

Université de Genève

Monographie de Bachelor en Biologie

**Les relations entre les
moustiques du genre *Aedes* et
les bactéries symbiotiques
*Wolbachia***

Par Amanda Buratti

[Année 2019-2020]

DIRECTEUR DU TRAVAIL

Mauro Tonolla

Département de botanique et biologie végétale

Unité de Microbiologie

Table des matières

1) Résumé.....	3
2) Introduction.....	4
3) Phylogénie et distribution de <i>Wolbachia</i>	5
4) La réplication de <i>Wolbachia</i> et l'incompatibilité cytoplasmique	6
I. La réplication de <i>Wolbachia</i>	6
II. La découverte de l'incompatibilité cytoplasmique	7
III. Le principe de l'incompatibilité cytoplasmique (IC)	7
IV. Les effets cellulaires de l'incompatibilité cytoplasmique.....	8
V. Discussion autour du modèle « modification-sauvetage »	9
5) Transmission de <i>Wolbachia</i> : interaction entre le symbiote et le cytosquelette de l'hôte	11
6) Protection de l'hôte contre les arbovirus.....	11
I. La réplication virale limitée par le symbiote <i>Wolbachia</i>	11
II. Les moustiques modifiés vs les moustiques naturels : différences de protection virale.....	12
III. Interaction entre le virus et la bactérie.....	12
7) <i>Wolbachia</i> : moyen de lutte contre les moustiques vecteurs de maladies	13
I. Les stratégies de remplacement et de suppression de moustiques	13
II. Le choix de la souche pour un contrôle efficace	14
III. Sur le terrain : le passage du laboratoire à la nature	14
IV. Perspectives d'avenir et challenges	15
8) Conclusion	16
9) Références.....	17

1) Résumé

Le symbiote *Wolbachia*, interagissant avec une vaste gamme d'hôtes, est la promesse d'une alternative aux stratégies de lutte contre les moustiques. Porteurs de nombreuses maladies, comme la Dengue ou le Zika, ils sont le signe d'un risque de transmission de maladies. Pour contrer ces dernières, en supprimer les vecteurs a toujours été le but des différentes stratégies employées jusqu'à aujourd'hui. Utiliser cette bactérie comme agent de suppression est réalisable grâce à son phénomène d'incompatibilité cytoplasmique, où la mort des embryons est observée lors de croisement entre femelles non infectées et mâles infectés. Mais, cette bactérie a également permis l'apparition de nouvelles stratégies, visant à remplacer une population de moustiques par une autre portant la bactérie. Le principe de ces stratégies consiste à exploiter la capacité d'inhibition virale de *Wolbachia* pour lutter directement contre les maladies au lieu de les éliminer indirectement en supprimant les moustiques. Pour l'utiliser comme moyen de contrôle, mieux comprendre la bactérie et les relations qu'elle établit avec son hôte, plus particulièrement avec les moustiques, semble nécessaire. Pour cela, différents points ont été abordés dans ce travail. Pour commencer, la phylogénie de la bactérie a été présentée avant de survoler les différents hôtes qu'elles infectent et le type de relation entretenue avec ces derniers. Puis, le principe d'incompatibilité cytoplasmique, sur lequel reposent les stratégies de remplacement et de suppression, a été expliqué en détail. Les effets cytologiques dus à l'IC ont été mentionnés et les pistes concernant le fonctionnement de son mécanisme ont été discutées, en parlant principalement de la découverte des deux gènes induisant ce phénomène. La transmission de la bactérie, lui permettant de se disperser dans une population, a également été abordée en mentionnant ses interactions avec le cytosquelette de l'hôte. Après quoi, sa capacité d'inhibition virale a été mise en avant en montrant l'effet de la présence de *Wolbachia* sur les virus et en reportant les différentes hypothèses émises concernant son interaction avec ces derniers pour les bloquer. Finalement, son usage comme moyen de contrôle impliquant des stratégies de remplacement et de suppression, le bon choix de la souche et la réalisation de ces stratégies en Australie, en Italie et en Chine, a été discuté.

2) Introduction

De nouvelles espèces invasives, comme *Aedes albopictus* et *Aedes aegypti*, émergent en Europe et en Amérique, se répandent au niveau mondial en raison de la globalisation et de ses nombreux échanges (1). Les transports de bateaux portant de vieux pneus usés seraient la première raison de leur importation (2). Originaire d'Asie de l'Est, *Aedes albopictus* se distingue des autres moustiques par son thorax marqué de rayures blanches. Sa présence, dans des régions non indigènes comme l'Amérique du Nord et l'Europe, est relevée pour la première fois en 1979 en Albanie et en 1985 au Texas (2). Le trafic routier lui aurait permis d'agrandir sa répartition en Europe, comme en Allemagne et au Tessin où il a pu s'établir en suivant l'autoroute (3). Concernant *Aedes aegypti*, originaire semblerait-il d'Afrique du Nord, il serait arrivé en Amérique par bateaux, notamment d'esclaves, et ce serait installé dans des zones tropicales et humides (2). Puis, l'accumulation de différents facteurs, dont l'urbanisation et les eaux stagnantes, aurait contribué à sa dispersion en Amérique (4). Ces deux espèces ont pu s'établir en trouvant un climat propice à la survie de leurs œufs pendant l'hiver ainsi qu'un habitat analogue à celui de leur lieu d'origine, retrouvé facilement dans des zones urbaines où de nombreux récipients porteurs d'eau stagnantes, comme des pots de fleurs, fournissent un habitat adéquat à la ponte de leurs œufs (3,4).

Le problème de l'expansion géographique de ces moustiques se porte principalement sur leur capacité, en tant que vecteur, à transmettre des arbovirus à un second hôte, comme l'homme. Effectivement, les moustiques du genre *Aedes* sont les vecteurs majoritaires de maladies humaines comme la Dengue et la Chikungunya (1). La dengue, faisant partie des maladies ré-émergentes avec le plus haut taux de mortalité (4), touche approximativement 390 millions de personnes par an dont 96 millions porteurs de symptômes (5). Même si le vaccin DengVaxia est trouvé dans le commerce, son efficacité et son utilisation sont limitées et dangereuses pour les personnes n'ayant jamais rencontrées ce virus (6).

Ainsi, du fait de la propagation du moustique dans le monde, des maladies dont il est vecteur et du réchauffement climatique pouvant accentuer sa distribution mondiale, des solutions pour limiter son invasion et la transmission de ces maladies sont de plus en plus étudiées. En s'inspirant du Brésil qui s'annonçait débarrassé de l'espèce dans les années 40 (7), un programme d'élimination, visant à mettre un terme au risque de transmission de la fièvre jaune par *Aedes aegypti*, avait été mis en place en Amérique dans les années 50 (4). Cependant, en 1970, l'espèce, accompagnée du virus de la Dengue, se rétablissait dans la majorité des pays et le programme se voit abandonné en 1990 (7). Pour s'en débarrasser, l'usage des pesticides au Brésil et dans le reste du monde est très pratiqué, ce qui cause l'émergence de résistances des moustiques (6). Trouver des alternatives pour continuer la lutte devient donc nécessaire.

Une potentielle solution, sur laquelle les chercheurs se penchent, concerne le symbiote *Wolbachia pipientis*. Cette alphaprotéobactérie, entretenant des relations symbiotiques avec de nombreux insectes dont les moustiques, peut être utilisée pour générer des mâles stériles par incompatibilité cytoplasmique, afin de réduire une population (8) et ainsi espérer lutter contre la transmission de ces maladies. Comprendre la dispersion de *Wolbachia*, ses interactions avec l'hôte pour sa reproduction et sa transmission, ainsi qu'étudier son interaction avec les virus lui permettant d'apporter une résistance antivirale à l'hôte, sont tous des éléments nécessaires à étudier pour une meilleure exploitation de la bactérie en tant que moyen de contrôle biologique.

3) Phylogénie et distribution de *Wolbachia*

La découverte de *Wolbachia pipientis* remonte en 1924 où Hertig et Wolbach ont relevé, pour la première fois, la présence de microorganismes ressemblant aux Rickettsies dans les cellules germinales de *Culex Pipiens* (9). Cette alphaprotéobactérie, faisant partie de l'ordre des Rickettsiales, se trouve dans la famille des Anaplasmataceae constituée des genres *Anaplasma*, *Wolbachia*, *Neorickettsia* et *Ehrlichia* (Figure 1A) (10). Même si la bactérie a premièrement été découverte chez *Culex pipiens*, sa présence ne se limite pas à cette unique espèce de moustique. En effet, elle est retrouvée chez les nématodes et dans plus de 65 % d'espèces d'insectes (10). Selon les ordres considérés, son abondance est variable. Par exemple, elle est plus fréquente dans l'ordre des diptères (11) dont *Aedes albopictus* fait partie. Elle montre également une grande diversité comme illustrée par les nombreux variants présents dans un même individu ainsi que les milliers de souches trouvées (12), comme WA1bB, présente chez *Aedes albopictus* dont le génome a été entièrement séquencé en 2012 (13).

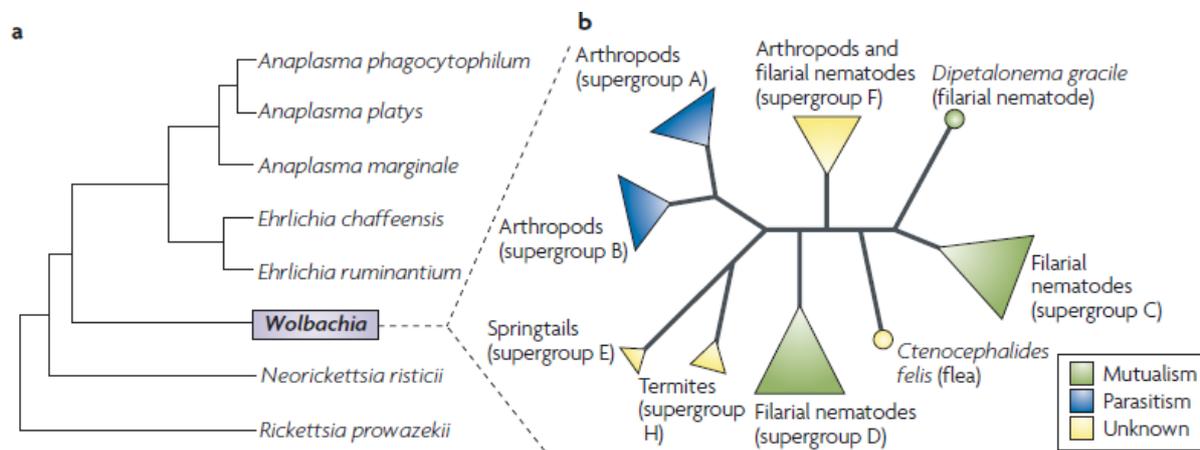


Figure 1. A) Arbre phylogénétique de *Wolbachia*. B) Arbre non raciné représentant les supergroupes A-H de *Wolbachia*. Les couleurs indiquent le type de relations qu'entretient le supergroupe avec son hôte. L'ordre de grandeur de la diversité dans chaque supergroupe est représenté par la taille des triangles (10).

De plus, *Wolbachia* est reparti en supergroupes dont les A et B sont les plus répandus chez les arthropodes (Figure 1B) (10). Selon le supergroupe considéré, la gamme d'hôtes infectés ainsi que les relations symbiotiques qu'entretient la bactérie avec son hôte diffèrent. Les bactéries des supergroupes C et D établissent des relations mutualistes avec les nématodes filaires alors que celles des A et B disposent de relations parasitiques avec leurs hôtes. Quant au supergroupe F, infectant les nématodes et les arthropodes, les 2 types de relations se retrouvent selon un article plus récent (14).

Cependant, les différents supergroupes sont actuellement sujets à modifications. Il a été montré, par une analyse phylogénétique ultérieure, que les anciens supergroupes G et R faisaient en réalité partis des supergroupes B et A, respectivement (15). En plus des supergroupes A-H, les chercheurs d'un article datant de 2020 en proposent un nouveau, S, pour classer les deux souches wApol et wCscs qu'ils ont trouvées chez des pseudoscorpions (Figure 2) (15). Dans ce même article, ils indiquent que le compte actuel de supergroupes s'élève à 17, reflétant ainsi à nouveau la diversité de la bactérie et sa vaste dispersion.

B. 40,488 amino-acid matrix (167 orthogroups)

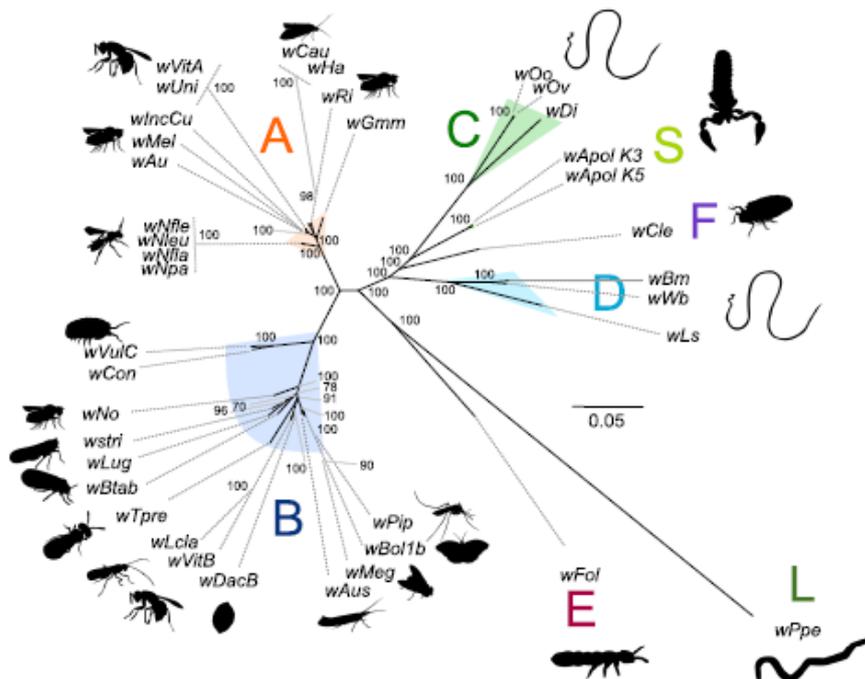


Figure 2. Arbre non raciné représentant les supergroupes A-S de *Wolbachia* (le supergroupe H, présent chez les termites, n'est pas représenté sur ce schéma)

Analyse basée sur 38 génomes complets de *Wolbachia*, 167 orthologue et 40'488 acides aminés. Pour chaque supergroupe, le nom des souches de la bactérie se trouve à côté du dessin de l'hôte. A chaque nœud, les valeurs du Bootstrap supérieures à 70 sont indiquées (15).

Il convient également de noter qu'un supergroupe correspond à un lignage monophylétique de *Wolbachia* (15) et qu'il peut être constitué de différentes souches. Un débat prend place en 2016, entre deux groupes de chercheurs, au sujet de la nomenclature à utiliser pour désigner *Wolbachia* (16). Le premier groupe Ramírez-Puebla et al. (17) suggère d'attribuer des noms d'espèces aux différents lignages alors que le second groupe Lindsey et al. (18) répond et s'oppose à cette désignation qu'il trouve confuse et conseille de maintenir la nomination actuelle des supergroupes et des souches. Lors de la 10^{ème} conférence internationale de *Wolbachia* en 2018, la formation du nouveau groupe Chung et al., en charge de proposer une nouvelle nomenclature de la bactérie, est annoncée (16).

4) La réplication de *Wolbachia* et l'incompatibilité cytoplasmique

I. La réplication de *Wolbachia*

En partant du principe que les symbiotes doivent maintenir un niveau bas de réplication pour ne pas surproliférer et risquer de causer des pathologies, les chercheurs d'une étude s'interrogent sur la relation qu'entretient la bactérie avec le moustique *Aedes albopictus* (19). Selon leur hypothèse, si sa réplication est synchronisée avec celle du moustique, un ralentissement de sa prolifération devrait être observé lors de la diapause, c'est-à-dire quand le moustique ne se réplique plus, sinon, en absence d'une telle synchronisation, un plus grand nombre de bactérie est attendu. Une diminution de sa densité est obtenue

lors de la diapause par rapport à l'embryogénèse, indiquant que la bactérie arrête de se répliquer quand l'hôte ne le fait plus. Une relation de dépendance vis-à-vis de son hôte est alors suggérée (19).

Ceci n'est qu'un exemple parmi les différentes relations que *Wolbachia* établit avec son hôte afin de pouvoir proliférer et être transmise aux générations suivantes. En effet, décrite comme un parasite reproductif, elle dispose de quatre mécanismes pour contrôler la reproduction de ses hôtes : la parthénogénèse, la féminisation et la mort des mâles ainsi que l'incompatibilité cytoplasmique qui semble être la seule stratégie de contrôle retrouvée chez les diptères (10).

II. La découverte de l'incompatibilité cytoplasmique

La découverte de l'incompatibilité cytoplasmique débute avec Laven, en 1951, qui observe des croisements incompatibles entre différentes souches de *Culex* (20). Des constatations similaires sont faites par Ghelelovitch, en 1952, qui remarque que certains croisements sont fertiles alors que leur croisement réciproque est stérile (21). Dans ces derniers, il observe que les larves commencent la plupart du temps leur développement mais n'éclosent pas de l'œuf. Il suggère que cette stérilité serait due à un « déterminisme cytoplasmique », plutôt qu'à un facteur chromosomique (21). Laven, à ce sujet, montre par une série de croisements que cette incompatibilité résulterait d'un facteur cytoplasmique hérité et transmis à la descendance (22). Mais, ce n'est qu'en 1971 que Yen et Barr, relevant la présence de *Wolbachia* dans les œufs de croisements compatibles et incompatibles, hypothétisent une relation de causalité entre la bactérie et cette incompatibilité (23). Dans une autre de leur étude (24), ils mettent en évidence l'agent responsable de l'incompatibilité cytoplasmique en traitant les larves avec de la tétracycline qui élimine les bactéries. Par le biais de cette étude, ils montrent que les croisements avec les mâles traités avec ce réactif, donc sans *Wolbachia*, donnent une progéniture viable tant avec les femelles traitées qu'avec celles infectées par les bactéries. En revanche, concernant les femelles traitées, seuls les croisements avec les mâles traités sont compatibles. En effet, si elles sont croisées avec les mâles infectés, la progéniture est non-viable en raison de l'incompatibilité cytoplasmique.

III. Le principe de l'incompatibilité cytoplasmique (IC)

Wolbachia est connue pour sa capacité à contrôler la reproduction de son hôte via un phénomène d'incompatibilité cytoplasmique (IC), lui permettant de proliférer au sein d'une population. L'IC se décline sous différentes formes dont l'IC uni et bidirectionnelle. Une femelle infectée par *Wolbachia*, en l'occurrence la souche A, donne une progéniture viable lorsqu'elle se reproduit avec un mâle non infecté ou bien infecté par cette même souche (Figure 4) (8). Mais, si une femelle non infectée se reproduit avec un mâle porteur de la bactérie, la mort des embryons est observée. La non-viabilité de ce croisement s'explique par le phénomène d'IC unidirectionnelle durant lequel une modification du sperme des mâles se produirait, empêchant ainsi une fertilisation efficace des œufs non infectés des femelles (25). Cette modification est restaurée en cas d'un croisement avec une femelle infectée par une même souche de *Wolbachia* où une progéniture viable est alors obtenue (26). Il faut également noter que la bactérie est transmise verticalement, c'est-à-dire qu'elle est transmise de la mère à sa progéniture, via les cellules ovariennes de son hôte (14). Ainsi, toute la descendance d'une femelle infectée portera la bactérie. L'IC n'est donc pas désavantageuse pour *Wolbachia* étant donné que les mâles infectés ne permettent pas sa dispersion (27).

Un point important, également relevé par la figure 4, est que les femelles infectées sont sélectivement avantagées par rapport aux femelles non infectées car elles peuvent se reproduire tant avec les mâles infectés qu'avec ceux non infectés (26). Une expérience, élaborée en laboratoire, conforte cette

observation en montrant que des femelles infectées auraient un avantage de fécondité par rapport à celles traitées avec des antibiotiques éliminant les bactéries (25). De plus, une dispersion rapide de la bactérie rencontrant une population non infectée de moustiques est possible grâce à l'IC (25,26). En effet, les femelles infectées pourront se reproduire avec tous les mâles de cette population non infectée. Comme la bactérie est héritée maternellement, leur descendance sera infectée et la bactérie sera ainsi dispersée dans la population. Toutefois, en raison d'une potentielle transmission maternelle imparfaite, la population ne pourra pas être entièrement porteuse de la bactérie (28).

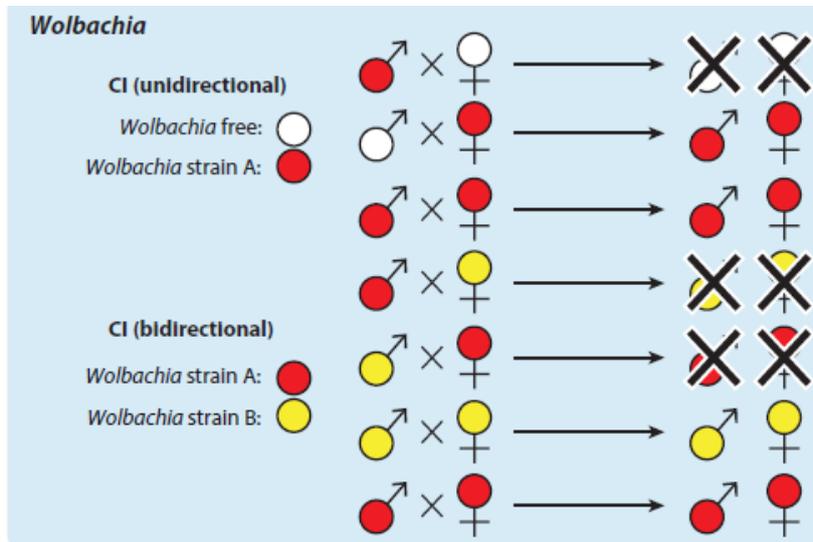


Figure 3. Représentation schématique des croisements de moustiques infectés ou non par *Wolbachia*. Différents croisements possibles entre moustiques mâles et femelles dont ceux menant à l'incompatibilité cytoplasmique uni et bidirectionnelle (8).

Concernant l'IC bidirectionnelle, elle se produit lorsqu'un croisement s'effectue entre 2 moustiques hébergeant des souches différentes de *Wolbachia*, comme les souches A et B (Figure 4). La progéniture issue de ce type de croisements montre soit un phénotype d'IC partielle avec une plus petite descendance soit une IC complète présentant une progéniture non-viable (25).

Dans les individus d'*Aedes albopictus* dit « super-infectés », la cohabitation des deux souches de *Wolbachia* wALbA et wALbB est possible (25). Lorsque des mâles super-infectés rencontrent des femelles non infectées ou infectées par une seule souche de *Wolbachia*, la progéniture est non-viable alors que le croisement réciproque est compatible (25).

IV. Les effets cellulaires de l'incompatibilité cytoplasmique

Après avoir vu que l'IC permet à la bactérie de manipuler la reproduction de son hôte, il serait maintenant intéressant de se pencher sur l'interaction qu'elle établit avec lui pour aboutir à ce contrôle. Yen et Barr avaient déjà relevé le fait que, dans les croisements incompatibles, les femelles étaient inséminées par le sperme du mâle, indiquant que *Wolbachia* devait interagir d'une certaine manière avec l'hôte soit pour empêcher le développement des œufs, soit pour bloquer l'entrée du sperme (24). Même si le mécanisme sous-jacent à l'IC demeure inconnu, des aspects cytologiques similaires associés à ce phénomène ont été observés chez différents hôtes (10). En effet, il a été mis en évidence dans des croisements incompatibles, que lors de la 1^{ère} mitose après fertilisation, le chromosome paternel n'était pas correctement condensé, ce qui aboutit à un défaut de ségrégation ainsi qu'à la formation d'un pont chromosomique (26). En raison de ce défaut de condensation, le chromosome paternel est souvent perdu (28), menant à un développement haploïde qui se trouve être létal chez les moustiques (10). Des résultats

similaires ont été observés chez la drosophile mais également chez des moustiques comme *Culex pipiens* ou *Aedes polynesiensis*, laissant penser que la bactérie pourrait interagir avec l'hôte via des cibles conservées (28). Selon des études faites chez la drosophile, le défaut de condensation serait dû à un retard du cycle cellulaire (26). Effectivement, la rupture de l'enveloppe nucléaire a été observée avec un délai de 31-120 secondes entre le mâle et femelle, relevant ainsi une désynchronisation chez les embryons touchés par le phénomène d'IC qui ne se retrouve pas chez les embryons viables (28). Un retard dans l'activation de la CDK1 a également été montré (26). Pour expliquer cette dérégulation du cycle cellulaire, deux mécanismes ont été proposés (28). Dans l'un, la bactérie produirait des toxines pour inhiber directement des composants du cycle cellulaire, dans l'autre, ces toxines cibleraient des molécules checkpoints afin de retarder indirectement l'entrée en mitose (28).

V. Discussion autour du modèle « modification-sauvetage »

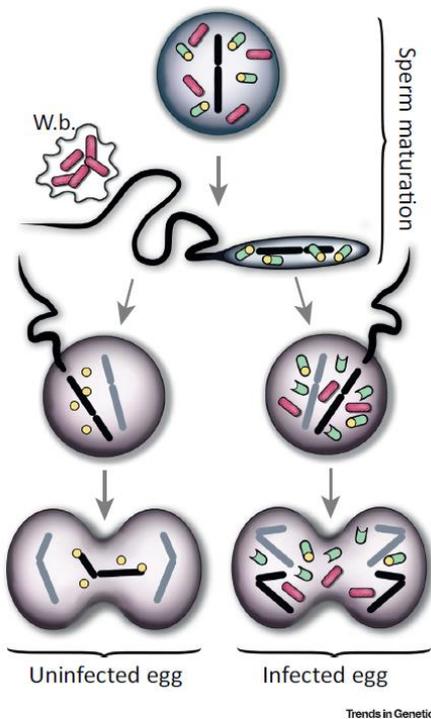


Figure 4. Représentation schématique du modèle toxine-antidote : en vert l'antidote, en jaune la toxine, en rouge la bactérie. Après maturation du sperme, ce dernier fertilise soit l'œuf infecté par la bactérie soit l'œuf non infecté (27).

et est retrouvé dans presque toutes les souches de la bactérie (32). Effectivement, il semblerait qu'il ne soit pas présent chez les hôtes montrant une relation mutualiste obligatoire avec la bactérie (32). Ce dernier point est important à souligner, étant donné que les bactéries qui portent ce prophage détiennent les gènes qui sont supposés induire l'IC.

Afin de tester l'effet de ces deux gènes, des *D. melanogaster* transgéniques ont été créées par Lepage et al. (30). Dans le construit où le mâle ne portait qu'un seul des deux gènes (*cifA* et *cifB*), la descendance, issue du croisement entre ces mâles transgéniques et les femelles non infectées par la bactérie, était viable. En revanche, un bas taux de larves écloses était obtenu lorsque ces mêmes femelles étaient

Il est important de noter qu'une synchronisation du cycle cellulaire peut être retrouvée quand le sperme infecté fertilise un œuf infecté (28). Ce phénomène de sauvetage fait partie du modèle de modification-sauvetage (29) ou toxine-antidote (27), proposé dans la littérature. Selon ce dernier, le sperme est modifié par la bactérie et l'œuf infecté permettrait de contrer l'IC (29).

Une explication du modèle, illustrée par la figure 5, est donnée par le groupe de Beckmann et al. (27). La bactérie, absente du sperme mature (26), produirait la toxine et l'antidote dans le sperme en développement (27). En partant du principe que l'antidote a une demi-vie plus courte que la toxine, cette dernière pourrait affecter la chromatine paternelle et causer les différents défauts cytologiques présentés plus haut (27). A partir de là, deux situations sont possibles. Dans la première, le sperme fertilise un œuf non infecté par la bactérie, aboutissant à l'IC à cause de la toxine active. Dans la seconde, le sperme fertilise un œuf infecté qui contient l'antidote et empêche l'IC.

En 2017, une avancée considérable dans la compréhension de l'IC a lieu lors de la découverte d'un opéron constitué de deux gènes s'avérant être responsables de l'IC (30,31). Ces derniers, *cifA/cidA* et *cifB/cidB*, sont localisés dans le module d'association eucaryotique du prophage WO (30). Le phage WO intègre son génome dans celui de *Wolbachia* en l'infectant

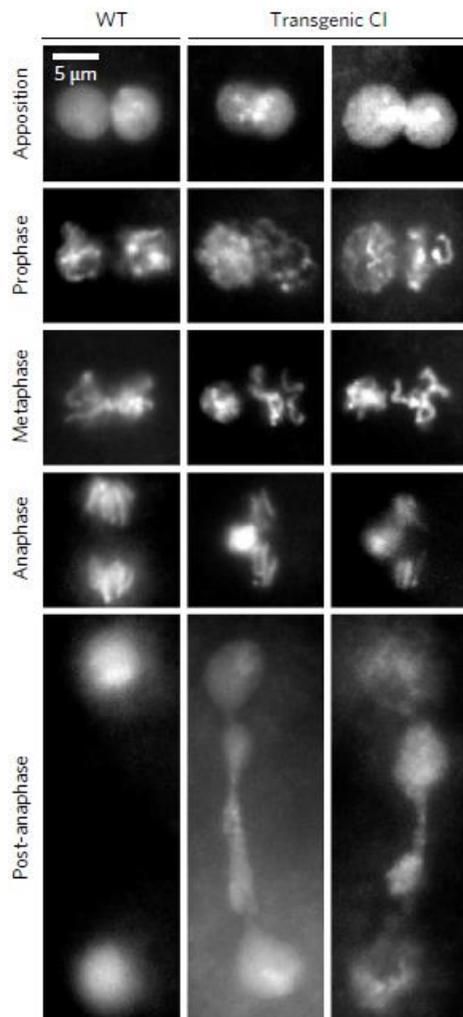


Figure 5. Visualisation de la 1^{ère} mitose d'embryons fixés : comparaison des étapes de la mitose d'embryons WT avec celles d'embryons résultant du croisement entre des femelles WT et des mouches transgéniques portant les 2 gènes (31).

croisées avec des mâles transgéniques portant les deux gènes. En effet, il était comparable à celui du croisement d'IC entre les femelles non infectées et les mâles WT infectés par la bactérie (30). Il semblerait donc que les deux gènes soient nécessaires pour induire l'IC (30). Tout comme ces scientifiques, le groupe de Beckmann et al. (31), ayant découvert simultanément ces gènes qu'ils nomment *cidA* et *cidB*, créent des *D. melanogaster* transgéniques avec ces derniers. Ils ont pu montrer, pour la première fois, que leurs gènes candidats induisaient les mêmes aspects cytologiques que ceux décrits dans les croisements d'IC induits par *Wolbachia* (31). En effet, comme mentionné plus haut, les défauts de condensation de la chromatine paternelle, de ségrégation et le pont chromosomique en anaphase, sont retrouvés (Figure 6) (31), confortant ainsi fortement leur découverte des gènes responsables du phénomène d'IC.

De plus, le groupe de Lepage a pu observer le phénomène de sauvetage lorsque ces mouches transgéniques étaient croisées avec des femelles infectées par la souche wMel (30). Cependant, même si le groupe de Beckmann a pu montrer avec *S. cerevisiae* que la présence de l'antidote *cidA* suffisait à sauver le phénotype d'inhibition de croissance induit par la toxine dans cette dernière, les résultats de l'utilisation de *cidA* seule n'étaient pas concluants dans les mouches transgéniques (31). En effet, malgré la présence des deux gènes dans des femelles transgéniques, l'IC n'était pas contrée (31). Mais, il s'est avéré qu'une expression suffisante de l'antidote durant l'ovogénèse permettait de lever le phénotype d'IC, résolvant ainsi le problème posé par ces résultats (27). Concernant *cifB*, un dernier point reste toutefois débattu afin de savoir si elle doit interagir ou non avec *cifA* pour induire l'IC (27). A ce sujet, un autre modèle d'action 2 en 1 est proposé où les deux facteurs seraient

nécessaires pour induire l'IC et où seule *cifA* permettrait de la lever (33).

5) Transmission de *Wolbachia* : interaction entre le symbiote et le cytosquelette de l'hôte

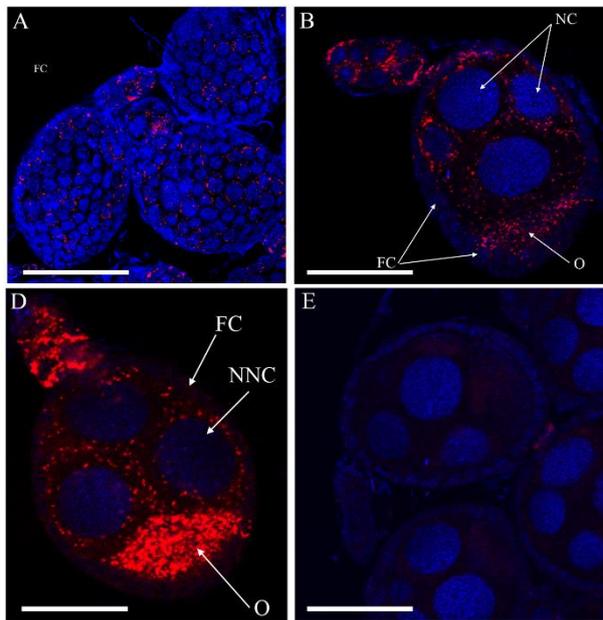


Figure 6. Mise en évidence de *Wolbachia* dans les chambres ovariennes d'*Aedes albopictus* par microscopie confocale. En rouge, la bactérie *Wolbachia* marquée par des sondes spécifiques au gène *rrs* et en bleu, les noyaux d'*Aedes albopictus* colorés au DAPI. A) *Wolbachia* dans les cellules folliculaires. B et C) la bactérie dans les cellules germinales, O=ovocyte, NC= cellule nourricière et NNC = noyau de la NC D) Chambre ovarienne sans la sonde détectant la bactérie (33).

Après avoir vu que l'IC et la transmission verticale permettent la dispersion de la bactérie, il convient d'indiquer qu'une transmission horizontale se faisant entre différents hôtes, même si plus rare, est possible (14). Comme déjà mentionné, la bactérie est transmise de la mère à sa progéniture, ce qui implique qu'elle doit se trouver dans les cellules germinales de la femelle. En effet, sa présence, dans le cytoplasme des cellules folliculaires, des cellules nourricières et dans celui des ovocytes d'*Aedes albopictus* (Figure 7), suggère fortement que sa transmission se fait durant l'ovogenèse (33). Comme une position similaire de *Wolbachia* est retrouvée chez de nombreuses espèces de moustiques ainsi que chez la drosophile, le fait qu'elle soit située au niveau postérieure de ces cellules germinales serait signe d'une stratégie de transmission efficace (26). Pour assurer l'efficacité de la transmission, une forte association entre la bactérie et les cellules de l'hôte est nécessaire (11). En effet, il semblerait que *Wolbachia* interagisse avec certains composants cellulaires du moustique pour être transmise. La bactérie emprunterait la

voie des microtubules, comme le suppose des études faites chez la drosophile, pour entrer et se déplacer dans l'ovocyte (26). Elle établirait également une interaction avec des protéines moteurs, comme les dynéines et les kinésines, pour se déplacer et faciliter sa transmission dans les cellules germinales (10).

6) Protection de l'hôte contre les arbovirus

I. La réplication virale limitée par le symbiote *Wolbachia*

Jusqu'alors définie comme un parasite chez les arthropodes, cette description de *Wolbachia* est remise en question après avoir découvert qu'elle entretenait une relation bénéfique avec *Drosophila melanogaster* (34). En effet, la souche wMel, naturellement présente chez cette dernière, lui permet d'inhiber des virus spécifiques à la drosophile mais également des virus plus généraux comme la dengue ou la fièvre jaune (34). La capacité de la bactérie à conférer cette résistance aux virus ne se limite pas à la drosophile. En effet, une étude sur *Aedes aegypti* (35), comparant des moustiques infectés ou non par la souche wMelPop-CLA en contact du virus de la Dengue, du Plasmodium et du Chikungunya, montre que les moustiques hébergeant la bactérie ne possèdent pas ou très peu de copies virales par rapport à ceux sans la bactérie. La localisation des arbovirus et de *Wolbachia* dans les tissus est illustrée par la figure 8 de cette même étude qui met également en évidence l'absence de leur cohabitation dans les

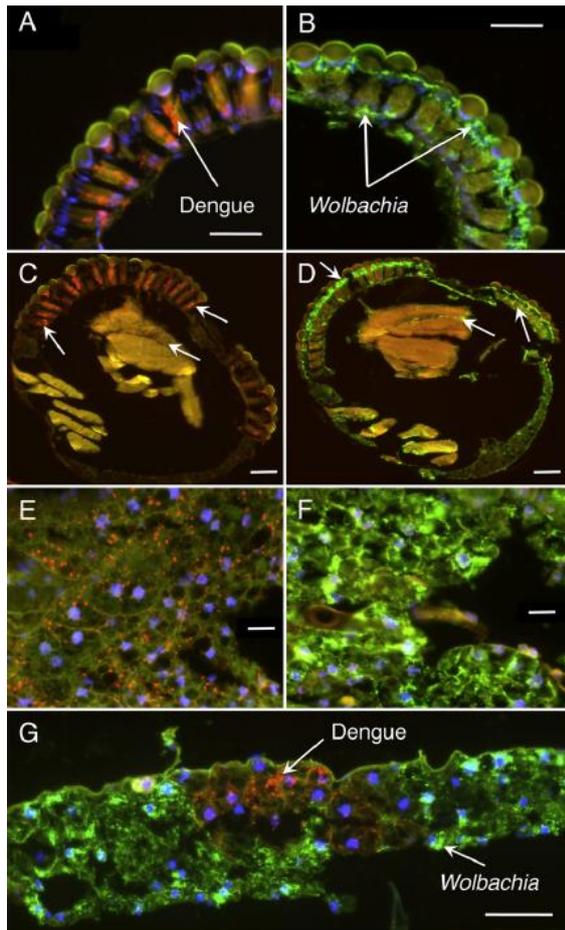


Figure 7. Mise en évidence de la présence de *Wolbachia* et du virus de la Dengue par immunofluorescence : A, C et E : moustique non infecté par *Wolbachia* avec le virus de la Dengue dans les ommatidies (A et C) et dans les tissus adipeux (E). B, D et F : moustique infecté par *Wolbachia* dans le cerveau et les ommatidies (B et D) et dans les tissus adipeux (F). G : absence de cohabitation entre le virus de la Dengue et *Wolbachia* (35).

souche mais, l'observation suivante, contredit cette idée. En effet, alors qu'*Aedes albopictus*, portant wAlbB, ne montre pas de phénotype d'inhibition virale, ce dernier est retrouvé chez *Aedes aegypti* où la même souche a été transférée (34). Une même souche serait donc capable de conférer ou non ce trait selon l'hôte en question. En fait, il semblerait que l'inhibition virale ne dépende ni de la souche ni de l'hôte, mais de la nouvelle association entre le symbiote et l'hôte (40). Quant aux moustiques infectés naturellement par *Wolbachia*, il semblerait qu'un tel phénotype ne soit pas retrouvé (40). Cependant, il faut prendre en considération le fait que cette hypothèse se base sur le peu d'études disponibles à ce sujet (40).

III. Interaction entre le virus et la bactérie

Même si le mécanisme permettant de bloquer le pathogène n'est pas encore connu (34), différentes hypothèses et éléments ont été mis en avant à ce sujet. Pour commencer, il semblerait que l'environnement de l'hôte ne soit plus propice à l'infection virale, étant donné que la bactérie entraîne sur l'hôte différentes modifications (34). En effet, il a été montré que la bactérie puisait les ressources en cholestérol et en acides aminés de l'hôte, suggérant ainsi une compétition avec le virus pour ces

cellules du moustique, suggérant ainsi que la présence de la bactérie empêcherait, ou du moins limiterait, la présence virale (35). Toutefois, comme remarqué lors d'une étude sur le virus du West Nile (36), l'étape de la réplication virale n'est pas inhibée et est au contraire augmentée. Ce sont les étapes plus tardives, comme l'assemblage de la particule virale et la sortie du virus, qui seraient ciblées par l'inhibition (36). Ainsi, selon le virus en question, des différences concernant la phase inhibée sont observées.

II. Les moustiques modifiés vs les moustiques naturels : différences de protection virale

Il est important de noter qu'*Aedes aegypti* n'est pas naturellement infecté par *Wolbachia* (37). Il n'est donc pas anodin de se demander si des résultats comparables peuvent s'observer chez d'autres espèces où la bactérie est retrouvée de manière native comme *Aedes albopictus*. Chez ce dernier, une réduction de la réplication virale du virus de la Dengue a été montrée, tant par des études faites au niveau de l'organisme entier (38) que par des études faites sur des lignées cellulaires (39). Mais, dans ces deux cas, les souches transfectées wMel et wMelPop ont été respectivement utilisées. En employant les souches naturelles wALbA et wAlbB de *Wolbachia* infectant *Aedes albopictus*, la limitation virale n'est plus observée (38). Comme le même hôte montre une inhibition virale ou non selon la souche portée, on pourrait supposer que ce caractère provient de la

mêmes ressources nécessaires aux différentes étapes de son développement (34). En prenant le dessus sur le virus, la bactérie permettrait alors de bloquer ce dernier et protégerait ainsi son hôte. De plus, comme mentionné auparavant, la bactérie entretient une relation étroite avec le cytosquelette de l'hôte pour son déplacement et sa transmission, or le virus nécessite l'usage de ce dernier pour ces étapes d'entrée et de sortie (34). Ainsi, en modifiant le cytosquelette, la bactérie interférerait encore une fois avec le virus.

D'autres observations, concernant une activation du système immunitaire de l'hôte, permettraient d'expliquer le blocage de l'infection virale. Montrée par une expérience de Moreira et al., la présence de la souche wMelPop dans *Aedes aegypti* induirait l'expression de certains gènes codant pour des facteurs immuns de l'hôte (35). Une autre étude, faite sur *Aedes aegypti* infecté par wAlbB, a montré que la bactérie activait les voies Toll et IMD qui permettent de lutter contre de nombreux pathogènes dont le virus de la dengue et *Plasmodium falciparum*, respectivement (37). En supprimant la voie IMD, les chercheurs ont constaté une réduction de la densité de *Wolbachia* alors qu'ils pensaient que le système immunitaire du moustique limitait sa surprolifération (37). A l'inverse, ils ont pu observer une surprolifération de la bactérie en faisant le silencing des régulateurs négatifs Cactus et Caspar des voies Toll et IMD respectivement, ou en utilisant des moustiques *Aedes aegypti* transgéniques surexprimant les facteurs de transcription REL1 et REL2 des voies Toll et IMD, respectivement (37). Les auteurs de cet article suggèrent également que les effecteurs immuns favoriseraient la croissance de la bactérie et proposent l'idée selon laquelle *Wolbachia* exploiterait le système immunitaire de l'hôte pour établir sa symbiose avec le moustique (37). Ainsi, une meilleure compréhension de cette relation pourrait être importante pour évaluer la persistance de la relation entre l'hôte et cette souche qui est capable de bloquer les pathogènes (37).

De plus, alors qu'une immunité intensifiée est observée dans les moustiques modifiés, des résultats similaires ne sont pas retrouvés dans les moustiques naturels, laissant alors place à un débat quant à savoir si l'immunité jouerait un rôle ou non dans le blocage viral (34).

7) *Wolbachia* : moyen de lutte contre les moustiques vecteurs de maladies

I. Les stratégies de remplacement et de suppression de moustiques

Etant donné qu'*Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* sont des vecteurs importants de maladies dangereuses pour l'homme, comme la Dengue ou la Chikungunya (4), l'idée, selon laquelle *Wolbachia* pourrait être utilisée comme moyen de contrôle contre la transmission des maladies, ressort. En effet, les stratégies de remplacement, utilisant des femelles modifiées capables d'inhibition virale, consistent à relâcher ces moustiques dans une population afin de remplacer les femelles non infectées (16). Comme déjà mentionné, ces femelles infectées ont un avantage sur les femelles non infectées en raison de l'IC (26), permettant ainsi à ces dernières de répandre leurs traits au sein de la population. L'utilisation de *Wolbachia* comme moyen de contrôle ne se limite pas à l'inhibition virale. Un deuxième groupe de stratégie consiste à combattre directement les moustiques en diminuant leur nombre (11). De cette manière, les maladies dont ils sont vecteurs seraient éliminées ou, du moins, réduites. Également basée sur l'IC, cette stratégie consiste à relâcher des mâles infectés afin d'obtenir une progéniture non-viable lors des croisements avec des femelles non infectées (16). Pour que la suppression soit efficace, il faut relâcher un nombre suffisamment grand de moustiques mâles. En effet, un certain ratio de mâles infectés sur mâles WT doit être obtenu (41).

II. Le choix de la souche pour un contrôle efficace

Pour un contrôle efficace, le choix de la souche s'avère très important. En effet, des effets variables peuvent être observés si une même souche est présente dans son hôte naturel ou bien si elle a été transférée dans un nouveau hôte (12). Par exemple, alors qu'*Aedes albopictus* portant wAlbB ne montre pas de phénotype d'inhibition virale, ce dernier est retrouvé chez *Aedes aegypti* où la même souche a été transférée (34). De même, une protection contre les virus de la dengue et Zika est observée chez *Aedes albopictus* et *Aedes polynesiensis* lorsque les variants natifs, capables de bloquer faiblement les virus, sont remplacés par de nouvelles souches (11). Il semblerait aussi que plus le nombre de bactéries infectant le moustique est grand, plus l'inhibition des pathogènes est forte (34). Ainsi, comme l'infection d'*Aedes aegypti* par wMelPop permet d'avoir une plus grande densité bactérienne dans les cellules que celles infectées par wMel, ces moustiques montrent également une inhibition virale plus forte que ceux infectés par wMel (42). Cependant, l'usage de wMelPop apporte des coûts aux moustiques, comme une plus faible fécondité et viabilité des embryons (43). Selon la stratégie adoptée, l'utilisation de cette souche apporte donc des avantages comme des inconvénients. Par exemple, dans les stratégies de suppression, cette souche peut être utilisée afin d'obtenir des traits néfastes affectant l'hôte (44). Par contre, elle pourrait poser problème pour les stratégies de remplacement où l'on souhaite affecter le moins possible la viabilité des embryons pour permettre la dispersion de la bactérie. De plus, comme les deux stratégies mentionnées plus haut reposent sur l'IC, des souches conférant un fort phénotype d'IC, comme wMel ou wMelPop, sont nécessaires (12). C'est en connaissance de ces différences que le choix de la souche devra être fait.

III. Sur le terrain : le passage du laboratoire à la nature

Même si en laboratoire des infections avec les souches wMel et wMelPop se sont montrées efficaces, la question, de savoir si des résultats similaires pouvaient s'obtenir dans la nature, s'est posée (45). En effet, certains facteurs présents dans l'environnement pourraient compromettre ces résultats. Une étude a été faite, chez *Aedes aegypti*, pour montrer que les mâles portant la bactérie étaient autant compétitifs, pour se reproduire avec les femelles, que les mâles non porteurs (46). D'autres facteurs, comme l'âge des moustiques, la température ou la nourriture peuvent impacter la bactérie et ses effets sur l'hôte comme l'IC (11,12). En effet, une réduction de l'infection par wMel a été observée après un pic de chaleur (6). De même, la présence d'antibiotique dans la nature peut diminuer le nombre de la bactérie et affecter l'IC (25). Il faut noter que des modèles mathématiques, qui intègrent ces différents facteurs engendrant des coûts ou des bénéfices, ont été créés pour servir de support quant au choix du variant à employer (11). En effet, pour que la bactérie puisse s'établir dans la population, il faut qu'un certain seuil, compensant les effets délétères, soit atteint (11). Une fois celui-ci dépassé, la bactérie peut alors se disperser dans la population grâce à l'IC (11).

Plusieurs essais sur le terrain, optant pour des stratégies de suppression ou de remplacement, ont été réalisés (11). La première stratégie de remplacement efficace s'est effectuée en Australie, près de Cairn, où 298'900 *Aedes aegypti*, modifiés par la souche wMel, ont été libérés en deux localités dans une population naturelle de ce moustique (47). Pour déterminer la fréquence d'infection de *Wolbachia*, une PCR multiplex a été réalisée à partir d'ADN extrait des larves collectées tout au long de l'étude. En trouvant une fréquence proche de la fixation pour les deux zones, le succès de cet essai a été montré. Une campagne, précédent l'essai, avait également été menée dans le but d'informer la communauté et de la faire participer au projet (41), appuyant ainsi sur la nécessité de l'impliquer dans la lutte contre les moustiques.

En 2019, un premier essai européen a été lancé à Rome pour tester la faisabilité d'une stratégie de suppression avec la lignée ARwP d'*Aedes albopictus* dont les souches naturelles ont été enlevées et remplacées par la souche wPip de *Culex pipiens* (41). Pour réaliser cette étude, 26'680 moustiques tigres mâles ont été libérés, pendant deux semaines, dans une zone hautement infectée par les moustiques. Des femelles, des mâles et des œufs, provenant des ovitrappes déposés en amont de l'expérience, ont été prélevés dans une zone infectée et dans une zone contrôle afin d'analyser la stérilité des femelles, la viabilité des œufs et d'identifier les mâles ARwP par PCR. Si, avant le relâchement des moustiques, la viabilité des œufs était supérieure à 99% pour les deux zones, elle est descendue jusqu'à 80% dans la zone traitée. Dans la zone infectée, un tiers des femelles infectées montrait une progéniture stérile. Ainsi, les différents résultats obtenus par le groupe indiquent une réduction de la fertilité des femelles et confortent la possibilité d'utiliser cette technique d'incompatibilité pour lutter contre la nuisance apportée par l'excès de moustiques dans ces zones (41).

De plus, un programme d'élimination des moustiques a été créé en utilisant *Wolbachia* comme agent de contrôle et est appliqué à grande échelle dans 12 pays dont le Brésil et l'Australie (6). Des variantes dans l'emploi de la bactérie ont été proposées, comme la combinaison entre la technique d'incompatibilité avec *Wolbachia* et la SIT (Sterile Insect Technique) (48). En 2015, en Chine, la technique d'incompatibilité, réalisée avec la lignée HC d'*Aedes albopictus* portant les souches naturelles wALbA et wALbB ainsi que la souche transfectée wPip, s'est montrée efficace (48). Cependant, un triage manuel des larves selon le sexe était nécessaire pour éviter un relâchement non désiré de femelles (48). Un tel relâchement poserait d'abord un problème de nuisance, étant donné que ce sont les femelles qui sont responsables des piqûres et donc de la transmission des maladies (8). Mais, surtout, il amènerait le risque d'infecter la population de moustiques et de la remplacer, empiétant ainsi sur un prochain programme de suppression (48). En effet, la population deviendra wALbA, wALbB et wPip empêchant l'IC lors du relâchement de ces mêmes mâles. Ainsi, pour permettre une libération plus importante de moustiques sans devoir passer par un triage manuel tout évitant ce risque, une faible irradiation stérilisant les femelles et les mâles, sans les affecter, a été effectuée (48). Entre 2016 et 2017, un total de 149.4 millions de moustiques a été relâché sur deux sites afin d'obtenir le bon ratio mâles infectés/mâle WT. Cet essai a permis de réduire deux populations de moustiques pour une durée de deux ans. Cependant, très probablement en raison d'immigration de moustiques provenant de zones extérieures à celles testées, une rehausse de la population a été perçue. (48). Si la SIT est difficilement réalisable à cause de la trop forte irradiation affectant la survie des mâles et les rendant moins compétitifs pour la population que les mâles WT (48), une combinaison des deux techniques semble prometteuse.

IV. Perspectives d'avenir et challenges

Ces différentes stratégies, même si prometteuses, nécessitent de développer des approches afin de pouvoir relâcher à plus grande échelle, et donc produire, un plus grand nombre de moustiques (41,48). De tels essais sont en train d'être réalisés au Brésil et en Colombie (45). Un autre challenge évoqué, concerne la surveillance nécessaire pour mesurer l'efficacité de l'essai (45). En effet, tout au long des études réalisées, un haut taux de surveillance a été effectué, mais appliquer le même procédé sur du long terme et à plus grande échelle semble problématique et coûteux (45). C'est pourquoi, il faudra prévoir de nouveaux plans d'applications pour de tels contrôles. Un point important à prendre également en considération sont les souches utilisées pour le contrôle. La capacité de *Wolbachia* à bloquer les virus pourrait diminuer avec le temps en raison d'évolution de ces dernières, ou bien certaines souches portées par *Aedes aegypti* pourraient être affectées par d'autres facteurs comme la température (45).

8) Conclusion

Ce travail de recherche avait pour but de mettre en avant les relations entre le symbiote *Wolbachia* et son hôte ainsi que de montrer son utilisation dans une nouvelle stratégie de lutte contre les maladies apportées par les moustiques. Alors que les techniques précédant la bactérie consistaient à exterminer des moustiques avec des insecticides ou relâcher des moustiques irradiés, utiliser la bactérie comme agent de contrôle biologique apporterait des avantages considérables au niveau écologique et sociétale. En effet, du fait que ni la bactérie ni le moustique ne soient modifiés génétiquement, les communautés se montrent moins méfiantes quant à son utilisation (11). Au niveau écologique, comme *Wolbachia* permet de cibler spécifiquement les moustiques via son phénomène d'IC, son utilisation permettrait également d'éviter les risques causés par les pesticides, comme l'émergence de résistances ou bien l'usage des pyréthrinoïdes qui est nocif pour les poissons et d'autres espèces non ciblées (41).

Si *Wolbachia* semble être une opportunité prometteuse, certaines limitations provenant de facteurs environnementaux sont pointées comme la température, la nourriture et l'âge des moustiques. De plus, comprendre les différentes interactions entre la bactérie et son hôte semble essentiel afin d'exploiter au mieux la bactérie. Continuer à identifier de nouvelles souches de *Wolbachia* dans différents hôtes est important pour comprendre la phylogénie de la bactérie, ses interactions entre les différents hôtes dans l'évolution et offrir de nouvelles pistes pour les stratégies de contrôle. En effet, en découvrant des souches, de nouvelles associations avec les moustiques peuvent être testées dans l'espoir d'améliorer leur contrôle selon les traits apportés par celles-ci.

Etant donné que ces stratégies reposent sur l'IC, approfondir les connaissances à son sujet semble essentiel. La découverte récente des deux gènes *cifA* et *cifB* induisant l'IC laisse envisager leur emploi pour renforcer cette dernière, voire même pour se passer de la bactérie (30). Mais, le mécanisme moléculaire de l'IC, à savoir comment les deux protéines agissent et interagissent entre elles, reste encore à clarifier, laissant en suspens la création d'un système artificiel pour le contrôle du moustique (27). De même, après avoir vu que la présence de la bactérie pouvait conférer une résistance antivirale à l'hôte lors d'une nouvelle association, étudier les différentes interactions entre hôtes natifs ou non permettrait de mieux comprendre comment fonctionne ce mécanisme et d'en prendre avantage pour le contrôle (34).

Ainsi, si l'amélioration des stratégies reposent sur une meilleure compréhension de la bactérie et de ses relations avec son hôte, l'applicabilité de ces stratégies de contrôle a déjà pu être montrée tant pour le remplacement des populations que leur suppression. En effet, des essais ont été réalisés tant en laboratoire que sur le terrain, en commençant par de petites populations de moustiques, comme en Australie. Actuellement, des projets à grande échelle, comme au Brésil, sont en train d'être appliqués.

L'avenir de la lutte contre les maladies transmises par les arbovirus qui ne cesse de toucher le monde pourrait bien prendre fin grâce au symbiote *Wolbachia*.

9) Références

1. Conway MJ, Colpitts TM, Fikrig E. Role of the Vector in Arbovirus Transmission. *Annu Rev Virol.* 2014;1(1):71-88.
2. Lounibos LP. Invasions by Insect Vectors of Human Disease. *Annu Rev Entomol.* 2002;47(1):233-66.
3. Netgen. Moustiques invasifs en Suisse : état de la situation [Internet]. *Revue Médicale Suisse.* [cité 21 mars 2020]. Disponible sur: <https://www.revmed.ch/RMS/2019/RMS-N-649/Moustiques-invasifs-en-Suisse-etat-de-la-situation#B2>
4. Gratz NG. Emerging and Resurging Vector-Borne Diseases. *Annu Rev Entomol.* 1999;44(1):51-75.
5. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature.* avr 2013;496(7446):504-7.
6. Rodrigues-Alves ML, Melo-Júnior OADO, Silveira P, Mariano RMDS, Leite JC, Santos TAP, et al. Historical Perspective and Biotechnological Trends to Block Arboviruses Transmission by Controlling *Aedes aegypti* Mosquitos Using Different Approaches. *Front Med [Internet].* 23 juin 2020 [cité 27 août 2020]; Disponible sur: <https://link.gale.com/apps/doc/A627448454/EAIM?u=hei&sid=zotero&xid=df1d63c2>
7. Löwy I. Leaking Containers: Success and Failure in Controlling the Mosquito *Aedes aegypti* in Brazil. *Am J Public Health.* avr 2017;107(4):517-24.
8. Alphey L. Genetic Control of Mosquitoes. *Annu Rev Entomol.* 2014;59(1):205-24.
9. Hertig, M. The *Rickettsia*, *Wolbachia pipientis* (gen. et sp.n.) and Associated Inclusions of the Mosquito, *Culex pipiens*. 1936;28(4):453-86.
10. Werren JH, Baldo L, Clark ME. *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat Rev Microbiol.* oct 2008;6(10):741-51.
11. Ross PA, Turelli M, Hoffmann AA. Evolutionary Ecology of *Wolbachia* Releases for Disease Control. *Annu Rev Genet.* 2019;53(1):93-116.
12. Hoffmann AA, Ross PA, Rašić G. *Wolbachia* strains for disease control: ecological and evolutionary considerations. *Evol Appl.* 2015;8(8):751-68.
13. Mavingui P, Moro CV, Tran-Van V, Wisniewski-Dyé F, Raquin V, Minard G, et al. Whole-Genome Sequence of *Wolbachia* Strain wAlbB, an Endosymbiont of Tiger Mosquito Vector *Aedes albopictus*. *J Bacteriol.* 1 avr 2012;194(7):1840-1840.
14. Gerth M, Gansauge M-T, Weigert A, Bleidorn C. Phylogenomic analyses uncover origin and spread of the *Wolbachia* pandemic. *Nat Commun.* 2014;1006;5117.
15. Lefoulon E, Clark T, Borveto F, Perriat-Sanguinet M, Moullia C, Slatko BE, et al. Pseudoscorpion *Wolbachia* symbionts: diversity and evidence for a new supergroup S. *BMC Microbiol.* 30 juin 2020;20(1):188.

16. Newton ILG, Slatko BE, Johnson KN. Symbiosis Comes of Age at the 10th Biennial Meeting of Wolbachia Researchers. *Appl Environ Microbiol.* 2019;0404;
17. A response to Lindsey et al. "Wolbachia pipientis should not be split into multiple species: A response to Ramírez-Puebla et al." | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 9 août 2020]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0723202016000400?token=E80DD9154AD5C51B0D012402104939481B02F1B7AAA9BBE9393CFF7CDB7EC15FE808C1775FE06E5D9BB7D9B206B21EC> C
18. Lindsey ARI, Bordenstein SR, Newton ILG, Rasgon JL. Wolbachia pipientis should not be split into multiple species: A response to Ramírez-Puebla et al., "Species in Wolbachia? Proposal for the designation of 'Candidatus Wolbachia bourtzisii', 'Candidatus Wolbachia onchocercicola', 'Candidatus Wolbachia blaxteri', 'Candidatus Wolbachia brugii', 'Candidatus Wolbachia taylori', 'Candidatus Wolbachia collembolicola' and 'Candidatus Wolbachia multihospitum' for the different species within Wolbachia supergroups". *Syst Appl Microbiol.* 1 mai 2016;39(3):220-2.
19. Ruang-areerate T, Kittayapong P, McGraw EA, Baimai V, O'Neill SL. Wolbachia Replication and Host Cell Division in *Aedes albopictus*. *Curr Microbiol.* 1 juill 2004;49(1):10-2.
20. Laven H. Crossing Experiments with *Culex* Strains. *Evolution.* 1951;5(4):370-5.
21. Ghelelovitch S. Genetic determinism of sterility in the cross-breeding of various strains of *Culex autogenicus* Roubaud. Vol. 234. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L'Academie Des Sciences*; 1952. 2386-8 p.
22. Laven H. A Possible Model for Speciation by Cytoplasmic Isolation in the *Culex pipiens* Complex. :4.
23. Yen JH, Barr AR. New Hypothesis of the Cause of Cytoplasmic Incompatibility in *Culex pipiens* L. *Nature.* août 1971;232(5313):657-8.
24. Yen JH, Barr AR. The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *J Invertebr Pathol.* 1 sept 1973;22(2):242-50.
25. Sinkins SP. Wolbachia and cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Insect Biochem Mol Biol.* 1 juill 2004;34(7):723-9.
26. Serbus LR, Casper-Lindley C, Landmann F, Sullivan W. The Genetics and Cell Biology of Wolbachia-Host Interactions. *Annu Rev Genet.* 2008;42(1):683-707.
27. Beckmann J, Bonneau M, Chen H, Hochstrasser M, Poinot D, Mercot H, et al. The Toxin–Antidote Model of Cytoplasmic Incompatibility: Genetics and Evolutionary Implications. *Trends Genet.* janv 2019;35(3):175-85.
28. Tram U, Ferree PM, Sullivan W. Identification of Wolbachia–host interacting factors through cytological analysis. *Microbes Infect.* 1 sept 2003;5(11):999-1011.
29. Werren JH. Biology of Wolbachia. *Annu Rev Entomol.* 1997;42(1):587-609.
30. LePage DP, Metcalf JA, Bordenstein SR, On J, Perlmutter JI, Shropshire JD, et al. Prophage WO genes recapitulate and enhance Wolbachia-induced cytoplasmic incompatibility. *Nature.* 9 mars 2017;543(7644):243.

31. Beckmann JF, Ronau JA, Hochstrasser M. A Wolbachia deubiquitylating enzyme induces cytoplasmic incompatibility. *Nat Microbiol.* 1 mars 2017;2(5):1-7.
32. Bordenstein SR, Bordenstein SR. Eukaryotic association module in phage WO genomes from Wolbachia. *Nat Commun.* 11 oct 2016;7(1):13155.
33. Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mousson L, Failloux A-B, Mavingui P. Persistent Wolbachia and Cultivable Bacteria Infection in the Reproductive and Somatic Tissues of the Mosquito Vector *Aedes albopictus*. *PLOS ONE.* 27 juill 2009;4(7):e6388.
34. Lindsey ARI, Bhattacharya T, Newton ILG, Hardy RW. Conflict in the Intracellular Lives of Endosymbionts and Viruses: A Mechanistic Look at Wolbachia-Mediated Pathogen-blocking. *Viruses.* avr 2018;10(4):141.
35. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, et al. A Wolbachia Symbiont in *Aedes aegypti* Limits Infection with Dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell.* 24 déc 2009;139(7):1268-78.
36. Hussain M, Lu G, Torres S, Edmonds JH, Kay BH, Khromykh AA, et al. Effect of Wolbachia on Replication of West Nile Virus in a Mosquito Cell Line and Adult Mosquitoes. *J Virol.* 15 janv 2013;87(2):851-8.
37. Pan X, Pike A, Joshi D, Bian G, McFadden MJ, Lu P, et al. The bacterium Wolbachia exploits host innate immunity to establish a symbiotic relationship with the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. *ISME J.* janv 2018;12(1):277-88.
38. Blagrove MSC, Arias-Goeta C, Failloux A-B, Sinkins SP. Wolbachia strain wMel induces cytoplasmic incompatibility and blocks dengue transmission in *Aedes albopictus*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(1):255-60.
39. Frentiu FD, Robinson J, Young PR, McGraw EA, O'Neill SL. Wolbachia-Mediated Resistance to Dengue Virus Infection and Death at the Cellular Level. *PLOS ONE.* 15 oct 2010;5(10):e13398.
40. Johnson KN. The Impact of Wolbachia on Virus Infection in Mosquitoes. *Viruses.* nov 2015;7(11):5705-17.
41. Caputo B, Moretti R, Manica M, Serini P, Lampazzi E, Bonanni M, et al. A bacterium against the tiger: preliminary evidence of fertility reduction after release of *Aedes albopictus* males with manipulated Wolbachia infection in an Italian urban area. *Pest Manag Sci.* 11 oct 2019;
42. Terradas G, McGraw EA. Wolbachia-mediated virus blocking in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Curr Opin Insect Sci.* 1 août 2017;22:37-44.
43. Hurk AF van den, Hall-Mendelin S, Pyke AT, Frentiu FD, McElroy K, Day A, et al. Impact of Wolbachia on Infection with Chikungunya and Yellow Fever Viruses in the Mosquito Vector *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis.* 1 nov 2012;6(11):e1892.
44. Rašić G, Endersby NM, Williams C, Hoffmann AA. Using Wolbachia-based release for suppression of *Aedes* mosquitoes: insights from genetic data and population simulations. *Ecol Appl.* 2014;24(5):1226-34.
45. Dorigatti I, McCormack C, Nedjati-Gilani G, Ferguson NM. Using Wolbachia for Dengue Control: Insights from Modelling. *Trends Parasitol.* 1 févr 2018;34(2):102-13.

46. Segoli M, Hoffmann AA, Lloyd J, Omodei GJ, Ritchie SA. The Effect of Virus-Blocking Wolbachia on Male Competitiveness of the Dengue Vector Mosquito, *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 11 déc 2014;8(12):e3294.
47. Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, et al. Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature*. 25 août 2011;476(7361):454-.
48. Zheng X, Zhang D, Li Y, Yang C, Wu Y, Liang X, et al. Incompatible and sterile insect techniques combined eliminate mosquitoes. *Nature*. août 2019;572(7767):56-61.