dodécylsulfate de sodium (SDS). Les tubes sont stockés à -80°C.

1.3.5. Prélèvement de salive de moustique

La salive des moustiques exposés à un repas sanguin infecté est prélevée à différents temps d'infection. Pour cela, les ailes et les pattes des moustiques sont enlevés et le proboscis de l'insecte est introduit dans un cône pour pipette de 20µL contenant 5µL de milieu Leibovitz L15 + 2% sérum de veau fœtal. Les moustiques sont laissés à saliver pendant 25 min puis le milieu contenant la salive est récupéré et collecté dans un tube eppendorf® de 0.5mL et stocké à -80°C. Les moustiques entiers correspondant à chaque salive sont placés dans des tubes contenant des microbilles de verre et 350µL de tampon de lyse RA1 + 3.5µL de β-mercaptoéthanol puis broyés et stockés à -80°C.

1.4. Immunohistochimie et immunofluorescence

Les organes prélevés sur lames de verre sont soumis à un marquage permettant de révéler par immunofluorescence la présence de CHIKV et DENV4. Pour cela, les lames sont réhydratées dans du PBS 1X pendant 5 min à température ambiante. Les organes sont ensuite immergés dans du PBS+triton 0.2%, 15 min pour les glandes salivaires, 2h pour les intestins moyens. Les lames sont ensuite rincées trois fois avec du PBS1X pendant 5 min. Puis, les lames sont placées en chambre humide et incubées pendant 30 min dans du PBS+1% d'albumine de sérum bovin (BSA)+0.1% Tween 20 pendant 30 min à température ambiante. Le liquide est ensuite drainé et l'anticorps primaire est incubé pendant 12h à 4°C. Pour CHIKV, il s'agit de l'anticorps monoclonal 3E4 (dirigé contre la protéine d'enveloppe E2 du CHIKV) marqué par le fluorophore Cy3 (excitation à 550nm, émission à 570nm). Cet anticorps est dilué 500 fois dans du PBS 1X+1% BSA. Pour le DENV4, l'anticorps utilisé est un anticorps produit chez le lapin et dirigé contre le domaine 3 de la protéine d'enveloppe E du DENV4. L'anticorps est dilué 1000 fois dans du PBS 1X+1% BSA. Après incubation, les lames sont rincées trois fois dans du PBS 1X pendant 5 min à température ambiante. Pour les marquages DENV4, un anticorps secondaire anti-lapin Alexafluor 488 (excitation à 488nm, émission à 519nm) est dilué au 1/500 dans du PBS 1X+1% BSA puis appliqué pendant 1 heure à température ambiante. Les lames sont rincées trois fois dans du PBS 1X pendant 5 min. Elles sont ensuite marquées avec de la phalloïdine 488 ou 633 (Invitrogen, émission à 632nm, émission à 647) à la dilution 1/40 dans du PBS 1X+1% BSA pendant 20 min à température ambiante. Ce marquage permet de visualiser les microfilaments d'actine. Les lames sont rincées une dernière fois dans du PBS 1X, trois fois pendant 5 min, puis laissées sécher à l'air quelques minutes. Les lamelles sont ensuite montées sur les lames à l'aide d'une goutte de Prolong gold® antifade + DAPI (marquage de l'ADN, excitation à 350nm, émission à 450-490nm). Les lames sont conservées à l'obscurité et à température ambiante une journée avant d'être observées puis stockées à 4°C et à l'obscurité. Pour les double-marquages, l'anticorps primaire anti-DENV4 est incubé en premier, suivi d'un anticorps secondaire anti-lapin Alexafluor 488 puis de l'anticorps primaire anti-CHIKV. Les lames sont observées avec différents systèmes optiques permettant de visualiser la fluorescence. Nous avons utilisé le microscope confocal LSM 700 (Zeiss) et le CellVoyager CV1000 (Visitron System). Les images ont été traitées en utilisant le logiciel d'analyse d'image Fiji version 1.4.3.67.

Les marquages immunohistochimiques ont été réalisés par la plate-forme d'histologie de l'Institut Pasteur. Brièvement, les moustiques entiers sont inclus dans de la paraffine puis des coupes sont réalisées au microtome et déposées sur des lames de verre. Après une étape de déparaffinage, les lames subissent le même traitement que celui décrit dans le paragraphe précédent pour les organes à la différence que l'anticorps primaire est obtenu chez la chèvre (spécifique de la protéine d'enveloppe E2 de CHIKV, dilué au 1/500 pour les moustiques infectés par CHIKV, ou spécifique de la protéine E de DENV4, dilué au 1/1000 pour les moustiques infectés par DENV4). L'anticorps secondaire est un anticorps anti-chèvre couplé à une peroxydase (HRP), la révélation se fait à l'aide du kit « Vector VIP » (Vector Laboratories).

1.5. Quantification du nombre de copies d'ARN viral par RT-PCRq

1.5.1. Extraction de l'ARN de l'échantillon

L'ARN contenu dans chaque échantillon est extrait en utilisant le kit Nucleospin® RNA II (De Macherey-Nagel). L'ARN est élué dans 40µL d'eau sans RNase par centrifugation à 11 000g pendant une minute puis stocké à -80°C.

1.5.2. RT-PCRq

Pour quantifier l'ARN viral contenu dans chaque échantillon, nous avons utilisé le kit *power SYBR® Green RNA-tc-C_TTM* en une seule étape (Applied Biosystems). Un mélange réactionnel est préparé en ajoutant 9,8µL d'eau sans RNase, 12,5 µL de Mix 2X (contenant le tampon, les dNTPs et le MgCl₂), 0,2µL d'enzyme Mix (polymérase et transcriptase inverse), 0,25µL de l'amorce sens et de l'amorce anti-sens à 10µmol.L⁻¹. 23µL du mélange réactionnel est ajouté à 2 µL de chaque échantillon dans les puits d'une plaque à fond conique Thermo-Fast 96 semi-Skirted (ABgene). Chaque échantillon est analysé en double. Deux puits servent de référence et sont chargés d'eau sans RNase. Une gamme étalon allant de 10⁹ à 10² copies.mL⁻¹ est constituée en duplicata. La RT-PCRq se déroule sur l'appareil Fast Real-Time PCR Systems 7500 en quatre étapes : [1] transcription inverse à 48°C pendant 30 minutes après activation préalable de la polymérase à 95°C pendant 10 min, [2] 40 cycles de 15 secondes à 95°C et 1 minutes d'élongation à 60°C, [3] dénaturation finale à la fin du 40^{ème} cycle où la température

passé de 60°C à 95°C en 19 minutes et 59 secondes et [4] 95°C pendant 20 secondes. L'appareil est connecté à un ordinateur qui analyse les résultats via le logiciel 7500 Software v.2.0.1.

1.6. Titration des échantillons

Les titrages sont effectués sur des cellules Vero E6 dans des plaques 24 puits contenant 7.10^4 cellules par puits. Des dilutions séquentielles des échantillons prélevés sont effectuées et 200 μ L de chaque dilution sont disposés dans les puits. La plaque est incubée une heure à 37°C pour les échantillons contenant le CHIKV, 2 heures à 37°C pour ceux contenant le DENV4. Après ce temps d'incubation, les dilutions sont aspirées à l'aide d'une pipette. 0,5 mL d'un mélange constitué de 0.25 mL de carboxyméthyle-cellulose (CMC), 0.25 mL de milieu DMEM complété de 1% d'acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique à 1 mol.L^{-1} (HEPES), 2% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline-streptomycine-amphotéricine B est ensuite distribué dans chaque puits. Les plaques sont incubées pendant 48h pour le CHIKV, pendant 130 heures environ pour le DENV4. Après incubation, le milieu contenant la CMC est aspiré et les puits sont lavés 2 fois dans du PBS 1X. Les plaques sont fixées par une solution de cristal violet contenant 4% de PFA.

1.7. Analyse protéomique

Les échantillons de glandes salivaires et d'intestins moyens sont préparés en vue de leur analyse par spectrométrie de masse selon deux techniques différentes. Un lot d'échantillons a été transmis à la plateforme protéomique 3P5 de l'Institut Cochin et analysé avec des réactifs isobariques permettant une quantification absolue et relative (iTRAQ), l'autre lot a été exploré à la plate-forme protéomique de l'Institut Pasteur via la technique « label-free ». Chaque échantillonnage a été réalisé de manière indépendante. Cet échantillonnage a été répété trois fois pour les lots analysés en « label-free », deux fois pour ceux analysés par iTRAQ.

1.7.1. Préparation des échantillons

La préparation des échantillons est commune aux deux techniques utilisées. La première étape consiste à inactiver le virus et à faire éclater les tissus par l'application d'onde ultrasons. On utilise pour cela un sonicateur (Fischer, Bioblock Scientific Vibran Cell 75043, modèle 750 W, sonde Cuphorn) qui soumet les échantillons à des ultrasons pendant 4 minutes avec une alternance de deux secondes d'ultrasons suivi de deux secondes de pause. On renouvelle l'opération 5 fois en veillant à ce que les échantillons restent dans de la glace. Les échantillons sont ensuite transférés dans des tubes (Beckman, Centrifuge tube, 11 * 34 mm PC tube) pour une étape d'ultracentrifugation. Les tubes sont équilibrés à $10^{-2}g$ près en ajoutant si besoin du tampon. Ils sont ensuite placés dans un rotor (Beckman, TLA 120.2, 120krpm, diamètre 8 cm). L'ultracentrifugation dure 30 min à 130 000g et à 4°C (Beckman, Optima TLX Ultracentrifuge 120 000rpm). Le surnageant est ensuite transféré dans un tube eppendorf® de 1,5mL.

1.7.2. Analyse par spectrométrie de masse

Les protéines contenues dans environ 80µL sont solubilisées dans un tampon dénaturant (Tris à 100mM, pH8, urée à 8M). Les ponts disulfures sont réduits par l'ajout de 5mM de dithiothréitol (DTT) pendant 30 min à température ambiante. Une étape d'alkylation est ensuite réalisée avec 20mM d'iodoacétamide pendant 30 min, à l'obscurité et à température ambiante. La solution protéique est diluée dans 50mM de bicarbonate d'ammonium (BA), jusqu'à ce que la concentration en urée devienne inférieure à 1M. Un µg de trypsine (Promega, Madison, WI, Etats-Unis) est ajouté à chaque échantillon pour une étape de digestion toute la nuit à 37°C. La digestion est ensuite stoppée par addition d'acide formique (AF) à 0,5%. Les peptides issus de cette digestion sont ensuite purifiés à l'aide du système Sep-Pack C18 : activation par du méthanol de 50mg d'une phase C18, rinçage de la phase avec 80% d'acétonitrile (ACN) + 0,1% AF puis trois lavage par une solution 0,1% AF. Les échantillons sont chargés deux fois sur la colonne. La résine est lavée trois fois avec 0,1% AF, puis une fois avec 2% ACN+0,1% AF. Les peptides sont alors élués dans 50% ACN+0,1% AF La solution peptidique est ensuite concentrée par évaporation à l'aide d'un concentrateur à vide. Les peptides ont été analysés par nano LC-MS/MS à l'aide de l'appareil de chromatographie EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) couplé à un spectromètre de masse Q Exactive Orbitrap. Les données ont été acquises à l'aide du logiciel XCalibur 2.2 (Thermo Fischer Scientifique). Les données récupérées ont été comparées à

la base de données d'*Aedes aegypti* issue de SwissProt et TrEMBL et aux protéines structurales et non-structurales du virus du chikungunya 05-049 et du sérotype 4 du virus de la dengue référencées sur GenBank.

Les échantillons ont également été analysés par la technique iTRAQ. Les peptides obtenus à partir de chaque échantillon sont marqués avec les différents réactifs isobariques iTRAQ selon le protocole du fabricant (iTRAQ Reagents Application Kit Plasma, Applied Biosystems). Après vérification du pourcentage de marquage et adaptation éventuelle de celui-ci, les échantillons sont fractionnés par nano-HPLC et les peptides isolés analysés sur le spectromètre Orbitrap VELOS (Thermo Scientific). Les spectres sont analysés et quantifiés avec le logiciel ProteinPilot. La banque de donnée consultée est la banque fournie par le National Center for Biotechnology Information (NCBI, mai 2014) : *stegomyia* (contient les données pour *Aedes albopictus* et *aegypti*).

2. Résultats

2.1. Présence de CHIKV et de DENV4 dans l'organisme d'*Aedes albopictus* infectés expérimentalement

Un premier marquage immunohistochimique a été réalisé à partir de moustique entier afin de visualiser la diffusion des particules virales dans l'organisme du vecteur. Le marquage a été réalisé pour des moustiques infectés par CHIKV et DENV4 (fig. 35 et 36).

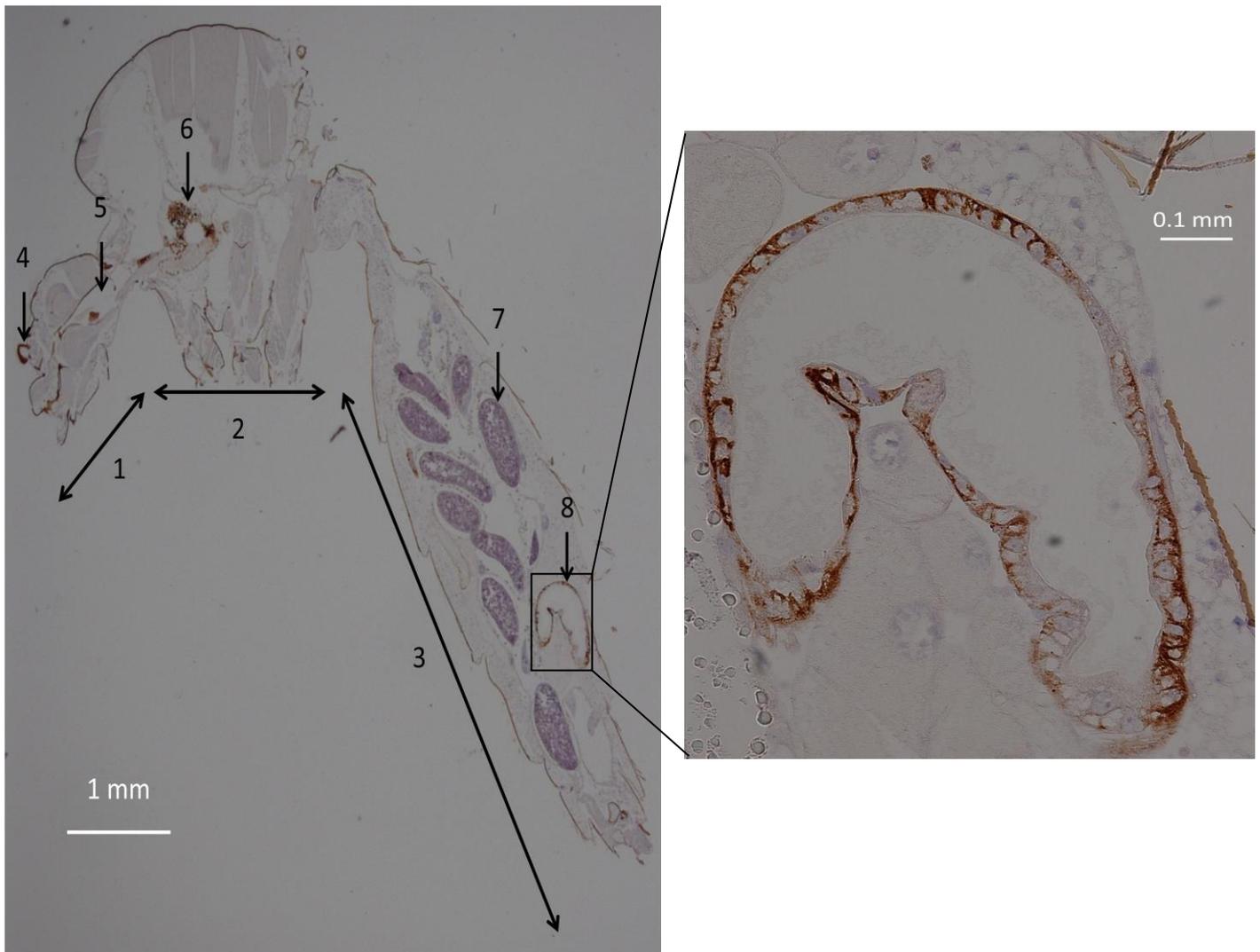


Figure 33 : Marquages immunohistochimiques d'un moustique entier infecté par CHIKV à 14 jours post-infection. Révélation du marquage à la peroxydase (coloration brune). A gauche : Moustique entier, à droite : agrandissement d'une portion de l'intestin moyen. (1) tête, (2) thorax, (3) abdomen, (4) œil, (5) œsophage, (6) glandes salivaires, (7) ovaires, (8) portion d'intestin moyen.

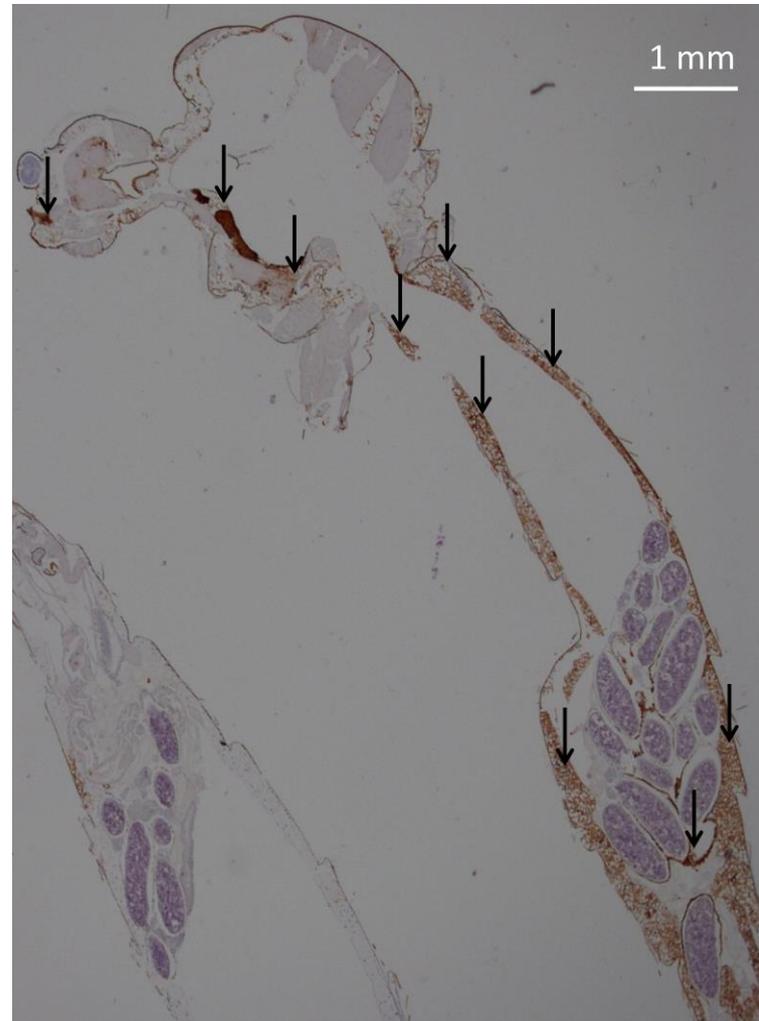
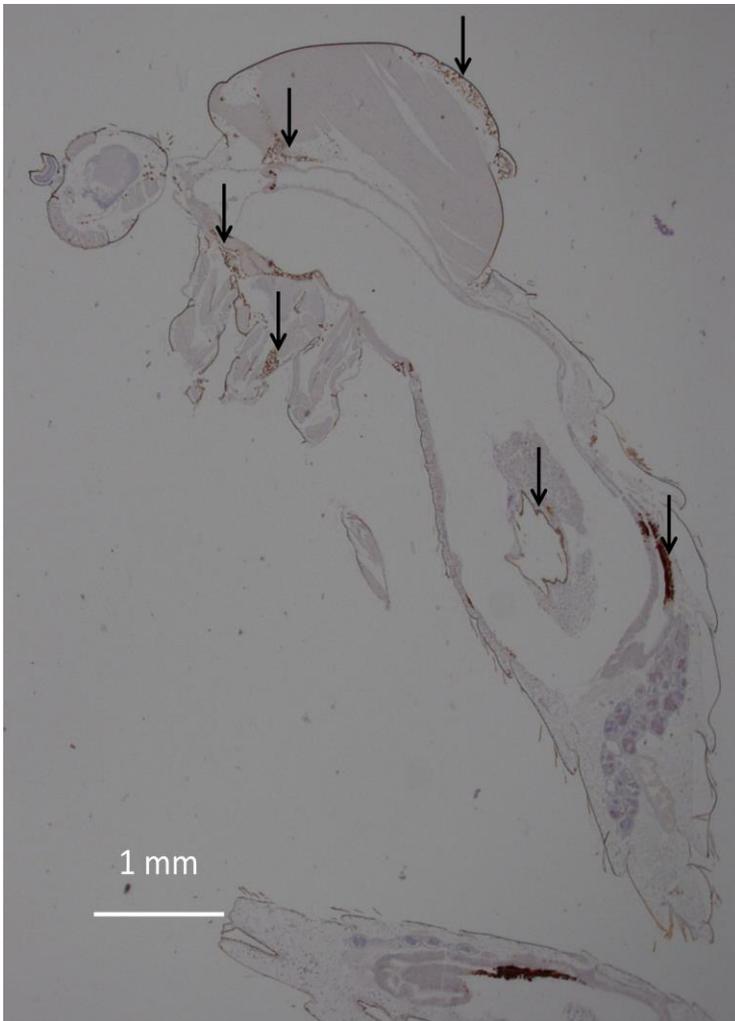


Figure 34 : Marquages immunohistochimiques de moustiques entiers infectés par DENV4. Révélation du marquage à la peroxydase (coloration brune). A gauche : 10 jours post-infection, à droite : 14 jours post-infection. Les flèches désignent les zones particulièrement infectées.

On remarque que l'intestin moyen est infecté précocement puisque les particules virales sont retrouvées dans l'ensemble de l'organisme du moustique, avec un marquage particulièrement important dans les glandes salivaires. Dans un second temps, l'analyse par immunofluorescence a été réalisée dans le but de confirmer la présence des virus dans les organes prélevés et de suivre la progression de l'infection au cours du temps de manière qualitative (fig. 38).

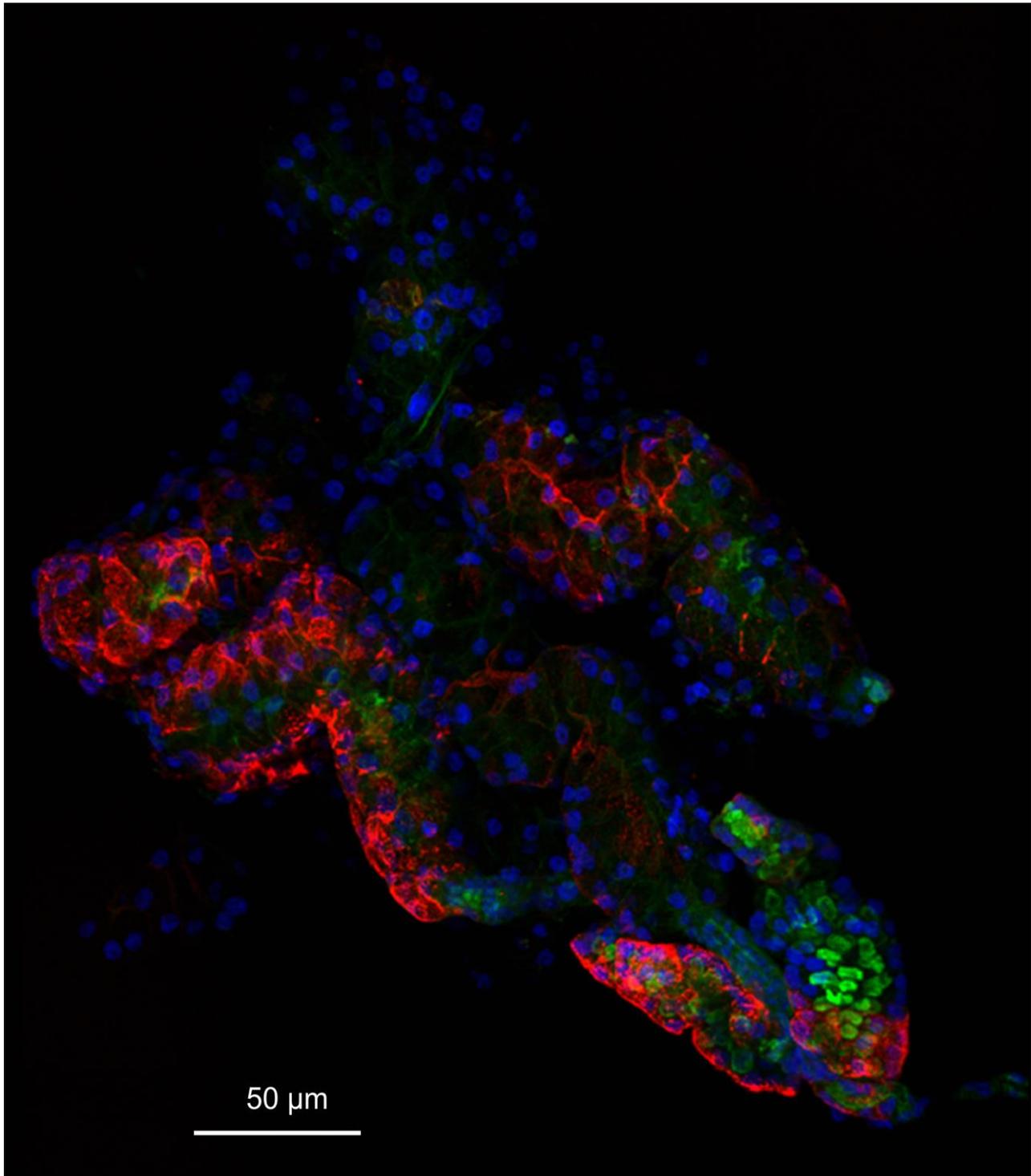


Figure 35 : Marquage immunofluorescent d'une glande salivaire d'un *Aedes albopictus* prélevée cinq jours après infection par CHIKV. L'image est une reconstruction tridimensionnelle réalisée d'après des coupes d'une glande salivaire obtenues au microscope confocal et analysées par le logiciel d'image Fiji. Les noyaux cellulaires sont marqués au DAPI (Bleu), le réseau d'actine à la phalloïdine 488 (vert) et la protéine d'enveloppe E2 de CHIKV est reconnue par un anticorps spécifique couplé au fluorophore Cy3 (rouge). On remarquera que les lobes latéraux des glandes salivaires sont plus fortement marqués que le lobe central.

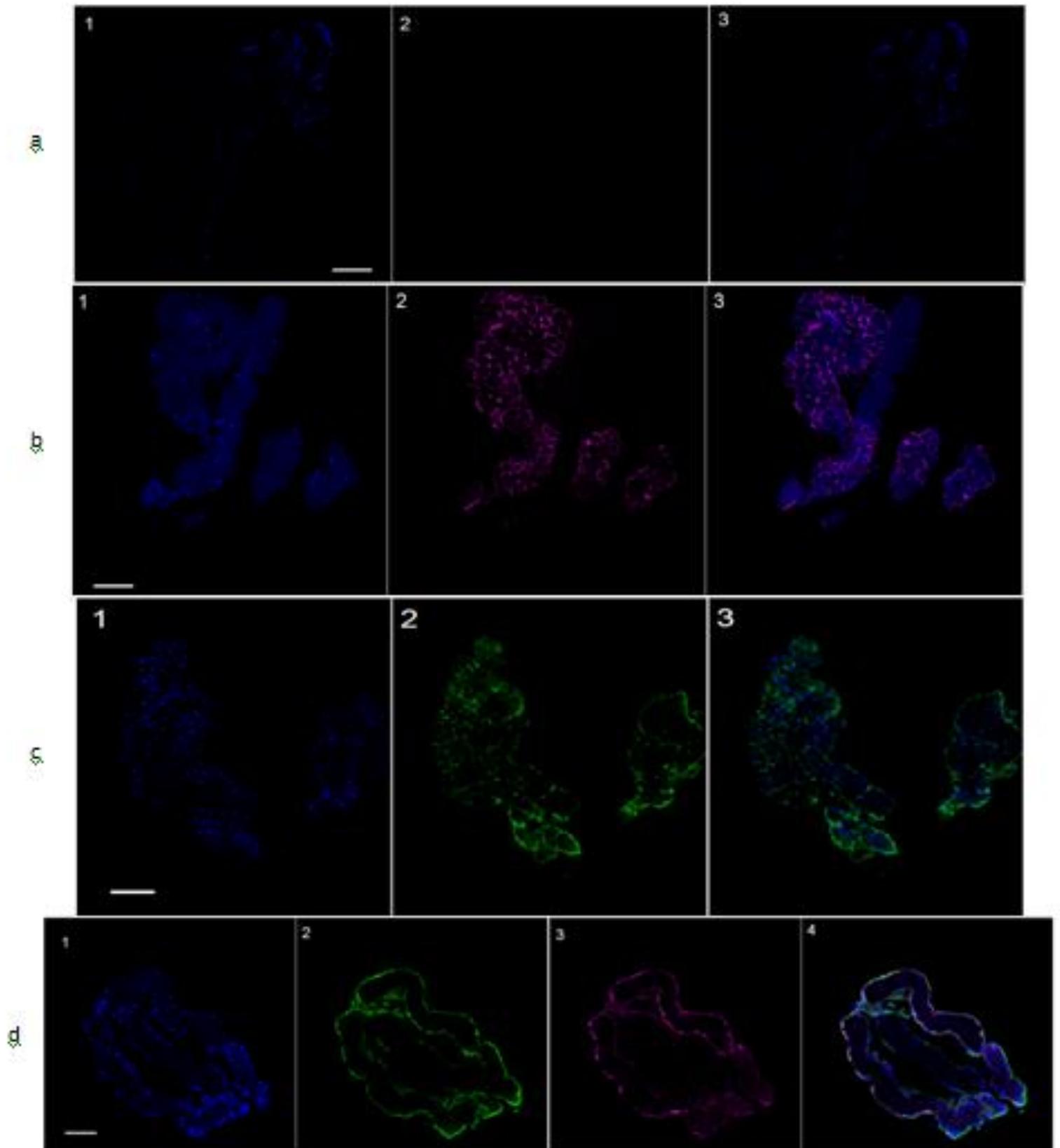


Figure 36: Marquage immunofluorescent de glandes salivaires d'un *Aedes albopictus* (a) non-infecté, (b) infecté par CHIKV, (c) infecté par DENV4, (d) co-infecté par CHIKV et DENV4. Le DAPI apparait en bleu, la protéine d'enveloppe E2 du CHIKV en magenta, la protéine d'enveloppe E du DENV4 est en vert. La barre blanche représente 50µm.

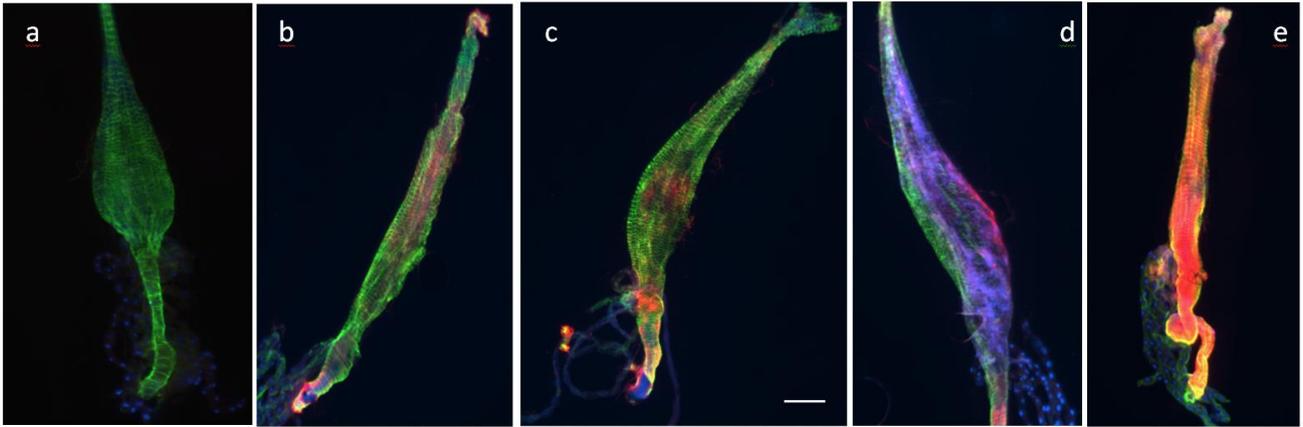


Figure 37 : Dynamique d'infection de CHIKV dans les intestins moyens d'*Aedes albopictus*. Les noyaux sont marqués au DAPI (en bleu), la protéine d'enveloppe E2 du chikungunya en rouge et le réseau d'actine en vert. (a) témoin non-infecté, (b) 3 jours post-infection, (c) 5 jours post-infection, (d) 7 jours post-infection, (e) 9 jours post-infection. Les intestins moyens sont disposés de façon à ce que l'extrémité antérieure de l'organe soit située en haut de la photographie. La barre blanche représente 200 μ m.

L'immunofluorescence permet de confirmer la présence du virus dans les organes étudiés. L'observation des lames révèle que l'infection par CHIKV et DENV4 de l'intestin moyen se fait de façon préférentielle en partie distale avant de diffuser à la totalité de l'épithélium. Dans les derniers jours de l'infection, le signal est très fort et présent sur l'ensemble du tube digestif ce qui suggère une importante amplification virale dans l'intestin moyen. Inversement, les tubes de Malpighi (fig. 29) semblent épargnés par l'infection virale, même pour des temps tardifs (fig. 39). Les glandes salivaires peuvent présenter un marquage spécifique dès le troisième jour après infection dans le cas du CHIKV. Dans le cas du DENV4, il faut généralement attendre plus de 7 jours post-infection pour observer un signal (fig. 38). Les glandes salivaires sont infectées de façon partielle par CHIKV, DENV4 et CHIKV/DENV4, préférentiellement dans la région distale des lobes latéraux, le lobe central étant généralement épargné (fig. 37).

2.2. Présence de CHIKV et DENV4 dans la salive d'*Aedes albopictus* infectés expérimentalement

L'analyse des échantillons de salive par RT-PCRq et titrage révèle la présence de particules virales infectieuses excrétées dans la salive du vecteur dès 7 jours post-infection par CHIKV. Parmi les échantillons analysés (14 pour CHIKV), 50% sont positifs avec un titre moyen de $6,8 \cdot 10^3$ ufp.mL⁻¹. Pour DENV4, les prélèvements ont été réalisés à 17 jours post-infection et à 20 jours post-infection. A 17 jours post-infection, nous avons réalisé une analyse à la fois par titrage et par RT-PCRq, respectivement sur 13 et 5 échantillons. Aucune des deux analyses n'a permis de mettre en évidence de virus dans la salive excrétée par les moustiques. A 20 jours post-infection, nous disposions de 38 échantillons de salive, l'analyse a été réalisée uniquement par RT-PCRq (fig. 40).

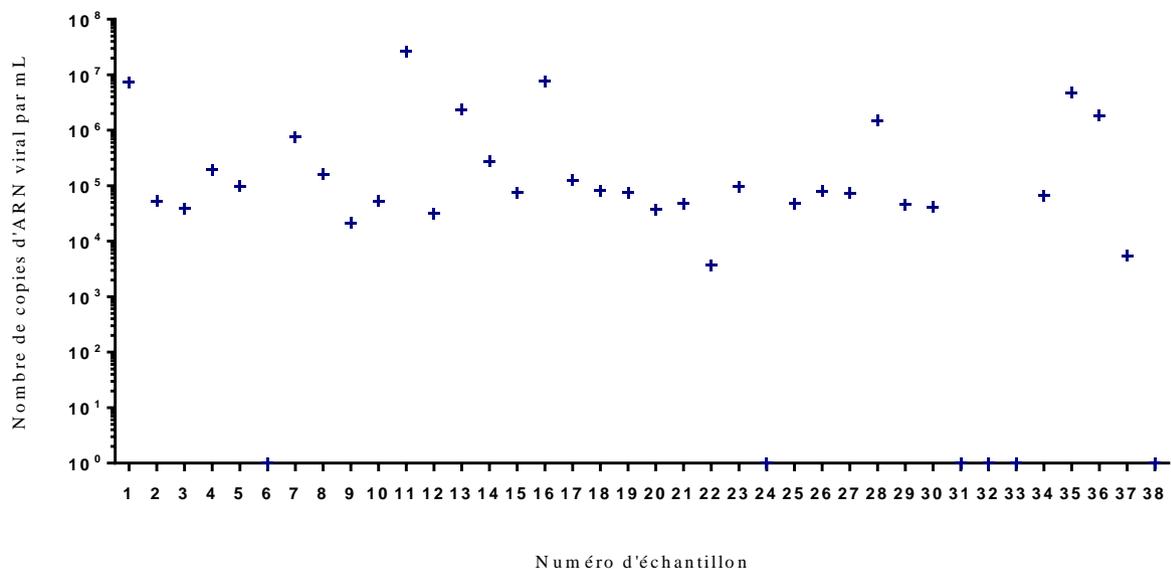


Figure 38: Nombre de copies d'ARN viral par mL retrouvées dans la salive de moustique *Aedes albopictus* 20 jours après infection expérimentale par DENV4. L'analyse est effectuée par RT-PCRq. Chaque croix correspond à un échantillon de salive.

20 jours post-infection, on remarque que la majorité des moustiques infectés expérimentalement par DENV4 présentent un nombre de copies d'ARN viral supérieur à 10^3

copies par mL. Sur 38 échantillons, seulement 6 sont négatifs (15,8%), la moyenne des échantillons positifs étant de $1,7 \cdot 10^6$ copies d'ARN viral par mL.

2.3. Cinétique d'infection d'*Aedes albopictus* par CHIKV et DENV4

L'objectif de l'étude étant de mettre en évidence des modifications de l'expression protéique dans les glandes salivaires et l'intestin moyen de moustiques infectés par des arbovirus, il est nécessaire de déterminer les cinétiques d'infection pour chacun des deux virus. En effet, nous souhaitons prélever les organes pour réaliser une analyse protéomique au moment où les interactions entre les virus et les organes sont les plus fortes. Nous supposons que ce moment correspond au pic de l'infection des organes par le virus. Cette étape est d'autant plus importante pour DENV4 pour lequel aucune cinétique d'infection n'avait encore été documentée.

2.3.1. Cinétique d'infection d'*Aedes albopictus* par CHIKV

La cinétique d'infection du vecteur est suivie par RT-PCRq au niveau de deux organes : les glandes salivaires et les intestins moyens. Au total, deux séries d'infections ont été réalisées. Tous les deux jours, nous avons prélevé 5 intestins moyens et 10 glandes salivaires. Les résultats présentés sont exprimés en nombre de copies d'ARN viral par organe, chaque point représentant la valeur moyenne pour 20 glandes salivaires ou 10 intestins moyens obtenus au cours de 2 infections expérimentales indépendantes (fig. 41).

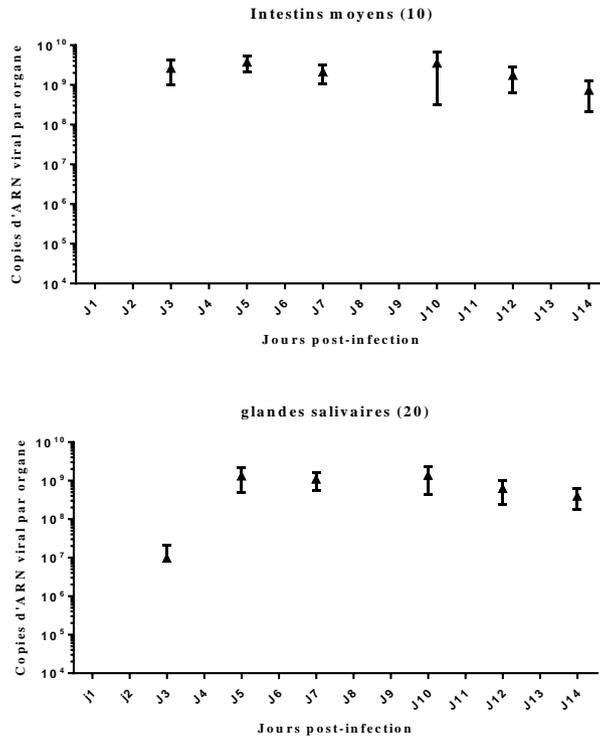


Figure 39 : Nombre de copies d'ARN viral de CHIKV dans les intestins moyens ou les glandes salivaires en fonction du temps. Chaque point correspond à la valeur moyenne pour 10 intestins moyens ou 20 glandes salivaires. Les barres représentent les écarts-type.

Le CHIKV infecte les cellules de l'intestin moyen avec un nombre de copies d'ARN par organe maximal dès le troisième jour après infection. Nous avons choisi de prélever les intestins moyens à cinq jours post-infection pour l'analyse protéomique de manière à s'assurer que les interactions entre le virus et la synthèse protéique aient le temps de se mettre en place (fig. 41). Le virus dissémine très rapidement vers les glandes salivaires. En effet, 5 jours après infection, la totalité des glandes salivaires analysées sont positives et le nombre de copies d'ARN viral retrouvées est supérieur à 10⁹ copies par organe. De plus, ce nombre de copies augmente de 2 log entre le jour 3 et le jour 5 ce qui suggère une réplication du virus dans les glandes salivaires. Par la suite, ce nombre reste relativement stable. Des titrages ont également été effectués afin de vérifier l'infectiosité des particules virales. A J3, aucune des 10 paires de glandes analysées n'est positive. A partir de J5, le titre moyen par glande salivaire est de 10⁸ ufp par organe et demeure stable par la suite. Pour cette raison, nous avons décidé de prélever les glandes salivaires pour analyse protéomique 5 jours après infection.

2.3.2. Cinétique d'infection d'*Aedes albopictus* par DENV4

Une démarche identique a été appliquée dans le cadre de moustiques infectés par DENV4. La cinétique d'infection d'*Aedes albopictus* par DENV4 est inconnue à ce jour. Nous avons donc réalisé quatre séries d'infections (contre deux pour CHIKV) afin de nous assurer de la validité et de la reproductibilité de nos résultats. Les courbes ci-dessous représentent donc le nombre de copies d'ARN viral par organe, chaque point correspondant à 20 intestins moyens (fig. 42) ou 40 glandes salivaires (fig. 43) obtenus au cours de quatre infections expérimentales indépendantes.

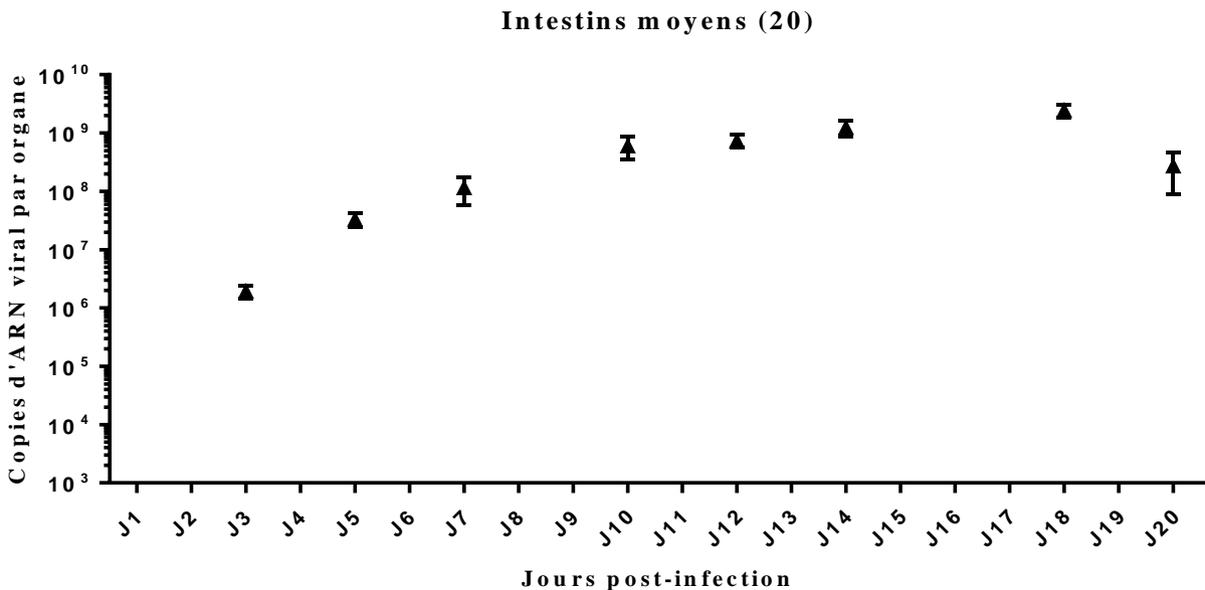


Figure 40 : Nombre de copies d'ARN viral de DENV4 dans l'intestin moyen en fonction du temps. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 20 intestins moyens. Les barres représentent les écarts-type.

Le pic de l'infection semble atteint relativement tard (jour 10 post-infection), comparativement aux moustiques infectés par CHIKV (3 jours post-infection). Cependant, en raison de la valeur relativement importante atteinte dès J5 post-infection et afin de pouvoir comparer l'effet de deux virus sur un même organe, nous avons choisi de prélever les intestins moyens destinés à l'analyse protéomique à cette date.

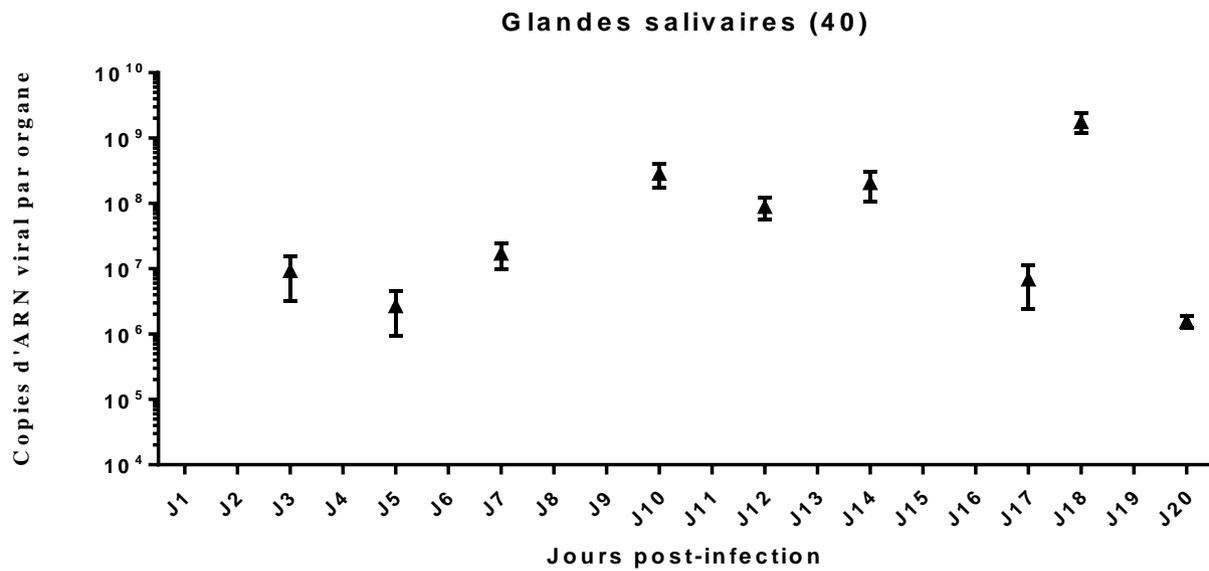


Figure 41 : Nombre de copies d'ARN viral de DENV4 dans les glandes salivaires en fonction du temps. Chaque point correspond à la valeur moyenne de 40 glandes salivaires. Les barres représentent les écarts-type.

Le virus DEN4 est capable d'infecter *Aedes albopictus* et de disséminer jusqu'aux glandes salivaires. Il apparaît cependant que cette dissémination est à la fois moins intense et moins rapide que dans le cas du CHIKV avec un nombre de copies d'ARN par glande salivaire infectée de seulement $2,9 \cdot 10^8$ à J10 contre $1,3 \cdot 10^9$ dès J5 pour CHIKV. On note également que le nombre de glandes salivaires non-infectées est relativement important : au pic de l'infection (J10), 12,5% des glandes salivaires ne présentent pas de virus. Pour le CHIKV, les glandes salivaires sont toutes infectées 5 jours après infection. Au-delà de 14 jours post-infection, on remarque une très grande variabilité des valeurs relevées en fonction de jours, avec un nombre de copies d'ARN viral qui fluctue de 2 log entre J17 et J20. D'après ces observations, nous avons choisi de prélever les glandes salivaires pour l'analyse protéomique à J14. A cette date, le nombre de copie d'ARN viral est proche du nombre maximal retrouvé dans les glandes salivaires et 92,5% des glandes sont infectées contre seulement 87,5% au pic de l'infection (fig. 44). Nous avons exclu de prélever les glandes salivaires à J18 en raison des fortes variations du nombre de copies d'ARN viral au-delà de J14.

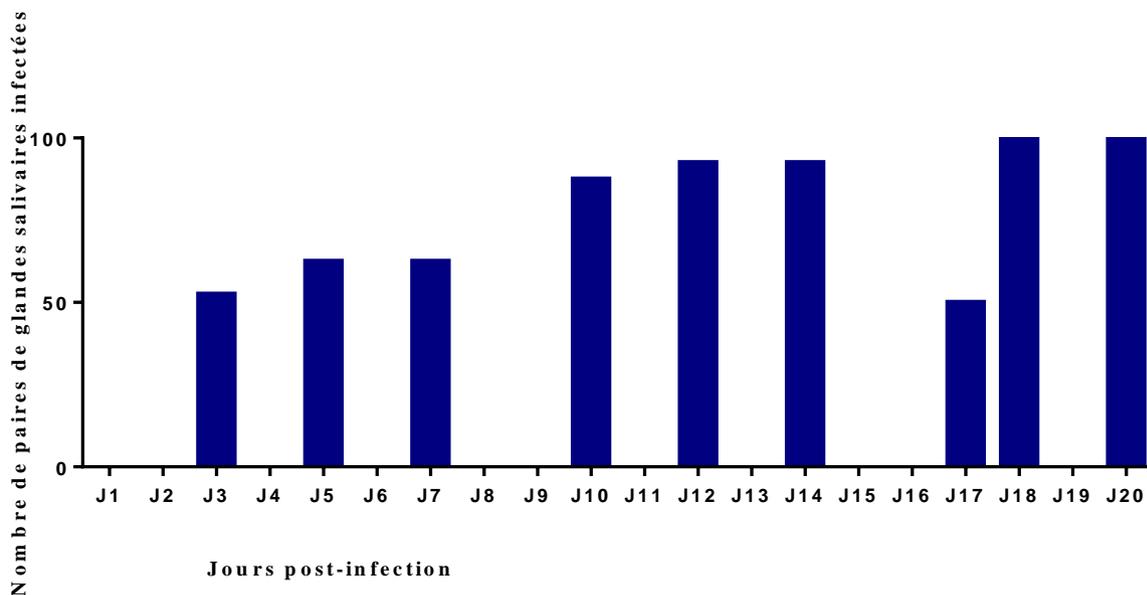


Figure 42 : Pourcentage de paires de glandes salivaires infectées (nombre de copies d'ARN viral détectées par RT-PCRq non nul) en fonction du temps.

2.3.3. Cinétique de co-infection d'*Aedes albopictus* par CHIKV et DENV4

Une unique co-infection CHIKV/DENV4 a été réalisée et des glandes salivaires et des intestins moyens provenant des moustiques infectés ont été prélevés. On remarque que la co-infection d'*Aedes albopictus* par CHIKV et DENV4 est associée à un pic d'infection des glandes salivaires atteint plus précocement pour les deux virus. Ainsi, CHIKV est présent dans les glandes salivaires dès J3 à un nombre de copies de $1.6.10^9$ par organe soit une valeur normalement retrouvée plus tardivement après l'infection. La même observation peut être faite pour le DENV4 avec un pic d'infection atteint à J7 contre J10 en mono-infection. De façon intéressante, il semble que la co-infection n'influe pas sur le nombre maximal de copies d'ARN viral de CHIKV retrouvées dans les organes puisque le pic est atteint pour des valeurs similaires à celles trouvées en mono-infection (fig. 45). En revanche, pour DENV4, la co-infection entraîne une diminution du nombre de particules virales retrouvées dans les glandes salivaires comparativement à une mono-infection. Le nombre de particules virales retrouvées dans les

glandes salivaires co-infectées par CHIKV est en moyenne inférieur de 2 log à la mono-infection.

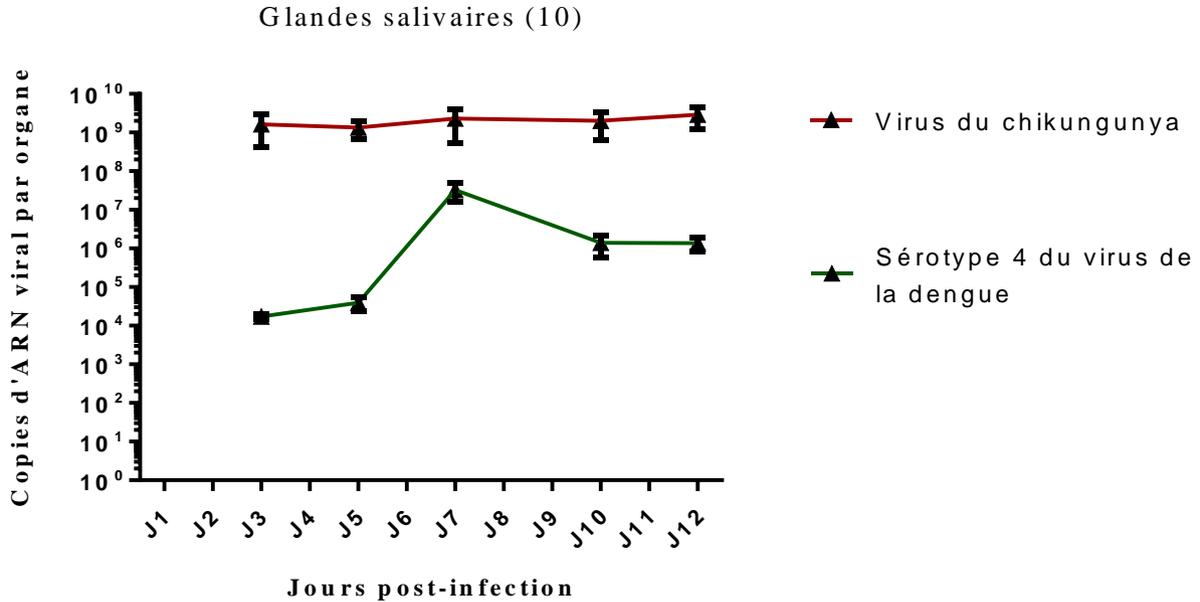


Figure 43 : Nombre de copies d'ARN viral dans les glandes salivaires d'*Aedes albopictus* co-infectés par CHIKV et DENV4. Chaque point correspond à 10 glandes salivaires, les barres représentent les écarts-type.

2.4. Protéomes de glandes salivaires et d'intestins moyens d'*Aedes albopictus*

En se fondant sur les cinétiques obtenues, les échantillons ont été prélevés cinq jours post-infection pour les intestins moyens et les glandes salivaires de moustiques infectés par CHIKV et pour les intestins moyens de moustiques infectés par DENV4. Les glandes salivaires de moustiques infectées par DENV4 ont été disséquées à J14 post-infection. Des échantillons témoins ont également été prélevés aux mêmes temps post-gorgement sur des moustiques ayant été gorgés sur un mélange non-infecté.

2.4.1. Protéomes obtenus par la technique iTRAQ

La technique iTRAQ a permis d'établir un protéome d'intestin moyen d'*Aedes albopictus* comportant 1561 protéines. 604 protéines ont été identifiées dans les glandes salivaires dont 10% sont des protéines excrétées dans la salive. Il s'agit du premier protéome d'intestin moyen décrit chez le moustique du genre *Aedes* et le premier protéome de glande salivaire chez *Aedes albopictus*.

2.4.2. Protéomes obtenus par la technique « label-free »

La technique « label-free » a quant à elle permis d'identifier 1076 protéines pour les glandes salivaires et 1415 protéines pour les échantillons d'intestin moyens.

2.5. Protéomes d'*Aedes albopictus* infectés expérimentalement

Afin de quantifier les niveaux d'expression, les quantités de protéines de chaque type ont été comparées entre les échantillons provenant de moustiques infectés et ceux provenant de moustiques non-infectés. Les résultats apportés par la méthode iTRAQ se sont révélés relativement décevants pour ce qui concerne les intestins moyens en raison d'un problème technique survenu pendant l'analyse des résultats. Les peptides marqués par les réactifs iTRAQ 115 n'ont pas été détectés, ce qui réduit la significativité des différences observées. A ce jour, le défaut n'est pas encore réglé. L'analyse des glandes salivaires s'est déroulée sans incident et a permis d'identifier 19 protéines modulées, parmi lesquelles on trouve 14 protéines salivaires (protéines de la famille D7, allergène 30kDa, antigen 5 related protéin AG5-4, apyrase...). Pour ce qui est de la technique « label-free », de nombreuses protéines sont retrouvées en quantité significativement différente selon les échantillons. Pour une protéine donnée, on interprète une quantité plus faible dans les échantillons non-infectés que dans les échantillons infectés comme une stimulation de l'expression de cette protéine en conséquence de l'infection virale. Inversement, si une même protéine est retrouvée en quantité plus importante dans les échantillons non infectés, on parlera d'inhibition de la synthèse de cette protéine. Sauf mention contraire, les résultats présentés par la suite sont issus de l'analyse « label-free » (fig. 46).

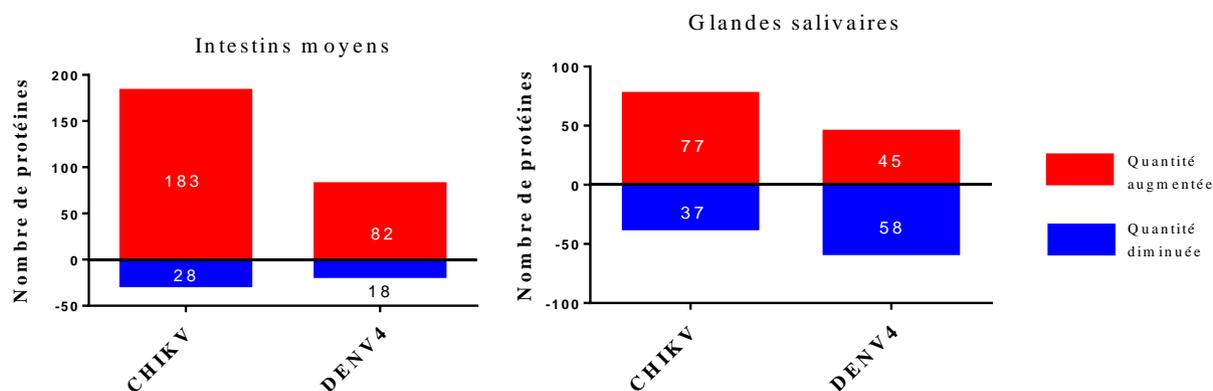


Figure 44 : Nombre de protéines dont la quantité varie dans les glandes salivaires ou dans l'intestin moyen d'*Aedes albopictus* infectés par CHIKV ou par DENV4 (« label-free »). Pour chaque couple organe/virus, les résultats sont issus de la comparaison de trois échantillons d'organes infectés avec trois échantillons d'organes non-infectés. L'ensemble des échantillons sont obtenus de manière indépendante (après des gorgements différents).

L'infection virale modifie la synthèse protéique dans les glandes salivaires et les intestins moyens d'*Aedes albopictus*. Le nombre de protéines dont l'expression est modulée est globalement plus important dans le cas de CHIKV que dans le cas de DENV4 (211 contre 100 dans les intestins moyens, 114 contre 103 dans les glandes salivaires).

2.5.1. Modulation de la synthèse protéique de l'intestin moyen

L'intestin moyen est le premier organe du moustique dans lequel les arbovirus peuvent se répliquer. Il peut donc jouer le rôle de barrière ou d'organe d'amplification. Dans cette perspective, l'étude de la modulation de la synthèse protéique dans l'intestin moyen par les virus CHIKV et DENV4 permet de mieux comprendre les interactions entre cet organe et les deux arbovirus étudiés ici.

2.5.1.1. Par CHIKV

Le nombre de protéines dont l'expression est modulée dans l'intestin moyen en présence de CHIKV est très important puisque 211 protéines sur 1415 voient leur synthèse modifiée au cours de l'infection. Parmi ces protéines, seulement 13,3% ont une synthèse diminuée. On remarque que les principales fonctions protéiques impactées sont la synthèse protéique, le catabolisme et le métabolisme énergétique (fig. 47).

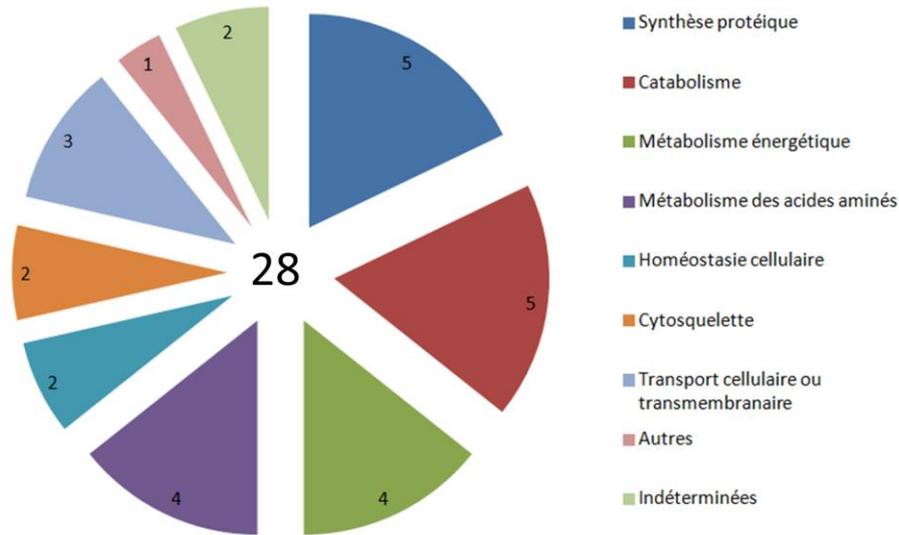


Figure 45 : Fonctions des protéines de l'intestin moyen dont l'expression est diminuée en présence de CHIKV. Les nombres inscrits dans les secteurs indiquent le nombre de protéines de chaque type. Le nombre inscrit au centre représente le nombre de protéines totales.

Une grande majorité des protéines ont une synthèse augmentée (86,7%). Plus du tiers des 183 protéines dont l'expression est augmentée sont impliquées dans la synthèse protéique. La seconde fonction protéique présentant le plus grand nombre est représentée par les protéines du métabolisme énergétique. Ces deux fonctions représentent à elles seules plus de la moitié des protéines dont la synthèse est augmentée en présence de CHIKV (fig. 48).

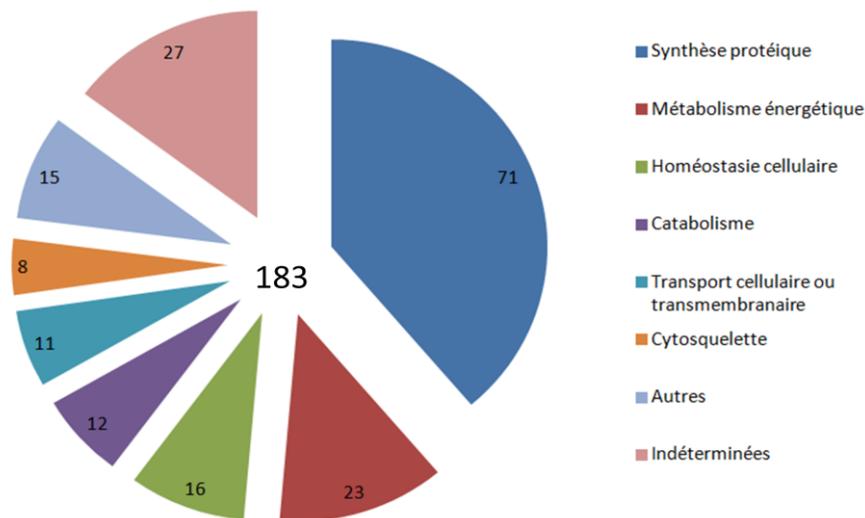


Figure 46 : Fonctions des protéines de l'intestin moyen dont l'expression est augmentée en présence de CHIKV. Les nombres inscrits dans les secteurs indiquent le nombre de protéines de chaque type. Le nombre inscrit au centre représente le nombre de protéines totales.

En bilan, nous pouvons constater que l'infection de l'intestin moyen par CHIKV s'accompagne d'une très forte stimulation des fonctions liées à la synthèse protéique et au métabolisme énergétique.

2.5.1.2. Par DENV4

L'infection de l'intestin moyen par DENV4 entraîne la modulation de l'expression de deux fois moins de protéines que dans le cas de CHIKV (100 contre 211). Le nombre de protéines dont l'expression est diminuée est relativement faible (18 protéines) et plus du quart de celles-ci sont impliquées dans l'homéostasie cellulaire (fig. 49).

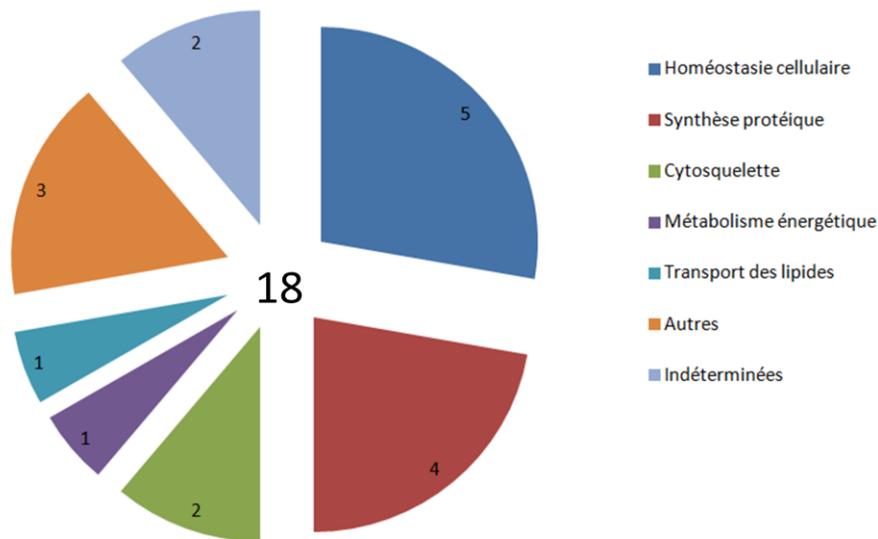


Figure 47 : Fonctions des protéines de l'intestin moyen dont l'expression est diminuée en présence de DENV4. Les nombres inscrits dans les secteurs indiquent le nombre de protéines de chaque type. Le nombre inscrit au centre représente le nombre de protéines totales.

Comme pour CHIKV, la majeure partie des protéines dont la synthèse est modulée voient leur expression augmentée en présence de DENV4. On retrouve également la synthèse protéique et le métabolisme énergétique comme fonctions principales auxquelles on peut ajouter le catabolisme (fig. 50).

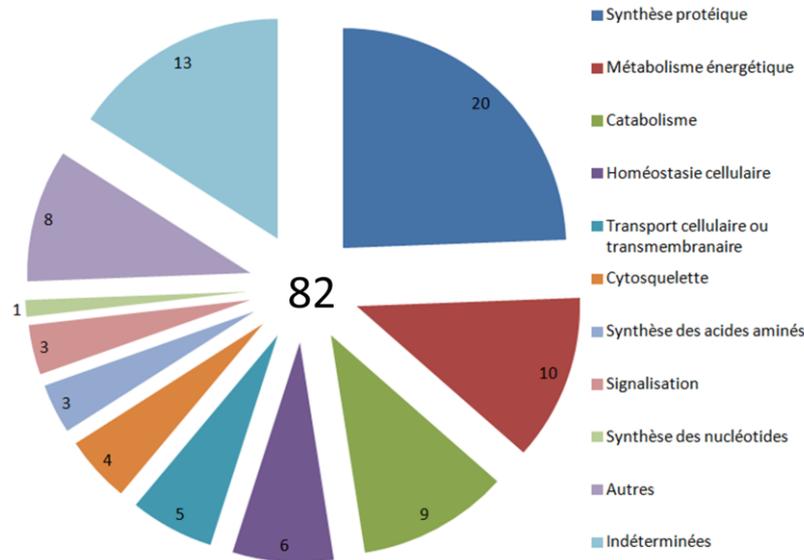


Figure 48 : Fonctions des protéines de l'intestin moyen dont l'expression est augmentée en présence de DENV4. Les nombres inscrits dans les secteurs indiquent le nombre de protéines de chaque type. Le nombre inscrit au centre représente le nombre de protéines totales.

2.5.2. Modulation de la synthèse protéique des glandes salivaires par CHIKV et DENV4

L'éventuelle modulation de la synthèse protéique par les virus et la nature des fonctions impactées sont particulièrement intéressantes puisque les glandes salivaires constituent l'ultime organe où peut avoir lieu une réplication avant le passage des particules virales infectieuses dans la salive. Une attention particulière a été portée à l'identification des protéines dites « salivaires », c'est-à-dire aux protéines excrétées dans la salive donc susceptibles d'être injectées à l'hôte au moment de la pique. La technique « iTRAQ » a permis d'identifier 14 protéines salivaires dont l'expression est modulée en présence de CHIKV. Toutes ont une expression inhibée.

Il a également été possible de comparer des échantillons des glandes salivaires prélevés chez des moustiques non-infectés. Le premier échantillon a été collecté à 5 jours post-gorgement pour l'échantillon A, 14 jours post-gorgement pour l'échantillon B. On peut noter une variation des rapports relatifs en protéines entre ces échantillons. 27 protéines sont sous-exprimées et 22 surexprimées dans l'échantillon A par rapport à l'échantillon B. L'âge des moustiques influence donc sur la nature de la synthèse protéique.

2.5.1.1. Par CHIKV

114 protéines ont une synthèse modulée en présence de CHIKV dans les glandes salivaires, cinq jours seulement après infection. Parmi ces protéines, 37 soit un tiers environ, ont une expression diminuée. On remarque une très forte proportion de protéines salivaires parmi les protéines dont la synthèse est diminuée (12,3%) ainsi qu'une grande diversité des fonctions protéiques modulées. On retrouve également une diminution de la synthèse de protéines appartenant à la bactérie *Wolbachia*, ce qui indique que cet endosymbionte naturellement présent chez *Aedes albopictus* est lui-aussi influencé par l'infection virale (fig.51).

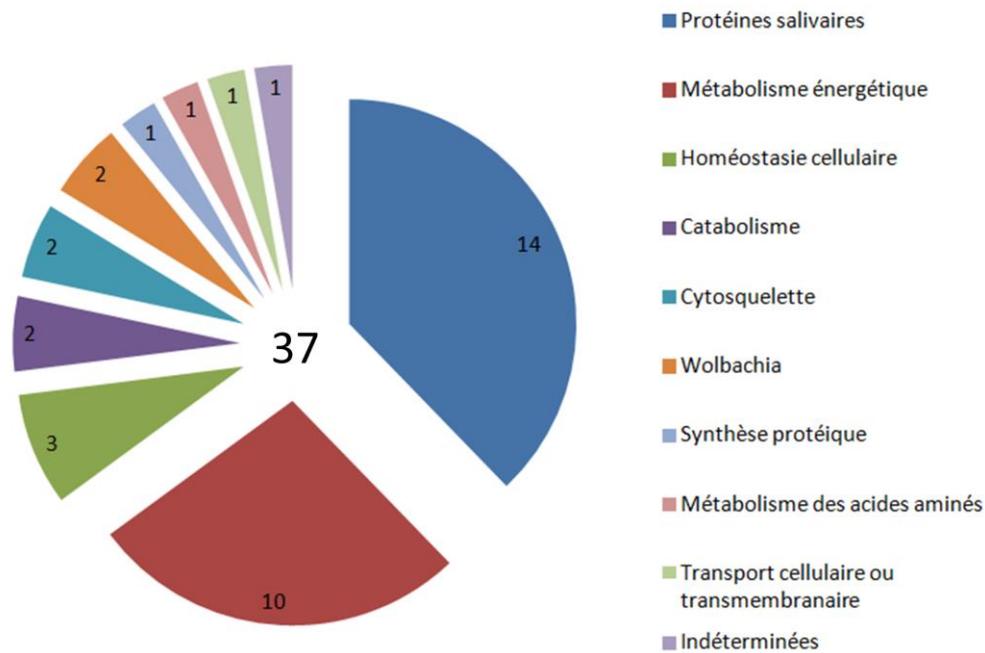


Figure 49 : Fonctions des protéines des glandes salivaires dont l'expression est diminuée en présence de CHIKV. Les nombres inscrits dans les secteurs indiquent le nombre de protéines de chaque type. Le nombre inscrit au centre représente le nombre de protéines totales.

La majorité des protéines identifiées ont une expression augmentée dans les glandes salivaires en présence de CHIKV (67,5%). Une tendance très nette se dégage avec près de la moitié de ces protéines qui sont impliquées dans la synthèse protéique. Trois protéines salivaires voient également augmenter leur synthèse en présence de CHIKV (fig. 52).

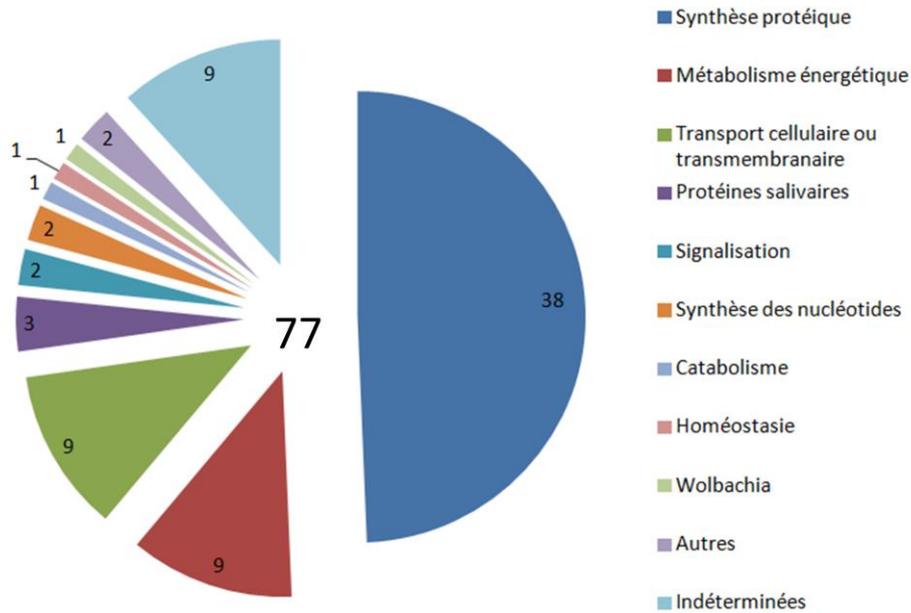


Figure 50 : Fonctions des protéines des glandes salivaires dont l'expression est augmentée en présence de CHIKV. Les nombres inscrits dans les secteurs indiquent le nombre de protéines de chaque type. Le nombre inscrit au centre représente le nombre de protéines totales.

2.5.1.2. Par DENV4

Pour DENV4, le nombre de protéines modulées dans les glandes salivaires est sensiblement le même que dans le cas de CHIKV avec 103 protéines dont l'expression est modulée pour DENV4 contre 114 pour CHIKV. Cependant, une différence majeure est observée pour DENV4 car le nombre de protéines dont l'expression est diminuée est supérieur à celui de protéines dont l'expression est augmentée. En effet, 43,7% des protéines sont retrouvées en quantité plus importante et 56,7% en quantité plus faible. La fonction protéique la plus touchée est de loin la synthèse protéique, près des trois quart des protéines ayant une synthèse diminuée qui appartiennent à cette catégorie. Six protéines salivaires voient également leur synthèse inhibée par l'infection (fig. 53).

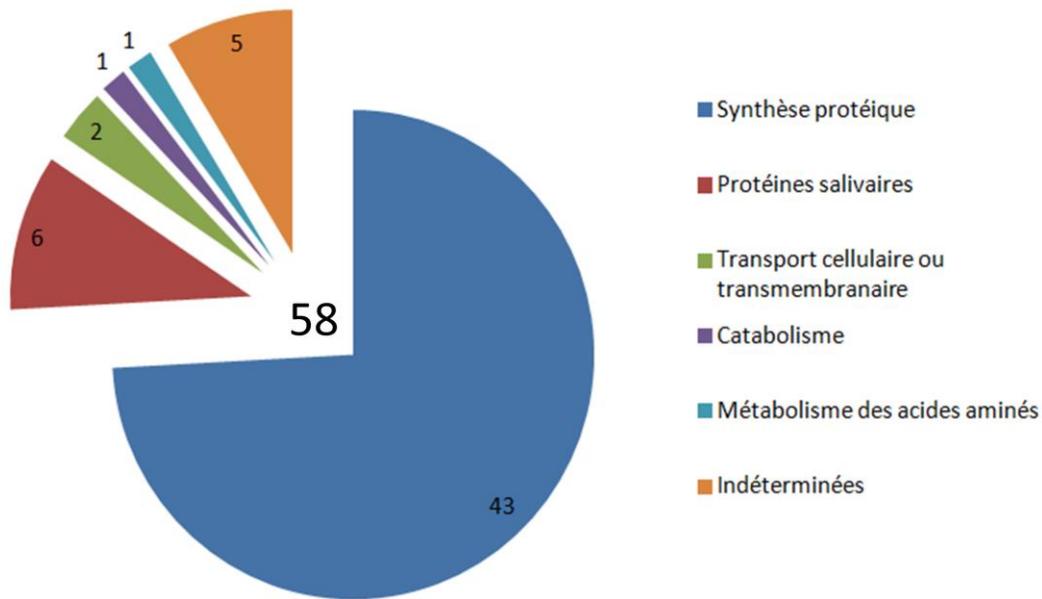


Figure 51 : Fonctions des protéines des glandes salivaires dont l'expression est diminuée en présence de DENV4. Les nombres inscrits dans les secteurs indiquent le nombre de protéines de chaque type. Le nombre inscrit au centre représente le nombre de protéines totales.

Concernant les protéines dont l'expression est augmentée en présence de DENV4, on retrouve de nombreuses fonctions avec un nombre de protéines modulées relativement équivalent. Les protéines impliquées dans le catabolisme et l'homéostasie cellulaire représentent près du quart des protéines totales (22,9%). On remarque aussi la présence de six protéines salivaires parmi les protéines dont l'expression est augmentée ainsi que quatre protéines de *Wolbachia* (fig. 54).

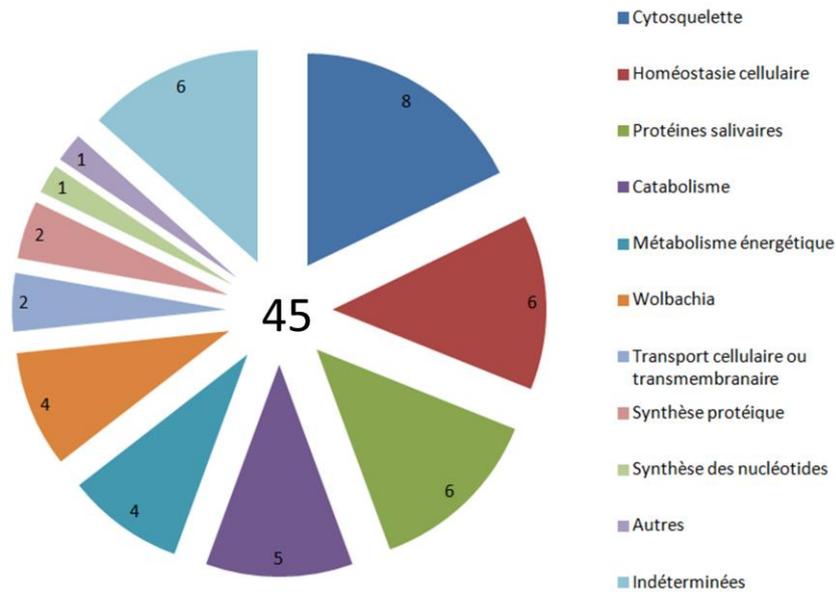


Figure 52 : Fonctions des protéines des glandes salivaires dont l'expression est augmentée en présence de DENV4. Les nombres inscrits dans les secteurs indiquent le nombre de protéines de chaque type. Le nombre inscrits au centre représente le nombre de protéines totales.

La technique « label-free » a conduit à l'identification de 17 protéines salivaires dont l'expression est modulée dans le cas d'une infection par CHIKV, 14 étant sous-exprimées, 3 surexprimées. Dans le cas de DENV4, 12 protéines ont été identifiées, la moitié étant surexprimée, l'autre moitié sous-exprimée.

3. Discussion

3.1. Les moustiques *Aedes albopictus* présents dans la région de Nice sont capables de transmettre à la fois CHIKV et DENV4

La compétence vectorielle des *Aedes albopictus* élevés au laboratoire et issus d'adultes prélevés dans la région de Nice peut être précisée d'après notre étude. Rappelons que pour prouver qu'un moustique est le vecteur d'un arbovirus, il faut : [1] Isoler le virus à partir de moustiques prélevés sur le terrain, [2] Démontrer la capacité du moustique à être infecté suite à un repas sanguin sur un hôte virémique ou sur une suspension virale, [3] Mettre en évidence des particules virales dans la salive émise par le moustique ou démontrer l'infection d'un hôte vertébré suite à une pique par un moustique infecté, [4] Fournir des preuves épidémiologiques confirmant l'association entre la présence du moustique et celle d'une population de vertébrés dans laquelle une épidémie a lieu (130). Notre étude permet de répondre aux questions [2] et [3]. Les deux arbovirus étudiés ont des cinétiques d'infection du vecteur différentes. CHIKV infecte précocement et intensément la totalité du moustique alors que la dissémination de DENV4 est plus lente. Ces observations *in vivo* peuvent être reliées aux observations *in vitro* où l'on remarque que CHIKV se développe également plus rapidement sur cellules Vero E6 et sur C6/36 que DENV4. La rapidité du cycle viral des *Alphavirus* comparé à celui des *Flavivirus* permet sans doute d'expliquer la plus grande capacité du CHIKV à disséminer dans le vecteur.

3.1.1. Compétence vectorielle pour CHIKV

Le titre par glande salivaire est supérieur à 10^8 ufp.mL⁻¹ 5 jours après infection par CHIKV. Or, le titre initial du mélange est de $2,7 \cdot 10^8$ pfu.mL⁻¹, en considérant qu'un moustique absorbe 5 µL de mélange par repas, la quantité de virus initialement absorbée a donc été multipliée par 200, en ne tenant compte que des particules virales présentes dans les glandes salivaires. Le passage du virus par le vecteur permet donc une amplification très importante du nombre de particules virales, ce qui souligne le rôle primordial du vecteur dans la transmission de cette arbovirose. D'après nos résultats, les *Aedes albopictus* de ces régions sont capables d'excréter le virus CHIK dès 7 jours après infection orale. De plus, la moitié des échantillons de salive se sont révélés positifs par titrage. Ce taux de 50% est certainement sous-évalué en raison

de la méthode de prélèvement. En effet, la technique utilisée ne permet pas toujours de récupérer de la salive car certains moustiques ne salivent pas spontanément ou aspirent le milieu contenu dans le cône, cette technique d'analyse entraîne donc de nombreux faux-négatifs. D'autres études ont révélé la présence du virus dans la salive d'*Aedes albopictus* dès deux jours post-infection chez une population isolée sur l'Ile de la Réunion (155). Nous n'avons pas prélevé de salive à un temps aussi précoce mais l'absence de particules virales infectieuses à J3 dans les glandes salivaires permet d'exclure un passage aussi précoce des particules virales dans la salive. Ces différences peuvent s'expliquer par des conditions expérimentales différentes (températures d'incubation, souches virales ou de moustiques, titre viral initial *etc.*). Des études de terrains sont maintenant nécessaires pour confirmer le statut vectoriel des moustiques de cette espèce. Il apparaît cependant que les *Aedes albopictus* présents en France semblent compétents pour transmettre de façon efficace CHIKV, ce qui souligne le risque d'émergence virale dans nos régions.

3.1.2. Compétence vectorielle pour DENV4

En revanche, la compétence vectorielle d'*Aedes albopictus* pour DENV4 n'est pas établie. Nous avons pu mettre en évidence de l'ARN viral dans les glandes salivaires et avons confirmé que le virus présent est infectieux mais nous n'avons pas détecté de salive contenant des particules infectieuses ou d'ARN viral jusqu'à 17 jours post-infection. Cependant, à partir de 20 jours post-infection, il est possible de retrouver de l'ARN viral de DENV4 dans la salive d'*Aedes albopictus*. Sur 38 échantillons, seulement 6 sont négatifs, ce qui révèle un passage possible des particules virales dans la salive. Cependant, ce passage semble très tardif ce qui permet de questionner le statut vectoriel de ce moustique vis-à-vis de cette souche virale. Plusieurs explications peuvent être apportées pour expliquer un passage aussi tardif. Tout d'abord, il est probable que les méthodes de détection possèdent une sensibilité trop faible pour permettre la mise en évidence du virus. Cela est particulièrement vrai pour le titrage par plaque de lyse car moins de 5µL de salive sont récupérés ce qui limite fortement les capacités de détection de la technique. La faible compétence vectorielle d'*Aedes albopictus* pour DENV4 pourrait également s'expliquer par le fait que la souche dont nous disposons provient d'un isolat clinique. Or, ces isolats cliniques sont connus pour infecter plus difficilement les moustiques. Une information surprenante est que les glandes salivaires sont infectées intensément dès 10

jours post-infection, avec plus de 10^8 copies d'ARN viral par organe, et que cette infection ne se traduit pas par un passage de particules virales dans la salive. Par un mécanisme à déterminer, le virus franchirait la barrière de l'intestin moyen mais pas la barrière des glandes salivaires (dans un premier temps). Ces résultats rejoignent ceux publiés par une équipe australienne sur le sérotype 2 du virus de la dengue. Cette équipe a en effet montré qu'*Aedes albopictus* ne semble pas un vecteur majeur de ce sérotype en Australie avec un taux d'infection des glandes salivaires de seulement 7% (156).

L'analyse des résultats de RT-PCRq a révélé la présence parmi les moustiques infectés par DENV4 de quatre individus présentant un nombre de copies d'ARN viral par organe supérieur à 10^7 à J3 et à J5 post-infection. Or, ces valeurs ne sont jamais retrouvées avant J10 post-infection dans la population générale. Ces moustiques, bien que peu nombreux, révèlent l'hétérogénéité des réponses des individus d'une même population face à l'infection virale. Il pourrait être intéressant de vérifier si de tels individus précocement infectés sont capables d'excréter des particules virales infectieuses dans leur salive afin de préciser leur rôle dans la transmission de ces arboviroses.

3.2. La co-infection de moustique *Aedes albopictus* par CHIKV et DENV4 potentialise l'infection du moustique par CHIKV au détriment de DENV4

La capacité d'*Aedes albopictus* à être infecté simultanément par CHIKV et DENV1 et à transmettre ces virus a été démontrée pour la première fois en 2010 (131). Cependant, aucune étude publiée à ce jour ne s'est intéressée à la cinétique d'infection du vecteur, seule sa capacité à excréter les virus dans la salive a été étudiée. De même, aucune donnée concernant une co-infection DENV4/CHIKV n'était disponible *in vivo*. Une étude publiée en 2011 concluait à une suppression de l'infection du CHIKV par le DENV3 (157). Cependant, cette étude a été effectuée uniquement *in vitro* sur lignée cellulaire d'*Aedes albopictus* C6/36. D'après les résultats obtenus dans notre étude, il apparaît que la présence de deux virus dans le vecteur potentialise CHIKV au détriment de DENV4. Cependant, il ne semble pas que le nombre de particules virales maximal de CHIKV soit augmenté en cas de co-infection. La co-infection diminue donc la période d'incubation extrinsèque de celui-ci. Cela a pour conséquence une

augmentation de la capacité vectorielle (111) d'*Aedes albopictus* vis-à-vis de CHIKV, en cas de co-infection. Il serait intéressant de vérifier si *Aedes albopictus* est capable, comme pour DENV1, d'excréter dans sa salive des particules virales infectieuses de DENV4. Cette étude ne peut se faire que par RT-PCRq en raison de la rapidité du cycle viral de CHIKV comparativement à celui de DENV et il est prévu qu'elle ait lieu au cours de prochaines expériences au laboratoire. Cette capacité du vecteur à transmettre les deux virus simultanément pose la question d'une possible co-infection de l'Homme. Ce type d'évènement a été décrit pour la première fois en 1964 (111). On retrouve relativement peu d'exemples de co-infection chez l'Homme, principalement en raison d'une sous-évaluation due aux méthodes de diagnostic. En effet, les deux virus sont rarement recherchés et les symptômes sont le plus souvent attribués au virus épidémique sans examens diagnostiques complémentaires. Cependant, une étude menée au Gabon pendant une double épidémie de dengue et de chikungunya a conclu que plus de 1% des patients présentant un syndrome fébrile aigu étaient victime d'une co-infection DENV1/CHIKV (158). Ce type d'évènement n'est donc pas exceptionnel mais les données épidémiologiques manquent pour déterminer la gravité d'une co-infection chez l'Homme. En janvier 2014, un cas de co-infection DENV4/CHIKV a été diagnostiqué chez un touriste revenant d'Angola (159). Cette co-infection n'a pas été associée à des symptômes particulièrement sévères.

3.3. Les virus CHIKV et DENV4 influencent l'expression protéique de l'intestin moyen et des glandes salivaires

3.3.1. Comparaison des résultats obtenus par la technique iTRAQ et par la technique « label-free »

L'analyse des échantillons par spectrométrie de masse a permis d'obtenir pour la première fois un protéome de glandes salivaires et d'intestin moyen chez *Aedes albopictus*. Les analyses menées jusqu'à présent utilisaient l'électrophorèse bidimensionnelle couplée à la spectroscopie de masse (160), méthode qui ne permet pas l'identification à large échelle des protéines. Les deux techniques, « label-free » et iTRAQ, ont permis d'établir ce protéome. Celui-ci présente un grand nombre de protéines, nombre probablement sous-évalué. En effet, le génome d'*Aedes albopictus* n'a pas encore été séquencé entièrement, contrairement à celui d'*Aedes aegypti*. Les séquences protéiques obtenues ont donc été comparées à la banque de

donnée rassemblant les séquences des protéines d'*Aedes aegypti* ainsi qu'aux séquences connues des protéines d'*Aedes albopictus*. Il est ainsi probable que certaines protéines spécifiques d'*Aedes albopictus* ne soient pas détectées, en particulier les protéines salivaires dont les séquences sont pour beaucoup d'entre elles très variables en fonction de l'espèce (160). Une équipe a analysé le sialome d'*Aedes albopictus* et a montré que plus de 52% des protéines présentes dans les glandes salivaires de ce moustique sont excrétées (160). Dans notre protéome, elles représentent environ 10% des protéines.

Concernant les quantifications des protéines, peu de différences d'expression ont pu être mises en évidence par iTRAQ alors que la méthode « label-free » révèle beaucoup de différences significatives. Enfin, la technique iTRAQ est plus longue et plus complexe à mettre en œuvre que la technique « label-free » et elle nécessite une concentration en protéines plus grande dans l'échantillon initial (161). Pour toutes ces raisons, elle semble moins bien adaptée que la technique « label-free » à la caractérisation du protéome de moustique.

3.3.2. Signification biologique de la modulation de la synthèse protéique

Une première observation est que l'âge a une influence sur la nature de la synthèse protéique. 27 protéines sont sous-exprimées et 22 surexprimées dans l'échantillon de glandes salivaires prélevées à J5 post-gorgement par rapport à celui prélevé à J14 post-gorgement. La synthèse protéique dans les glandes salivaires est donc un mécanisme régulé au cours du vieillissement du moustique. Cette observation a déjà été réalisée chez le moustique vecteur de *Plasmodium falciparum*, *Anopheles gambiae* (162).

La comparaison des échantillons issus de moustiques infectés et non-infectés permet de montrer une interaction entre les virus et la synthèse protéique au cours de l'infection. Le virus CHIK semble modifier l'expression de plus de protéines représentant également plus de fonctions que DENV4. Ce phénomène pourrait résulter d'une plus grande adaptation de CHIKV à *Aedes albopictus*, qui serait donc mieux à même de contrôler la synthèse protéique dans les organes du vecteur. Cette meilleure adaptation semble être confirmée par deux éléments. Les cinétiques d'infection que nous avons obtenues montrent une infection plus précoce et plus intense des glandes salivaires lorsque le moustique est infecté par CHIKV par rapport à une

infection par DENV4. De plus, il est connu qu'*Aedes albopictus* est un vecteur très efficace de la souche de CHIKV dont nous disposons alors que son rôle dans la transmission de DENV est plus marginal. A elle seule, l'identité de ces protéines ne permet pas de comprendre les mécanismes à l'œuvre pendant l'infection virale mais offre cependant des pistes intéressantes permettant de mieux appréhender les interactions entre le virus et son vecteur à l'échelle de l'organe. Ainsi, s'il est possible d'imaginer que la modulation de la synthèse d'une seule protéine peut avoir plus d'effet que la modulation de dizaines d'autres, il est néanmoins raisonnable de considérer que la modulation d'un grand nombre de protéines d'une même fonction résulte d'une importance particulière de cette fonction pour la réplication virale ou, au contraire, pour la défense de la cellule à l'infection.

Dans l'intestin moyen, les deux virus ont une action relativement similaire. La majeure partie des protéines ont une expression augmentée en présence du virus. Les principales fonctions concernées sont la synthèse protéique, le métabolisme énergétique et l'homéostasie cellulaire. Ces résultats suggèrent le détournement de la machinerie cellulaire au profit du virus, celui-ci recrutant les voies de biosynthèse des protéines afin d'amplifier sa propre réplication. Le fait que ce détournement ait lieu dans l'intestin moyen, premier organe infecté par les arbovirus, souligne l'importance de cet organe en tant que première étape nécessaire à l'infection de l'organisme du moustique. Ce détournement des voies de biosynthèse par CHIKV a déjà été mis en évidence *in vitro* par d'autres équipes (163).

Dans les glandes salivaires, les résultats sont très différents entre CHIKV et DENV4. Pour CHIKV, les observations et les conclusions sont globalement les mêmes que pour l'intestin moyen, avec une très nette stimulation des voies de biosynthèse des protéines, du métabolisme énergétique et des protéines de transports intracellulaires et transmembranaires. On peut donc penser que, là aussi, le virus CHIKV est capable de subvertir efficacement la machinerie cellulaire, comme l'atteste le nombre très élevé de copies d'ARN viral retrouvées dans ces organes. En revanche, pour DENV4, la situation est sensiblement différente. Premièrement, il y a plus de protéines qui voient leur expression diminuer que de protéines dont l'expression augmente. Ensuite, les fonctions impactées dans le cas d'une infection par DENV4 sont très différentes de celles touchées dans le cas d'une infection par CHIKV. En effet, la principale fonction inhibée par DENV4 est, de loin, la synthèse protéique, avec près des trois quarts des

protéines intervenant dans cette fonction. De plus, parmi les principales fonctions stimulées, on retrouve l'homéostasie cellulaire et le catabolisme, près du quart des protéines surexprimées appartenant à ces fonctions. On voit donc une forte diminution de la synthèse protéique associée à une stimulation du catabolisme et de l'homéostasie cellulaire. Or, ces fonctions sont souvent associées à la réponse antivirale intracellulaire, via l'activation de récepteurs cytosoliques ou membranaires comme le récepteur du gène inductible de l'acide rétinoïque (RIG-I) ou les récepteurs Toll-like (TLR) (164). Il est probable que nous observions ici le reflet de ces mécanismes cellulaires de réaction à l'infection virale mais à l'échelle de l'organe. Il est possible de relier cette observation de mise en place des défenses cellulaires contre DENV4 au niveau de l'organe au fait que les glandes salivaires sont infectées de façon moins précoce et moins intense que dans le cas de CHIKV. Ainsi, les protéomes obtenus pourraient être caractéristiques de deux types d'arbovirus. Le premier, étroitement adapté à son hôte, serait capable de détourner à son profit la machinerie cellulaire des glandes salivaires. Cela aboutirait *in fine* à une infection intense de celles-ci et à un passage précoce des particules virales dans la salive. Le second, moins bien adapté, serait capable d'infecter les glandes salivaires mais déclencherait la mise en place de défenses antivirales de la part des cellules des glandes salivaires ce qui limiterait sa réplication et retarderait le relargage de virions dans la salive du vecteur.

La bactérie *Wolbachia* est elle aussi affectée par la présence des virus dans les glandes salivaires. Dans le cas de DENV4, quatre protéines de *Wolbachia* sont retrouvées en quantité plus importante après infection. Cela suggère que l'endosymbionte profite de la présence de DENV4 pour se multiplier. On peut supposer que l'activation des défenses antivirales se fait au détriment des mécanismes de contrôles antibactériens, cela aurait donc pour effet de diminuer la pression immunitaire sur *Wolbachia* et lui permettrait de se multiplier plus facilement. Pour CHIKV, il est hasardeux de tirer une quelconque conclusion de l'analyse des protéomes car deux protéines de la bactérie ont une synthèse diminuée et une autre voit augmenter sa synthèse.

Les observations réalisées ici vont être complétées par une approche utilisant le *RNA silencing*, de façon à éteindre de façon spécifique l'expression de certaines protéines et de mesurer l'effet de cette extinction sur la réplication virale. L'objectif sera ici de mettre en évidence des protéines ayant une activité antivirale chez le moustique.

3.3.3. Conséquences de la modulation de la synthèse protéique sur la transmission d'arbovirus

Une attention particulière doit être portée aux protéines salivaires, c'est-à-dire aux protéines synthétisées dans les glandes salivaires puis excrétées dans la salive. En effet, ces protéines sont injectées chez l'hôte au moment de la pique et sont susceptibles de moduler la transmission d'un arbovirus à un hôte.

La technique iTRAQ a identifié 14 protéines salivaires dont l'expression est diminuée en cas d'infection par CHIKV et aucune dont l'expression n'est augmentée. Certaines de ces protéines salivaires sont déjà connues en raison de leur importance au cours du gorgement du vecteur sur l'hôte vertébré. Parmi celles-ci, deux protéines sont conservées chez toutes les espèces de moustiques Il s'agit des protéines de la famille D7 et l'allergène 30kDa. Cette dernière protéine a la particularité d'être présente uniquement chez les femelles, mais sa fonction est méconnue à ce jour (160).

La technique « label-free » a conduit à l'identification de 17 protéines salivaires dont l'expression est modulée dans le cas de CHIKV, 14 étant sous-exprimées, 3 surexprimées. Dans le cas de DENV4, 12 protéines ont été identifiées, la moitié étant surexprimée, l'autre moitié sous-exprimée. La plupart ont un rôle inconnu à ce jour et des plus amples travaux sont nécessaires pour le préciser. D'autres ont une activité qui est au moins partiellement connue. Les glandes salivaires infectées par DENV4 produisent plus de serpins salivaires, qui ont un rôle anticoagulant avéré (165). Nous pouvons également citer l'apyrase qui a également été identifiée par la technique iTRAQ. Elle possède une fonction d'antiagrégant plaquettaire (166). Elle est également connue pour diminuer le recrutement des cellules immunitaires (en particulier les cellules dendritiques) au site d'infection (167) et pour être impliquée dans le contrôle de la phase de sondage au cours de la pique du moustique. Une étude réalisée chez *Anopheles gambiae* a montré que le temps de sondage était directement proportionnel à la quantité d'apyrase dans la salive (135). Une diminution de la quantité d'apyrase dans les glandes salivaires entrainerait donc un temps de sondage plus important associé à un site d'inoculation plus inflammatoire. Or, le temps de sondage correspond au moment où la salive ainsi que le virus sont injectés dans l'hôte. Une augmentation du temps de sondage correspond à une inoculation d'un nombre plus élevé de particules virales, ce qui faciliterait l'infection de l'hôte. De plus, parmi les cellules

sensibles à l'infection par CHIKV, on retrouve les cellules dendritiques (168). Un recrutement plus important de celles-ci au niveau du site de pique potentialiserait donc l'infection de ce type cellulaire par CHIKV. Cette observation peut être mise en relation avec d'autres études qui illustrent l'importance du chimiotactisme exercé sur les cellules de l'immunité dans la pathogénicité d'une infection par CHIKV. Par exemple, certains inhibiteurs du chimiotactisme sont testés chez la souris et semblent diminuer les cas d'atteintes chronique (169).

Ainsi, s'il est parfois possible d'émettre des hypothèses concernant les conséquences de l'augmentation ou de la diminution dans la transmission des arbovirus, il est le plus souvent hasardeux de le faire en raison des faibles connaissances disponibles à l'heure actuelle concernant leurs effets sur l'hôte vertébré. Plusieurs approches sont disponibles afin de mieux connaître le rôle de ces protéines dans la transmission des arbovirus. L'une d'elles consisterait à produire certaines protéines candidates pour enrichir la salive de moustique avec ce type de protéine. Cette salive enrichie serait ensuite injectée à un modèle souris ce qui permettrait de mieux comprendre les conséquences d'une surexpression de cette protéine sur la transmission d'un arbovirus.

Conclusion

Notre étude a permis de préciser certaines connaissances importantes dans le cadre d'une émergence virale probable de CHIKV et DENV en Europe. En effet, nous avons montré que les moustiques de l'espèce *Aedes albopictus* présents dans la région de Nice sont capables d'être infectés par CHIKV et DENV4. Cette infection s'accompagne d'une excrétion de particules virales dans la salive. Cette excrétion est précoce dans le cas de CHIKV, plus tardive dans le cas de DENV4. La compétence de ces moustiques vis-à-vis de ces arbovirus semble donc certaine dans le cas de CHIKV mais reste à préciser dans le cas de DENV4. Notre étude souligne ainsi les risques d'émergence de ces deux virus dans nos régions.

Nous avons également montré qu'une co-infection d'un moustique *Aedes albopictus* par CHIKV et DENV4 était possible. De plus, nos résultats montrent qu'une telle co-infection a pour effet de potentialiser l'infection du moustique par CHIKV au détriment de DENV4.

Notre étude s'inscrit principalement dans une volonté de mieux caractériser les interactions entre le vecteur, l'hôte et le pathogène. Pour cela, nous avons caractérisé les interactions qui se mettent en place entre l'infection virale et la synthèse protéique dans deux organes clés d'*Aedes albopictus*. Nous avons montré que l'infection des glandes salivaires et de l'intestin moyen par CHIKV ou DENV4 provoque une modulation de la synthèse protéique dans ces organes. Il apparaît que cette modulation est sensiblement la même dans le cas de l'intestin moyen et très différente dans le cas des glandes salivaires. Dans l'intestin moyen, les deux virus entraînent une forte stimulation des capacités de synthèse des cellules, ce qui peut être interprété comme un détournement de la machinerie cellulaire au profit de la réplication virale. Une même conclusion peut être faite dans le cas de glandes salivaires infectées par CHIKV mais pas dans le cas de glandes salivaires infectées par DENV4. En effet, les protéomes obtenus dans ce dernier cas reflètent la mise en place de défenses antivirales au niveau cellulaire. Enfin, nous avons également démontré que les protéines salivaires ont une expression qui peut être modulée en cas d'infection virale.

Cette étude constitue une première étape dans la caractérisation des interactions entre le vecteur, l'hôte et le virus. L'intérêt principal de ces travaux réside dans la mise en évidence de

protéines ayant un rôle antiviral potentiel, protéines qui devront être étudiées plus spécifiquement par ailleurs. Ils mettent également en évidence plusieurs candidats salivaires susceptibles d'influencer la transmission d'un arbovirus par son vecteur ou de modifier sa pathogénicité.

Bibliographie

1. HEALTH, Institute of Medicine (US) Committee on Emerging Microbial Threats to, LEDERBERG, Joshua, SHOPE, Robert E. et STANLEY C. OAKS, Jr. COMMITTEE ON EMERGING MICROBIAL THREATS TO HEALTH. [en ligne]. 1992. [Consulté le 14 octobre 2014]. Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK234854/>
2. VIRALZONE. *Alphavirus* [en ligne]. Disponible à l'adresse : http://viralzone.expasy.org/all_by_species/625.html
3. RULLI, Nestor E., MELTON, Julian, WILMES, Anja, EWART, Gary et MAHALINGAM, Suresh. The molecular and cellular aspects of arthritis due to alphavirus infections: lesson learned from Ross River virus. *Annals of the New York Academy of Sciences*. avril 2007. Vol. 1102, pp. 96- 108. PMID: 17470914
4. SINGH, Sunit Kumar et UNNI, Salini Krishnan. Chikungunya virus: host pathogen interaction. *Reviews in Medical Virology*. mars 2011. Vol. 21, n° 2, pp. 78- 88.
5. SOURISSEAU, Marion, SCHILTE, Clémentine, CASARTELLI, Nicoletta, TROUILLET, Céline, GUIVEL-BENHASSINE, Florence, RUDNICKA, Dominika, SOL-FOULON, Nathalie, LE ROUX, Karin, PREVOST, Marie-Christine, FSIHI, Hafida et OTHERS. Characterization of reemerging chikungunya virus. *PLoS pathogens*. 2007. Vol. 3, n° 6, pp. e89.
6. SOLIGNAT, Maxime, GAY, Bernard, HIGGS, Stephen, BRIANT, Laurence et DEVAUX, Christian. Replication cycle of chikungunya: a re-emerging arbovirus. *Virology*. 25 octobre 2009. Vol. 393, n° 2, pp. 183- 197.
7. BARTON, D. J., SAWICKI, S. G. et SAWICKI, D. L. Solubilization and immunoprecipitation of alphavirus replication complexes. *Journal of Virology*. 1 mars 1991. Vol. 65, n° 3, pp. 1496- 1506. PMID: 1847467
8. SHIRAKO, Y. et STRAUSS, J. H. Regulation of Sindbis virus RNA replication: uncleaved P123 and nsP4 function in minus-strand RNA synthesis, whereas cleaved products from P123 are required for efficient plus-strand RNA synthesis. *Journal of Virology*. 1 mars 1994. Vol. 68, n° 3, pp. 1874- 1885.
9. KHAN, Afjal Hossain, MORITA, Kouichi, PARQUET, Maria del Carmen, HASEBE, Futoshi, MATHENGE, Edward G. M. et IGARASHI, Akira. Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. *Journal of General Virology*. 1 décembre 2002. Vol. 83, n° 12, pp. 3075- 3084.
10. CURTIS, I. de et SIMONS, K. Dissection of Semliki Forest virus glycoprotein delivery from the trans-Golgi network to the cell surface in permeabilized BHK cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1 novembre 1988. Vol. 85, n° 21, pp. 8052- 8056.
11. PERERA, Rushika, OWEN, Katherine E., TELLINGHUISEN, Timothy L., GORBALENYA, Alexander E. et KUHN, Richard J. Alphavirus Nucleocapsid Protein Contains a Putative Coiled Coil α -Helix Important for Core Assembly. *Journal of Virology*. 1 janvier 2001. Vol. 75, n° 1, pp. 1- 10.

12. EKSTRÖM, M., LILJESTRÖM, P. et GAROFF, H. Membrane protein lateral interactions control Semliki Forest virus budding. *The EMBO journal*. 1994. Vol. 13, n° 5, pp. 1058.
13. CAGLIOTI, Claudia, LALLE, Eleonora, CASTILLETI, Concetta, CARLETTI, Fabrizio, CAPOBIANCHI, Maria Rosaria et BORDI, Licia. Chikungunya virus infection: an overview. *New Microbiol*. 2013. Vol. 36, n° 3, pp. 211–27.
14. SCHWARTZ, Olivier et ALBERT, Matthew L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. *Nature Reviews Microbiology*. juillet 2010. Vol. 8, n° 7, pp. 491- 500.
15. ROSS, R. W. The Newala epidemic. *The Journal of Hygiene*. juin 1956. Vol. 54, n° 2, pp. 177- 191.
16. MOHAN, Alladi, KIRAN, DHN, MANOHAR, I Chiranjeevi et KUMAR, D Prabath. Epidemiology, clinical manifestations, and diagnosis of chikungunya fever : Lessons learned from the re-emerging epidemic. *Indian Journal of Dermatology*. 2010. Vol. 55, n° 1, pp. 54- 63.
17. HAMMON, W. M., RUDNICK, A. et SATHER, G. E. Viruses associated with epidemic hemorrhagic fevers of the Philippines and Thailand. *Science (New York, N.Y.)*. 15 avril 1960. Vol. 131, n° 3407, pp. 1102- 1103.
18. BURT, Felicity J., ROLPH, Micheal S., RULLI, Nestor E., MAHALINGAM, Suresh et HEISE, Mark T. Chikungunya: a re-emerging virus. *The Lancet*. 2012. Vol. 379, n° 9816, pp. 662–671.
19. RENAULT, P., BALLEYDIER, E., D'ORTENZIO, E., BÂVILLE, M. et FILLEUL, L. Epidemiology of Chikungunya infection on Reunion Island, Mayotte, and neighboring countries. *Médecine Et Maladies Infectieuses*. mars 2012. Vol. 42, n° 3, pp. 93- 101.
20. NARESH KUMAR, C. V. M. et SAI GOPAL, D. V. R. Reemergence of Chikungunya virus in Indian Subcontinent. *Indian Journal of Virology: An Official Organ of Indian Virological Society*. juin 2010. Vol. 21, n° 1, pp. 8- 17.
21. KULARATNE, Senanayake A. M., WEERASINGHE, Sajitha C., GIHAN, Champika, WICKRAMASINGHE, Sujantha, DHARMARATHNE, Samath, ABEYRATHNA, Asanka et JAYALATH, Thilak. Epidemiology, clinical manifestations, and long-term outcomes of a major outbreak of chikungunya in a hamlet in sri lanka, in 2007: a longitudinal cohort study. *Journal of Tropical Medicine*. 2012. Vol. 2012, pp. 639178.
22. ANGELINI, Paola, FINARELLI, Alba Carola, SILVI, Giuliano, BORRINI, Bianca Maria, FRASCA, Gabriella, MATTIVI, Andrea, MASSIMILIANI, Erika, PO, Claudio, ANGELINI, Raffaella, VENTURELLI, Claudio et MACINI, Pierluigi. [Chikungunya emergency in Emilia-Romagna: learning through experience]. *Epidemiologia E Prevenzione*. octobre 2008. Vol. 32, n° 4-5, pp. 258- 263.
23. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Chikungunya in the Americas* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.cdc.gov/chikungunya/geo/americas.html>
24. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *First Chikungunya case acquired in the United States reported in Florida* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.cdc.gov/media/releases/2014/p0717-chikungunya.html>

25. MORRISON, T. E. Re-emergence of chikungunya virus. *Journal of Virology* [en ligne]. 30 juillet 2014. [Consulté le 2 septembre 2014]. DOI 10.1128/JVI.01432-14. Disponible à l'adresse : <http://jvi.asm.org/cgi/doi/10.1128/JVI.01432-14>
26. WOLFE, Nathan D., KILBOURN, Annelisa M., KARESH, William B., RAHMAN, HASAN A., BOSI, Edwin J., CROPP, Bruce C., ANDAU, Mahedi, SPIELMAN, Andrew et GUBLER, Duane J. Sylvatic transmission of arboviruses among Bornean orangutans. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2001. Vol. 64, n° 5, pp. 310–316.
27. AP, Y., NAZNI, W. A., AZLEEN, ZA Noor, VYTHILINGAM, I., NOORAZIAN, M. Y., AZAHARI, A. H., ZAINAH, S., LEE, H. L. et OTHERS. The first isolation of chikungunya virus from non-human primates in Malaysia. *Journal of General and Molecular Virology*. 2009. Vol. 1, n° 3, pp. 035–039.
28. WEAVER, Scott C., OSORIO, Jorge E., LIVENGOOD, Jill A., CHEN, Rubing et STINCHCOMB, Dan T. Chikungunya virus and prospects for a vaccine. *Expert Review of Vaccines*. septembre 2012. Vol. 11, n° 9, pp. 1087- 1101.
29. THIBOUTOT, Michelle M., KANNAN, Senthil, KAWALEKAR, Omkar U., SHEDLOCK, Devon J., KHAN, Amir S., SARANGAN, Gopalsamy, SRIKANTH, Padma, WEINER, David B. et MUTHUMANI, Karupiah. Chikungunya: A Potentially Emerging Epidemic? *PLoS Negl Trop Dis*. avril 2010. Vol. 4, n° 4, pp. e623.
30. TSETSARKIN, Konstantin A., VANLANDINGHAM, Dana L., MCGEE, Charles E. et HIGGS, Stephen. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS pathogens*. décembre 2007. Vol. 3, n° 12, pp. e201.
31. LAM, S. K., CHUA, K. B., HOOI, P. S., RAHIMAH, M. A., KUMARI, S., THARMARATNAM, M., CHUAH, S. K., SMITH, D. W. et SAMPSON, I. A. Chikungunya infection--an emerging disease in Malaysia. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. septembre 2001. Vol. 32, n° 3, pp. 447- 451.
32. MAHENDRADAS, Padmamalini, AVADHANI, Kavitha et SHETTY, Rohit. Chikungunya and the eye: a review. *Journal of Ophthalmic Inflammation and Infection*. 2013. Vol. 3, n° 1, pp. 35.
33. PIALOUX, Gilles, GAÛZÈRE, Bernard-Alex, JAURÉGUIBERRY, Stéphane et STROBEL, Michel. Chikungunya, an epidemic arbovirosis. *The Lancet Infectious Diseases*. mai 2007. Vol. 7, n° 5, pp. 319- 327.
34. BRIANT, Laurence, DESPRÈS, Philippe, CHOUMET, Valérie et MISSÉ, Dorothée. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. *Virology*. septembre 2014. Vol. 464-465, pp. 26- 32.
35. MORRISON, T. E., WHITMORE, A. C., SHABMAN, R. S., LIDBURY, B. A., MAHALINGAM, S. et HEISE, M. T. Characterization of Ross River Virus Tropism and Virus-Induced Inflammation in a Mouse Model of Viral Arthritis and Myositis. *Journal of Virology*. 15 janvier 2006. Vol. 80, n° 2, pp. 737- 749.
36. PAROLA, Philippe, DE LAMBALLERIE, Xavier, JOURDAN, Jacques, ROVERY, Clarisse, VAILLANT, Véronique, MINODIER, Philippe, BROUQUI, Philippe, FLAHAULT, Antoine, RAOULT, Didier et CHARREL, Rémi N. Novel chikungunya virus variant in travelers returning from Indian Ocean islands. *Emerging Infectious Diseases*. octobre 2006. Vol. 12, n° 10, pp. 1493- 1499.

37. BRIGHTON, S. W. Chloroquine phosphate treatment of chronic Chikungunya arthritis. An open pilot study. *South African Medical Journal = Suid-Afrikaanse Tydskrif Vir Geneeskunde*. 11 août 1984. Vol. 66, n° 6, pp. 217- 218.
38. DE LAMBALLERIE, Xavier, BOISSON, Véronique, REYNIER, Jean-Charles, ENAULT, Sébastien, CHARREL, Rémi N., FLAHAULT, Antoine, ROQUES, Pierre et LE GRAND, Roger. On chikungunya acute infection and chloroquine treatment. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)*. décembre 2008. Vol. 8, n° 6, pp. 837- 839.
39. RAVICHANDRAN, Rajan et MANIAN, Manju. Ribavirin therapy for Chikungunya arthritis. *Journal of Infection in Developing Countries*. 2008. Vol. 2, n° 2, pp. 140- 142.
40. EDELMAN, R., TACKET, C. O., WASSERMAN, S. S., BODISON, S. A., PERRY, J. G. et MANGIAFICO, J. A. Phase II safety and immunogenicity study of live chikungunya virus vaccine TSI-GSD-218. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1 juin 2000. Vol. 62, n° 6, pp. 681 - 685.
41. BRANDLER, Samantha, RUFFIÉ, Claude, COMBREDÉ, Chantal, BRAULT, Jean-Baptiste, NAJBURG, Valérie, PREVOST, Marie-Christine, HABEL, André, TAUBER, Erich, DESPRÈS, Philippe et TANGY, Frédéric. A recombinant measles vaccine expressing chikungunya virus-like particles is strongly immunogenic and protects mice from lethal challenge with chikungunya virus. *Vaccine*. août 2013. Vol. 31, n° 36, pp. 3718- 3725.
42. BÄCK, Anne Tuiskunen et LUNDKVIST, Ake. Dengue viruses - an overview. *Infection Ecology & Epidemiology*. 2013. Vol. 3.
43. BHATT, Samir, GETHING, Peter W., BRADY, Oliver J., MESSINA, Jane P., FARLOW, Andrew W., MOYES, Catherine L., DRAKE, John M., BROWNSTEIN, John S., HOEN, Anne G., SANKOH, Osman, MYERS, Monica F., GEORGE, Dylan B., JAENISCH, Thomas, WINT, G.R. William, SIMMONS, Cameron P., SCOTT, Thomas W., FARRAR, Jeremy J. et HAY, Simon I. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 25 avril 2013. Vol. 496, n° 7446, pp. 504 - 507.
44. HENCHAL, E. A. et PUTNAK, J. R. The dengue viruses. *Clinical Microbiology Reviews*. octobre 1990. Vol. 3, n° 4, pp. 376- 396.
45. MUSSO, D., NILLES, E. J. et CAO-LORMEAU, V.-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection: The Official Publication of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. 7 juin 2014.
46. NORMILE, Dennis. Surprising New Dengue Virus Throws a Spanner in Disease Control Efforts. *Science*. 25 octobre 2013. Vol. 342, n° 6157, pp. 415 - 415. DOI 10.1126/science.342.6157.415.
47. VIRALZONE. *Flaviviridae* [en ligne]. Disponible à l'adresse : http://viralzone.expasy.org/all_by_species/43.html
48. KUHN, Richard J., ZHANG, Wei, ROSSMANN, Michael G., PLETNEV, Sergei V., CORVER, Jeroen, LENCHES, Edith, JONES, Christopher T., MUKHOPADHYAY, Suchetana, CHIPMAN, Paul R., STRAUSS, Ellen G., BAKER, Timothy S. et STRAUSS, James H. Structure of Dengue Virus: Implications for Flavivirus Organization, Maturation, and Fusion. *Cell*. 8 mars 2002. Vol. 108, n° 5, pp. 717- 725.

49. GEBHARD, Leopoldo G., FILOMATORI, Claudia V. et GAMARNIK, Andrea V. Functional RNA Elements in the Dengue Virus Genome. *Viruses*. 15 septembre 2011. Vol. 3, n° 9, pp. 1739- 1756.
50. CHEN, Y., MAGUIRE, T., HILEMAN, R. E., FROMM, J. R., ESKO, J. D., LINHARDT, R. J. et MARKS, R. M. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nature Medicine*. août 1997. Vol. 3, n° 8, pp. 866- 871.
51. CABRERA-HERNANDEZ, Arturo, THEPPARIT, Chutima, SUKSANPAISAN, Lukkana et SMITH, Duncan R. Dengue virus entry into liver (HepG2) cells is independent of hsp90 and hsp70. *Journal of Medical Virology*. avril 2007. Vol. 79, n° 4, pp. 386- 392.
52. TASSANEETRITHEP, Boonrat, BURGESS, Timothy H., GRANELLI-PIPERNO, Angela, TRUMPFHELLER, Christine, FINKE, Jennifer, SUN, Wellington, ELLER, Michael A., PATTANAPANYASAT, Kovit, SARASOMBATH, Suttipant, BIRX, Deborah L., STEINMAN, Ralph M., SCHLESINGER, Sarah et MAROVICH, Mary A. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*. 7 avril 2003. Vol. 197, n° 7, pp. 823- 829.
53. MILLER, Joanna L, DEWET, Barend J. M, MARTINEZ-POMARES, Luisa, RADCLIFFE, Catherine M, DWEK, Raymond A, RUDD, Pauline M et GORDON, Siamon. The Mannose Receptor Mediates Dengue Virus Infection of Macrophages. *PLoS Pathogens* [en ligne]. février 2008. Vol. 4, n° 2. [Consulté le 9 septembre 2014]. Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>
54. MEERTENS, Laurent, CARNEC, Xavier, LECOIN, Manuel Perera, RAMDASI, Rasika, GUIVEL-BENHASSINE, Florence, LEW, Erin, LEMKE, Greg, SCHWARTZ, Olivier et AMARA, Ali. The TIM and TAM Families of Phosphatidylserine Receptors Mediate Dengue Virus Entry. *Cell host & microbe*. 18 octobre 2012. Vol. 12, n° 4, pp. 544- 557.
55. VAN DER SCHAAR, Hilde M., RUST, Michael J., CHEN, Chen, VAN DER ENDE-METSELAAR, Heidi, WILSCHUT, Jan, ZHUANG, Xiaowei et SMIT, Jolanda M. Dissecting the Cell Entry Pathway of Dengue Virus by Single-Particle Tracking in Living Cells. *PLoS Pathog*. décembre 2008. Vol. 4, n° 12, pp. e1000244. DOI 10.1371/journal.ppat.1000244.
56. MODIS, Yorgo, OGATA, Steven, CLEMENTS, David et HARRISON, Stephen C. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 22 janvier 2004. Vol. 427, n° 6972, pp. 313- 319.
57. STIASNY, Karin et HEINZ, Franz X. Flavivirus membrane fusion. *The Journal of General Virology*. octobre 2006. Vol. 87, n° Pt 10, pp. 2755- 2766.
58. TERAMOTO, Tadahisa, BOONYASUPPAYAKORN, Siwaporn, HANDLEY, Misty, CHOI, Kyung H. et PADMANABHAN, Radhakrishnan. Substitution of NS5 N-terminal Domain of Dengue Virus Type 2 RNA with Type 4 Domain Caused Impaired Replication and Emergence of Adaptive Mutants with Enhanced Fitness. *The Journal of Biological Chemistry*. 8 août 2014. Vol. 289, n° 32, pp. 22385- 22400.
59. CLYDE, Karen, KYLE, Jennifer L. et HARRIS, Eva. Recent Advances in Deciphering Viral and Host Determinants of Dengue Virus Replication and Pathogenesis. *Journal of Virology*. 1 décembre 2006. Vol. 80, n° 23, pp. 11418- 11431. DOI 10.1128/JVI.01257-06.

60. CORVER, Jeroen, LENCHES, Edith, SMITH, Kayla, ROBISON, R. Aaron, SANDO, Trisha, STRAUSS, Ellen G. et STRAUSS, James H. Fine mapping of a cis-acting sequence element in yellow fever virus RNA that is required for RNA replication and cyclization. *Journal of Virology*. février 2003. Vol. 77, n° 3, pp. 2265- 2270.
61. MUKHOPADHYAY, Suchetana, KUHN, Richard J. et ROSSMANN, Michael G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nature Reviews Microbiology*. janvier 2005. Vol. 3, n° 1, pp. 13- 22.
62. GUBLER, Duane J. Dengue/dengue haemorrhagic fever: history and current status. *Novartis Foundation Symposium*. 2006. Vol. 277, pp. 3- 16; discussion 16- 22, 71- 73, 251- 253.
63. GUBLER, Duane J. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. *Clinical Microbiology Reviews*. juillet 1998. Vol. 11, n° 3, pp. 480- 496.
64. WILDER-SMITH, Annelies et GUBLER, Duane J. Geographic expansion of dengue: the impact of international travel. *The Medical Clinics of North America*. novembre 2008. Vol. 92, n° 6, pp. 1377- 1390, x.
65. GUBLER, D. J. et CLARK, G. G. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerging Infectious Diseases*. 1995. Vol. 1, n° 2, pp. 55- 57. PMID: 8903160PMCID: PMC2626838
66. SHEPARD, Donald S., COUDEVILLE, Laurent, HALASA, Yara A., ZAMBRANO, Betzana et DAYAN, Gustavo H. Economic impact of dengue illness in the Americas. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. février 2011. Vol. 84, n° 2, pp. 200- 207.
67. GUBLER, Duane J. Epidemic dengue/dengue hemorrhagic fever as a public health, social and economic problem in the 21st century. *Trends in Microbiology*. février 2002. Vol. 10, n° 2, pp. 100- 103.
68. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. *Dengue et dengue hémorragique* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/fr/> Consulté le 10/09/2014
69. TEAM, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)-Health Communication Unit-Eurosurveillance editorial. Autochthonous dengue fever in Croatia, August–September 2010. [en ligne]. 3 mars 2011. [Consulté le 10 septembre 2014]. Disponible à l'adresse : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19805>
70. TEAM, European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC)-Health Communication Unit-Eurosurveillance editorial. First two autochthonous dengue virus infections in metropolitan France, September 2010. [en ligne]. 30 septembre 2010. [Consulté le 10 septembre 2014]. Disponible à l'adresse : <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=19676>
71. MURRAY, Natasha Evelyn Anne, QUAM, Mikkel B et WILDER-SMITH, Annelies. Epidemiology of dengue: past, present and future prospects. *Clinical Epidemiology*. 20 août 2013. Vol. 5, pp. 299- 309.
72. INSTITUT DE VEILLE SANITAIRE. *Chikungunya et dengue - Données de la surveillance renforcée en France métropolitaine en 2014* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.invs.sante.fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Maladies-a-transmission-vectorielle/Chikungunya/Donnees->

epidemiologiques/France-metropolitaine/Chikungunya-et-dengue-Donnees-de-la-surveillance-renforcee-en-France-metropolitaine-en-2014

73. Dengue, un cas autochtone dans les Bouches-du-Rhône. [en ligne]. [Consulté le 19 septembre 2014]. Disponible à l'adresse : <http://www.ars.paca.sante.fr/Dengue-un-cas-autochtone-dans.175961.0.html>

74. SCHAFFNER, Francis et MATHIS, Alexander. Dengue and dengue vectors in the WHO European region: past, present, and scenarios for the future. *The Lancet. Infectious Diseases*. 26 août 2014.

75. LIN, Su-Ru, HSIEH, Szu-Chia, YUEH, Yi-Yuan, LIN, Ting-Hsiang, CHAO, Day-Yu, CHEN, Wei-June, KING, Chwan-Chuen et WANG, Wei-Kung. Study of sequence variation of dengue type 3 virus in naturally infected mosquitoes and human hosts: implications for transmission and evolution. *Journal of Virology*. novembre 2004. Vol. 78, n° 22, pp. 12717- 12721.

76. TJADEN, Nils Benjamin, THOMAS, Stephanie Margarete, FISCHER, Dominik et BEIERKUHNEIN, Carl. Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence. *PLoS neglected tropical diseases*. juin 2013. Vol. 7, n° 6, pp. e2207.

77. WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Dengue : Guideline for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.who.int/tdr/publications/documents/dengue-diagnosis.pdf>

78. DIETZ, V., GUBLER, D. J., ORTIZ, S., KUNO, G., CASTA-VÉLEZ, A., SATHER, G. E., GÓMEZ, I. et VERGNE, E. The 1986 dengue and dengue hemorrhagic fever epidemic in Puerto Rico: epidemiologic and clinical observations. *Puerto Rico Health Sciences Journal*. septembre 1996. Vol. 15, n° 3, pp. 201- 210.

79. SURASOMBATPATTANA, Pornapat, HAMEL, Rodolphe, PATRAMOOL, Sirilaksana, LUPLERTLOP, Natthanej, THOMAS, Frédéric, DESPRÈS, Philippe, BRIANT, Laurence, YSSEL, Hans et MISSÉ, Dorothée. Dengue virus replication in infected human keratinocytes leads to activation of antiviral innate immune responses. *Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases*. octobre 2011. Vol. 11, n° 7, pp. 1664- 1673.

80. KWAN, Wing-Hong, HELT, Anna-Marija, MARAÑÓN, Concepción, BARBAROUX, Jean-Baptiste, HOSMALIN, Anne, HARRIS, Eva, FRIDMAN, Wolf H. et MUELLER, Chris G. F. Dendritic cell precursors are permissive to dengue virus and human immunodeficiency virus infection. *Journal of Virology*. juin 2005. Vol. 79, n° 12, pp. 7291- 7299.

81. JOHNSTON, L. J., HALLIDAY, G. M. et KING, N. J. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. *The Journal of Investigative Dermatology*. mars 2000. Vol. 114, n° 3, pp. 560- 568.

82. JOHN, Ashley L. St, ABRAHAM, Soman N. et GUBLER, Duane J. Barriers to preclinical investigations of anti-dengue immunity and dengue pathogenesis. *Nature Reviews Microbiology*. juin 2013. Vol. 11, n° 6, pp. 420- 426.

83. JESSIE, Kala, FONG, Mun Yik, DEVI, Shamala, LAM, Sai Kit et WONG, K. Thong. Localization of dengue virus in naturally infected human tissues, by immunohistochemistry and in situ hybridization. *The Journal of Infectious Diseases*. 15 avril 2004. Vol. 189, n° 8, pp. 1411- 1418.

84. DALRYMPLE, Nadine A et MACKOW, Erich R. Virus interactions with endothelial cell receptors: implications for viral pathogenesis. *Current Opinion in Virology*. août 2014. Vol. 7, pp. 134- 140.
85. BALSITIS, Scott J., COLOMA, Josefina, CASTRO, Glenda, ALAVA, Aracely, FLORES, Diana, MCKERROW, James H., BEATTY, P. Robert et HARRIS, Eva. Tropism of dengue virus in mice and humans defined by viral nonstructural protein 3-specific immunostaining. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. mars 2009. Vol. 80, n° 3, pp. 416- 424.
86. GUZMÁN, María G., KOURI, Gustavo, BRAVO, Jose, VALDES, Luis, VAZQUEZ, Susana et HALSTEAD, Scott B. Effect of age on outcome of secondary dengue 2 infections. *International journal of infectious diseases: IJID: official publication of the International Society for Infectious Diseases*. juin 2002. Vol. 6, n° 2, pp. 118- 124.
87. HANLEY, Kathryn A. et WEAVER, Scott C. *Frontiers in Dengue Virus Research*. Horizon Scientific Press, 2010. ISBN 9781904455509.
88. FRIED, Jessica R., GIBBONS, Robert V., KALAYANAROOJ, Siripen, THOMAS, Stephen J., SRIKIATKHACHORN, Anon, YOON, In-Kyu, JARMAN, Richard G., GREEN, Sharone, ROTHMAN, Alan L. et CUMMINGS, Derek A. T. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010. Vol. 4, n° 3, pp. e617.
89. CHAKRAVARTI, Anita, CHAUHAN, Mayank Singh, KUMAR, Suman et ASHRAF, Anzar. Genotypic characterization of dengue virus strains circulating during 2007-2009 in New Delhi. *Archives of Virology*. mars 2013. Vol. 158, n° 3, pp. 571- 581.
90. LAN, Nguyen Thi Phuong et HIRAYAMA, Kenji. Host genetic susceptibility to severe dengue infection. *Tropical Medicine and Health*. décembre 2011. Vol. 39, n° 4 Suppl, pp. 73- 81.
91. GUZMAN, Maria G., ALVAREZ, Mayling et HALSTEAD, Scott B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of Virology*. 1 juillet 2013. Vol. 158, n° 7, pp. 1445- 1459.
92. MONGKOLSAPAYA, Juthathip, DEJNIRATTISAI, Wanwisa, XU, Xiao-ning, VASANAWATHANA, Sirijitt, TANGTHAWORNCHAIKUL, Nattaya, CHAIRUNSRI, Aroonrung, SAWASDIVORN, Siraporn, DUANGCHINDA, Thaneeya, DONG, Tao, ROWLAND-JONES, Sarah, YENCHITSOMANUS, Pa-thai, MCMICHAEL, Andrew, MALASIT, Prida et SCREATON, Gavin. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nature Medicine*. juillet 2003. Vol. 9, n° 7, pp. 921- 927.
93. HALSTEAD, S. B. et O'ROURKE, E. J. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *The Journal of Experimental Medicine*. 1 juillet 1977. Vol. 146, n° 1, pp. 201- 217.
94. ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTÉ. *Guide pour la prise en charge clinique de la dengue* [en ligne]. Disponible à l'adresse : http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/85736/1/9789242504712_fre.pdf
95. WILLS, Bridget A., DUNG, Nguyen M., LOAN, Ha T., TAM, Dong T.H., THUY, Tran T.N., MINH, Le T.T., DIET, Tran V., HAO, Nguyen T., CHAU, Nguyen V., STEPNIIEWSKA, Kasia, WHITE, Nicholas J. et

FARRAR, Jeremy J. Comparison of Three Fluid Solutions for Resuscitation in Dengue Shock Syndrome. *New England Journal of Medicine*. 1 septembre 2005. Vol. 353, n° 9, pp. 877- 889.

96. MALINOSKI, F. J., HASTY, S. E., USSERY, M. A. et DALRYMPLE, J. M. Prophylactic ribavirin treatment of dengue type 1 infection in rhesus monkeys. *Antiviral Research*. mars 1990. Vol. 13, n° 3, pp. 139- 149.

97. COSTIN, Joshua M., JENWITHEESUK, Ekachai, LOK, Shee-Mei, HUNSPERGER, Elizabeth, CONRADS, Kelly A., FONTAINE, Krystal A., REES, Craig R., ROSSMANN, Michael G., ISERN, Sharon, SAMUDRALA, Ram et MICHAEL, Scott F. Structural Optimization and De Novo Design of Dengue Virus Entry Inhibitory Peptides. *PLoS Negl Trop Dis*. juin 2010. Vol. 4, n° 6, pp. e721.

98. DA COSTA, Vivaldo G., MARQUES-SILVA, Ariany C., FLORIANO, Vitor G. et MORELI, Marcos L. Safety, immunogenicity and efficacy of a recombinant tetravalent dengue vaccine: A meta-analysis of randomized trials. *Vaccine*. 3 septembre 2014. Vol. 32, n° 39, pp. 4885- 4892.

99. CAPEDING, Maria Rosario, TRAN, Ngoc Huu, HADINEGORO, Sri Rezeki S., ISMAIL, Hussain Imam Hj Muhammad, CHOTPITAYASUNONNDH, Tawee, CHUA, Mary Noreen, LUONG, Chan Quang, RUSMIL, Kusnandi, WIRAWAN, Dewa Nyoman, NALLUSAMY, Revathy, PITISUTTITHUM, Punnee, THISYAKORN, Usa, YOON, In-Kyu, VAN DER VLIET, Diane, LANGEVIN, Edith, LAOT, Thelma, HUTAGALUNG, Yanee, FRAGO, Carina, BOAZ, Mark, WARTEL, T. Anh, TORNIEPORTH, Nadia G., SAVILLE, Melanie, BOUCKENOOGHE, Alain et THE CYD14 STUDY GROUP. Clinical efficacy and safety of a novel tetravalent dengue vaccine in healthy children in Asia: a phase 3, randomised, observer-masked, placebo-controlled trial. *Lancet*. 10 juillet 2014.

100. *Catalogue of Life* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.catalogueoflife.org/col/details/species/id/8629864> Consulté le 21/08/2014

101. ERITJA R. *Global Invasive Species Database* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.issg.org/database/species/ecology.asp?fr=1&si=109> Consulté le 21/08/2014

102. Museum de Zoologie. *Animal Diversity Web* [en ligne]. Disponible à l'adresse : http://animaldiversity.ummz.umich.edu/accounts/Aedes_albopictus/

103. RAMEL, Alain. La respiration aquatique des insectes. [en ligne]. [Consulté le 22 août 2014]. Disponible à l'adresse : <http://www7.inra.fr/opie-insectes/pdf/i146ramel.pdf>

104. WA, Hawley. The biology of *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association. Supplement*. décembre 1988. Vol. 1, pp. 1- 39.

105. NIEBYLSKI, M. L. et CRAIG, G. B. Dispersal and survival of *Aedes albopictus* at a scrap tire yard in Missouri. *Journal of the American Mosquito Control Association*. septembre 1994. Vol. 10, n° 3, pp. 339- 343.

106. DELATTE, Hélène, GIMONNEAU, Geoffrey, TRIBOIRE, A. et FONTENILLE, Didier. Influence of temperature on immature development, survival, longevity, fecundity, and gonotrophic cycles of *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue in the Indian Ocean. *Journal of medical entomology*. 2009. Vol. 46, n° 1, pp. 33-41.

107. PAUPY, C., DELATTE, H., BAGNY, L., CORBEL, V. et FONTENILLE, D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection*. décembre 2009. Vol. 11, n° 14-15, pp. 1177- 1185.
108. KUNO, Goro. Revisiting Houston and Memphis: the background histories behind the discovery of the infestation by *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) in the United States and their significance in the contemporary research. *Journal of Medical Entomology*. novembre 2012. Vol. 49, n° 6, pp. 1163- 1176.
109. Center for Disease Control and Prevention. *CHIKUNGUNYA Information for vector control programs* [en ligne]. Disponible à l'adresse : http://www.cdc.gov/chikungunya/pdfs/CHIKV_VectorControl.pdf
110. MEDLOCK, Jolyon M., HANSFORD, Kayleigh M., SCHAFFNER, Francis, VERSTEIRT, Veerle, HENDRICKX, Guy, ZELLER, Herve et BORTEL, Wim Van. A Review of the Invasive Mosquitoes in Europe: Ecology, Public Health Risks, and Control Options. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*. juin 2012. Vol. 12, n° 6, pp. 435- 447.
111. BONIZZONI, Mariangela, GASPERI, Giuliano, CHEN, Xioaguang et JAMES, Anthony A. The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends in Parasitology*. septembre 2013. Vol. 29, n° 9, pp. 460- 468.
112. European Center for Disease Prevention and Control. Disponible à l'adresse : <http://www.ecdc.europa.eu/en/healthtopics/vectors/mosquitoes/Pages/aedes-albopictus.aspx#C2>
113. VAZEILLE, Marie, JEANNIN, Charles, MARTIN, Estelle, SCHAFFNER, Francis et FAILLOUX, Anna-Bella. Chikungunya: a risk for Mediterranean countries? *Acta Tropica*. février 2008. Vol. 105, n° 2, pp. 200- 202.
114. MINISTÈRE DES AFFAIRES SOCIALES ET DE LA SANTÉ. *Dispositif de lutte contre la dissémination du moustique « Aedes albopictus » en France métropolitaine : Début de la surveillance estivale depuis le 1er mai, mesures mises en œuvre et dispositif de communication* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://www.sante.gouv.fr/dispositif-de-lutte-contre-la-dissemination-du-moustique-aedes-albopictus-en-france-metropolitaine-debut-de-la-surveillance-estivale-depuis-le-1er-mai-mesures-mises-en-oeuvre-et-dispositif-de-communication.html#nb1>
115. LE MONDE, BARROUX R. Redouté, l' insecte « tigre » est arrivé aux portes de Paris. [en ligne]. Disponible à l'adresse : http://www.lemonde.fr/cgi-bin/ACHATS/acheter.cgi?offre=ARCHIVES&type_item=ART_ARCH_30J&objet_id=1200469&xtmc=tigre&xocr=1
116. WALDOCK, Joanna, CHANDRA, Nastassya L., LELIEVELD, Jos, PROESTOS, Yiannis, MICHAEL, Edwin, CHRISTOPHIDES, George et PARHAM, Paul E. The role of environmental variables on *Aedes albopictus* biology and chikungunya epidemiology. *Pathogens and Global Health*. juillet 2013. Vol. 107, n° 5, pp. 224- 241.
117. BENEDICT, MARK Q., LEVINE, REBECCA S., HAWLEY, WILLIAM A. et LOUNIBOS, L. PHILIP. Spread of the Tiger: Global Risk of Invasion by the Mosquito *Aedes albopictus*. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)*. 2007. Vol. 7, n° 1, pp. 76- 85.

118. FRANZISKA NIEMITZ. *An invasion of insects? The potential future dispersal of the Asian tiger mosquito Aedes albopictus in Bavaria* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <https://www.elitenetzwerk.bayern.de/elite-network-home/forschungsarbeiten/naturwissenschaften/2009/niemitz-tigermosquito/?L=2>
119. VACUS G. *Expansion géographique d'Aedes albopictus : Quel risque de maladies émergentes en France métropolitaine* [en ligne]. Disponible à l'adresse : http://www.inma.fr/files/file/diplome/dip_mem/dip_mem_2012_26_vacus.pdf
120. DUTTO, M. et BERTERO, M. Local intense and systemic reactions to Aedes albopictus (Diptera, Culicidae) bites: a clinical case report. *Bulletin De La Société De Pathologie Exotique* (1990). décembre 2010. Vol. 103, n° 5, pp. 309- 312.
121. ROZEN-GAGNON, Kathryn, STAPLEFORD, Kenneth A., MONGELLI, Vanesa, BLANC, Hervé, FAILLOUX, Anna-Bella, SALEH, Maria-Carla et VIGNUZZI, Marco. Alphavirus mutator variants present host-specific defects and attenuation in mammalian and insect models. *PLoS pathogens*. janvier 2014. Vol. 10, n° 1, pp. e1003877.
122. LE COUPANEC, Alain, BABIN, Divya, FIETTE, Laurence, JOUVION, Gregory, AVE, Patrick, MISSE, Dorothee, BOULOY, Michele et CHOUMET, Valerie. Aedes Mosquito Saliva Modulates Rift Valley Fever Virus Pathogenicity. *PLoS Neglected Tropical Diseases* [en ligne]. 13 juin 2013. Vol. 7, n° 6. [Consulté le 27 août 2014]. Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/>
123. SCHNEIDER, Bradley S., SOONG, Lynn, ZEIDNER, Nordin S. et HIGGS, Stephen. Aedes aegypti salivary gland extracts modulate anti-viral and TH1/TH2 cytokine responses to sindbis virus infection. *Viral Immunology*. 2004. Vol. 17, n° 4, pp. 565- 573.
124. CHISENHALL, Daniel M., CHRISTOFFERSON, Rebecca C., MCCracken, Michael K., JOHNSON, Ann-Marie F., LONDONO-RENTERIA, Berlin et MORES, Christopher N. Infection with dengue-2 virus alters proteins in naturally expectorated saliva of Aedes aegypti mosquitoes. *Parasites & Vectors*. 2014. Vol. 7, n° 1, pp. 252.
125. DICTIONNAIRE MÉDICAL DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE – VERSION 2014. *Compétence vectorielle* [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://dictionnaire.academie-medecine.fr/?q=comp%C3%A9tence%20vectorielle>
126. MITCHELL, C. J., MILLER, B. R. et GUBLER, D. J. Vector competence of Aedes albopictus from Houston, Texas, for dengue serotypes 1 to 4, yellow fever and Ross River viruses. *Journal of the American Mosquito Control Association*. septembre 1987. Vol. 3, n° 3, pp. 460- 465. PMID: 2849638
127. BENTE, Dennis A., FORRESTER, Naomi L., WATTS, Douglas M., MCAULEY, Alexander J., WHITEHOUSE, Chris A. et BRAY, Mike. Crimean-Congo hemorrhagic fever: history, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Research*. octobre 2013. Vol. 100, n° 1, pp. 159- 189.
128. ROZENDAAL, Jan Arie et ORGANIZATION, World Health. La Lutte antivectorielle : méthodes à usage individuel et communautaire. [en ligne]. 1999. [Consulté le 27 août 2014]. Disponible à l'adresse : <http://apps.who.int/iris/handle/10665/42211> Arabic edition published by the WHO Regional Office for the Eastern Mediterranean in 2004

129. KHOO, Cynthia CH, PIPER, Joseph, SANCHEZ-VARGAS, Irma, OLSON, Ken E. et FRANZ, Alexander WE. The RNA interference pathway affects midgut infection-and escape barriers for Sindbis virus in *Aedes aegypti*. *BMC microbiology*. 2010. Vol. 10, n° 1, pp. 130.
130. MITCHELL, C. J. The role of *Aedes albopictus* as an arbovirus vector. *Parassitologia*. décembre 1995. Vol. 37, n° 2-3, pp. 109- 113.
131. VAZEILLE, Marie, MOUSSON, Laurence, MARTIN, Estelle et FAILLOUX, Anna-Bella. Orally co-Infected *Aedes albopictus* from La Reunion Island, Indian Ocean, can deliver both dengue and chikungunya infectious viral particles in their saliva. *PLoS neglected tropical diseases*. 2010. Vol. 4, n° 6, pp. e706.
132. NAYAR, J. K. et KNIGHT, J. W. *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae): an experimental and natural host of *Dirofilaria immitis* (Filarioidea: Onchocercidae) in Florida, U.S.A. *Journal of Medical Entomology*. juillet 1999. Vol. 36, n° 4, pp. 441 - 448.
133. CANCRINI, G., PIETROBELLI, M., FRANGIPANE DI REGALBONO, A. F., TAMPIERI, M. P. et DELLA TORRE, A. Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes in *Aedes albopictus*. *Parassitologia*. décembre 1995. Vol. 37, n° 2-3, pp. 141 - 145.
134. RIBEIRO, Jose M.C., MANS, Ben J. et ARCA, Bruno. An insight into the sialome of blood feeding Nematocera. *Insect biochemistry and molecular biology*. novembre 2010. Vol. 40, n° 11, pp. 767 - 784.
135. BOISSON, Bertrand, JACQUES, Jean Claude, CHOUMET, Valérie, MARTIN, Estelle, XU, Jiannong, VERNICK, Ken et BOURGOUIN, Catherine. Gene silencing in mosquito salivary glands by RNAi. *FEBS letters*. 3 avril 2006. Vol. 580, n° 8, pp. 1988- 1992.
136. ZEIDNER, N. S., HIGGS, S., HAPP, C. M., BEATY, B. J. et MILLER, B. R. Mosquito feeding modulates Th1 and Th2 cytokines in flavivirus susceptible mice: an effect mimicked by injection of sialokinins, but not demonstrated in flavivirus resistant mice. *Parasite Immunology*. janvier 1999. Vol. 21, n° 1, pp. 35- 44.
137. EGLEZOS, A., ANDREWS, P. V., BOYD, R. L. et HELME, R. D. Modulation of the immune response by tachykinins. *Immunology and Cell Biology*. août 1991. Vol. 69 (Pt 4), pp. 285- 294.
138. STYER, Linda M., LIM, Pei-Yin, LOUIE, Karen L., ALBRIGHT, Rebecca G., KRAMER, Laura D. et BERNARD, Kristen A. Mosquito saliva causes enhancement of West Nile virus infection in mice. *Journal of Virology*. février 2011. Vol. 85, n° 4, pp. 1517- 1527.
139. SCHNEIDER, Bradley S., SOONG, Lynn, COFFEY, Lark L., STEVENSON, Heather L., MCGEE, Charles E. et HIGGS, Stephen. *Aedes aegypti* Saliva Alters Leukocyte Recruitment and Cytokine Signaling by Antigen-Presenting Cells during West Nile Virus Infection. *PLoS ONE* [en ligne]. 22 juillet 2010. Vol. 5, n° 7. [Consulté le 29 août 2014]. Disponible à l'adresse : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2908538/>
140. CHISENHALL, Daniel M., LONDONO, Berlin L., CHRISTOFFERSON, Rebecca C., MCCracken, Michael K. et MORES, Christopher N. Effect of dengue-2 virus infection on protein expression in the salivary glands of *Aedes aegypti* mosquitoes. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. mars 2014. Vol. 90, n° 3, pp. 431- 437.

141. DELATTE, H., PAUPY, C., DEHECQ, J. S., THIRIA, J., FAILLOUX, A. B. et FONTENILLE, D. [*Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control]. *Parasite (Paris, France)*. mars 2008. Vol. 15, n° 1, pp. 3- 13.
142. PINHEIRO, Valéria Cristina Soares et TADEI, Wanderli Pedro. Evaluation of the residual effect of temephos on *Aedes aegypti* (Diptera, Culicidae) larvae in artificial containers in Manaus, Amazonas State, Brazil. *Cadernos de Saúde Pública*. 2002. Vol. 18, n° 6, pp. 1529–1535.
143. CHARLES, J. F. et DE BARJAC, H. [Action of crystals of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* on the midgut of *Aedes aegypti* L. larvae, studied by electron microscopy]. *Annales De Microbiologie*. avril 1983. Vol. 134A, n° 2, pp. 197- 218.
144. HAMDAN, Hidayati, SOFIAN-AZIRUN, Mohd, NAZNI, Wasi Ahmad et LEE, Han Lim. Insecticide resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) larvae against malathion, permethrin and temephos. *Tropical Biomedicine*. juin 2005. Vol. 22, n° 1, pp. 45- 52.
145. SAWABE, Kyoko, ISAWA, Haruhiko, HOSHINO, Keita, SASAKI, Toshinori, ROYCHOUDHURY, Sudipta, HIGA, Yukiko, KASAI, Shinji, TSUDA, Yoshio, NISHIUMI, Isao, HISAI, Nobuo, HAMAO, Shoji et KOBAYASHI, Mutsuo. Host-feeding habits of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) collected at the urban and suburban residential areas of Japan. *Journal of Medical Entomology*. mai 2010. Vol. 47, n° 3, pp. 442- 450.
146. OLIVA, Clelia F., DAMIENS, David, VREYSEN, Marc J. B., LEMPERIÈRE, Guy et GILLES, Jérémie. Reproductive strategies of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) and implications for the sterile insect technique. *PLoS One*. 2013. Vol. 8, n° 11, pp. e78884.
147. LE MONDE, Audrey Garric. Le Brésil va lâcher des millions de moustiques OGM contre la dengue. [en ligne]. Disponible à l'adresse : <http://ecologie.blog.lemonde.fr/2014/04/18/le-bresil-va-lacher-des-millions-de-moustiques-ogm-contre-la-dengue/>
148. CARVALHO, Danilo O., NIMMO, Deric, NAISH, Neil, MCKEMEY, Andrew R., GRAY, Pam, WILKE, André B. B., MARRELLI, Mauro T., VIRGINIO, Jair F., ALPHEY, Luke et CAPURRO, Margareth L. Mass production of genetically modified *Aedes aegypti* for field releases in Brazil. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*. 2014. N° 83, pp. e3579.
149. LE MONDE, Laurence Monnot. *La technique de l'insecte stérile va être testée pour lutter contre le paludisme et le chikungunya* [en ligne]. Disponible à l'adresse : http://www.lemonde.fr/planete/article/2008/12/27/la-technique-de-l-insecte-sterile-va-etre-testee-pour-lutter-contre-le-paludisme-et-le-chikungunya_1135695_3244.html
150. WIWATANARATANABUTR, Itsanun, ALLAN, Sandra, LINTHICUM, Kenneth et KITTAYAPONG, Pattamaporn. Strain-specific differences in mating, oviposition, and host-seeking behavior between *Wolbachia*-infected and uninfected *Aedes albopictus*. *Journal of the American Mosquito Control Association*. septembre 2010. Vol. 26, n° 3, pp. 265- 273. PMID: 21033053
151. BIAN, Guowu, XU, Yao, LU, Peng, XIE, Yan et XI, Zhiyong. The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. SCHNEIDER, David S. (éd.), *PLoS Pathogens*. 1 avril 2010. Vol. 6, n° 4, pp. e1000833. DOI 10.1371/journal.ppat.1000833.

152. MOUSSON, Laurence, ZOUACHE, Karima, ARIAS-GOETA, Camilo, RAQUIN, Vincent, MAVINGUI, Patrick et FAILLOUX, Anna-Bella. The native Wolbachia symbionts limit transmission of dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS neglected tropical diseases*. 2012. Vol. 6, n° 12, pp. e1989.
153. SLATKO, Barton E., LUCK, Ashley N., DOBSON, Stephen L. et FOSTER, Jeremy M. Wolbachia endosymbionts and human disease control. *Molecular and Biochemical Parasitology*. juillet 2014. Vol. 195, n° 2, pp. 88- 95.
154. LAMBRECHTS, Louis, SCOTT, Thomas W. et GUBLER, Duane J. Consequences of the Expanding Global Distribution of *Aedes albopictus* for Dengue Virus Transmission. HALSTEAD, Scott B. (éd.), *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 25 mai 2010. Vol. 4, n° 5, pp. e646. DOI 10.1371/journal.pntd.0000646.
155. VAZEILLE, Marie, MOUTAILLER, Sara, COUDRIER, Daniel, ROUSSEAU, Claudine, KHUN, Huot, HUERRE, Michel, THIRIA, Julien, DEHECQ, Jean-Sébastien, FONTENILLE, Didier, SCHUFFENECKER, Isabelle, DESPRES, Philippe et FAILLOUX, Anna-Bella. Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, *Aedes albopictus*. *PLoS ONE*. 14 novembre 2007. Vol. 2, n° 11, pp. e1168.
156. MOORE, PETER R., JOHNSON, PETRINA H., SMITH, GREG A., RITCHIE, SCOTT A. et VAN DEN HURK, ANDREW F. 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*. décembre 2007. Vol. 23, n° 4, pp. 383- 388.
157. POTIWAT, Rutcharin, KOMALAMISRA, Narumon, THAVARA, Usavadee, TAWATSIN, Apiwat et SIRIYASATIEN, Padet. Competitive suppression between chikungunya and dengue virus in *Aedes albopictus* c6/36 cell line. *The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health*. novembre 2011. Vol. 42, n° 6, pp. 1388- 1394.
158. CARON, Mélanie, PAUPY, Christophe, GRARD, Gilda, BECQUART, Pierre, MOMBO, Illich, NSO, Branly Bikie Bi, KASSA KASSA, Fabrice, NKOGE, Dieudonné et LEROY, Eric Maurice. Recent introduction and rapid dissemination of Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in Gabon, central Africa. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. septembre 2012. Vol. 55, n° 6, pp. e45- 53.
159. PARREIRA, R., CENTENO-LIMA, S., LOPES, A., PORTUGAL-CALISTO, D., CONSTANTINO, A. et NINA, J. Dengue virus serotype 4 and chikungunya virus coinfection in a traveller returning from Luanda, Angola, January 2014. *Euro Surveillance: Bulletin Européen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin*. 2014. Vol. 19, n° 10.
160. ARCÀ, Bruno, LOMBARDO, Fabrizio, FRANCISCHETTI, Ivo M. B., PHAM, Van My, MESTRES-SIMON, Montserrat, ANDERSEN, John F. et RIBEIRO, José M. C. An insight into the sialome of the adult female mosquito *Aedes albopictus*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*. février 2007. Vol. 37, n° 2, pp. 107- 127.
161. ZHU, Wenhong, SMITH, Jeffrey W. et HUANG, Chun-Ming. Mass Spectrometry-Based Label-Free Quantitative Proteomics. *BioMed Research International*. 10 novembre 2009. Vol. 2010, pp. e840518.
162. ZOCEVIC, Aleksandar, CARMILEROY, Annick, SAUTEREAU, Jean, D'ALAYER, Jacques, LENORMAND, P., ROUSSELLE, J.-C., NAMANE, A. et CHOUMET, Valérie. New markers in *Anopheles*

gambiae salivary glands after Plasmodium berghei infection. *Vector Borne and Zoonotic Diseases* (Larchmont, N.Y.). février 2013. Vol. 13, n° 2, pp. 119- 127.

163. MONTGOMERY, Stephanie A., BERGLUND, Peter, BEARD, Clayton W. et JOHNSTON, Robert E. Ribosomal protein S6 associates with alphavirus nonstructural protein 2 and mediates expression from alphavirus messages. *Journal of Virology*. août 2006. Vol. 80, n° 15, pp. 7729- 7739.

164. SZABO, Attila et RAJNAVOLGYI, Eva. Collaboration of Toll-like and RIG-I-like receptors in human dendritic cells: tRIGgering antiviral innate immune responses. *American Journal of Clinical and Experimental Immunology*. 2013. Vol. 2, n° 3, pp. 195- 207.

165. STARK, K. R. et JAMES, A. A. A factor Xa-directed anticoagulant from the salivary glands of the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. *Experimental Parasitology*. novembre 1995. Vol. 81, n° 3, pp. 321- 331.

166. CHAMPAGNE, D. E., SMARTT, C. T., RIBEIRO, J. M. et JAMES, A. A. The salivary gland-specific apyrase of the mosquito *Aedes aegypti* is a member of the 5'-nucleotidase family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 31 janvier 1995. Vol. 92, n° 3, pp. 694- 698.

167. LI, Ping, CAO, Jie, CHEN, Yifei, WANG, Wei et YANG, Jiong. Apyrase protects against allergic airway inflammation by decreasing the chemotactic migration of dendritic cells in mice. *International Journal of Molecular Medicine*. juillet 2014. Vol. 34, n° 1, pp. 269- 275.

168. LONG, Kristin M., WHITMORE, Alan C., FERRIS, Martin T., SEMPOWSKI, Gregory D., MCGEE, Charles, TROLLINGER, Bianca, GUNN, Bronwyn et HEISE, Mark T. Dendritic Cell Immunoreceptor Regulates Chikungunya Virus Pathogenesis in Mice. *Journal of Virology*. 15 mai 2013. Vol. 87, n° 10, pp. 5697- 5706.

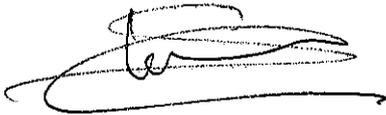
169. RULLI, Nestor E., ROLPH, Michael S., SRIKIATKHACHORN, Anon, ANANTAPREECHA, Surapee, GUGLIELMOTTI, Angelo et MAHALINGAM, Suresh. Protection From Arthritis and Myositis in a Mouse Model of Acute Chikungunya Virus Disease by Bindarit, an Inhibitor of Monocyte Chemotactic Protein-1 Synthesis. *Journal of Infectious Diseases*. 1 octobre 2011. Vol. 204, n° 7, pp. 1026- 1030.

AGREMENT SCIENTIFIQUE

En vue de l'obtention du permis d'imprimer de la thèse de doctorat vétérinaire

Je soussigné, **Stéphane BERTAGNOLI**, Enseignant-chercheur, de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse, directeur de thèse, certifie avoir examiné la thèse de **LEGROS Vincent** intitulée « *Etude de l'interaction entre Aedes albopictus et les arbovirus de la dengue et du chikungunya Approche dynamique et protéomique* » et que cette dernière peut être imprimée en vue de sa soutenance.

Fait à Toulouse, le 6 octobre 2014
Professeur Stéphane BERTAGNOLI
Enseignant chercheur
de l'Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse



Vu :
Le Directeur de l'Ecole Nationale
Vétérinaire de Toulouse
Professeur Alain MILON



Vu :
Le Président du jury :
Professeur Christophe PASQUIER



Vu et autorisation de l'impression :
Le Président de l'Université
Paul Sabatier
Professeur Bertrand MONTHUBERT
Par délégation la Vice-Présidente du CEVU
Madame Régine ANDRÉ OBRECHT



M. Vincent LEGROS
a été admis(e) sur concours en : 2009
a obtenu son diplôme d'études fondamentales vétérinaires le : 25/06/2013
a validé son année d'approfondissement le : 18/09/2014
n'a plus aucun stage, ni enseignement optionnel à valider

Etude dynamique et protéomique de l'interaction entre *Aedes albopictus* et les virus émergents de la dengue et du chikungunya.

Résumé :

Cette étude se donnait pour objectif de mieux comprendre les interactions entre le moustique *Aedes albopictus* et les deux principaux arbovirus qu'il transmet : le virus du chikungunya (CHIKV) et de la dengue (DENV). Ainsi, nous avons réalisé des infections expérimentales d'*Aedes albopictus* par CHIKV et DENV. Après différents temps d'incubation, les glandes salivaires et l'intestin moyen ont été prélevés. Par RT-PCR quantitative, nous avons déterminé les cinétiques d'infection du vecteur pour CHIKV et DENV4. Nous avons ensuite réalisé une analyse protéomique des glandes salivaires et des intestins moyens en présence et en absence des virus. La comparaison des protéomes obtenus pour les organes infectés avec ceux des organes non-infectés révèle une modulation de la synthèse protéique en présence des virus. Cette approche innovante a permis l'identification de nouvelles cibles qu'il sera possible d'explorer dans le but d'inhiber la transmission du virus au cours de la pique.

Mots clés : Arbovirus, interactions vecteur-pathogène, protéomique, moustique, salive.

Dynamic and proteomic study of the interaction between *Aedes albopictus* and two emerging viruses : dengue and chikungunya.

Abstract :

Our study focused on the interaction between *Aedes albopictus* and two of the main arbovirus transmitted by this mosquito: chikungunya virus (CHIKV) and dengue virus (DENV). For this purpose, we performed experimental infections of adults *Aedes albopictus* by DENV and CHIKV in our laboratory. Then, salivary glands and midguts were removed; the viral loads in those organs were analyzed by RT-qPCR. Thus, we were allowed to determine the dissemination of the arbovirus in the vector's organism during the first two weeks of the infection. The second step was to perform a proteomic analysis of these organs in the presence and absence of the virus. We found that infected proteomes organs are significantly different from those of uninfected organs which suggests a modulation of proteins synthesis during the infection of mosquito's organs with the arbovirus. This innovating approach allowed the identification of new proteins that we can target in order to inhibit virus transmission during the bite.

Keywords : Arbovirus, vector-pathogen interactions, proteomic, mosquito, saliva