



HAL
open science

Dynamique de la dengue en Nouvelle-Calédonie : rôle du vecteur *Aedes aegypti* dans la transmission virale

Olivia O'Connor

► To cite this version:

Olivia O'Connor. Dynamique de la dengue en Nouvelle-Calédonie : rôle du vecteur *Aedes aegypti* dans la transmission virale. Maladies infectieuses. Université de la Nouvelle-Calédonie, 2021. Français. NNT : 2021NCAL0007 . tel-03666966

HAL Id: tel-03666966

<https://unc.hal.science/tel-03666966>

Submitted on 13 May 2022

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

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

Université de la Nouvelle-Calédonie

Ecole Doctorale du Pacifique (ED 469)

Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie
Unité de Recherche et d'Expertise Dengue et Arboviroses

DOCTORAT

Discipline : Biologie des populations et écologie

Présenté par **Olivia O'CONNOR**

Dynamique de la dengue en Nouvelle-Calédonie : rôle du vecteur *Aedes aegypti* dans la transmission virale

Thèse dirigée par Myrielle DUPONT-ROUZEYROL

Soutenue publiquement le 27 Avril 2021

Devant le jury composé de :

Pr Maria-Carla Saleh, Institut Pasteur	Rapporteur
Pr Dimitri Lavillette, Institut Pasteur de Shanghai	Rapporteur
Dr Julien Pompon, Institut de Recherche pour le Développement	Examineur
Dr Christophe Menkes, Institut de Recherche pour le Développement	Examineur
Dr Valérie Burtet-Sarramegna, Université de la Nouvelle-Calédonie	Encadrant
Dr Nicolas Pocquet, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie	Encadrant
Dr Myrielle Dupont-Rouzeyrol, Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie	Directeur



« Ce n'est pas le plus fort de l'espèce qui survit, ni le plus intelligent. C'est celui qui sait le mieux s'adapter au changement. »

Charles Darwin

« L'évolution permanente d'une espèce est nécessaire pour maintenir son aptitude face aux évolutions des espèces avec lesquelles elle coévolve ».

Leigh Van Valen, Hypothèse de la reine rouge





REMERCIEMENTS

Il y a maintenant de cela 15 ans, je sortais de la vie universitaire avec mon master. Malgré la sollicitation de mes encadrants de master et de mes responsables de stage, je n'avais pas souhaité poursuivre mes études en thèse. L'image du métier de chercheur à proprement parler ne me convenait pas à l'époque, et comme je le leur disais : « je pourrai très bien faire une thèse plus tard si je change d'avis ». Il m'aura fallu 12 années d'évolution professionnelle pour me décider. Ainsi, ce manuscrit de thèse est en soi le fruit de trois années de travail, mais également l'aboutissement de mon développement personnel et professionnel au sein de mon métier à cet instant précis. J'ai eu l'opportunité au cours de ces années de faire de belles rencontres, toutes aussi enrichissantes les unes des autres. Il y a tant de personnes que je souhaiterais remercier que ces pages ne suffiraient pas, aussi j'espère qu'elles ne me tiendront pas rigueur de ne pas pouvoir toutes les citer. Sachez que vous êtes toutes dans mes pensées.

Dans un premier temps, je tiens à remercier Myrielle Dupont-Rouzeyrol, ma directrice de thèse. Merci de m'avoir accompagnée et fait confiance tout au long de ces années, quelle que soit la situation. Nous avons débuté ensemble dans le « merveilleux » monde des arbovirus, et nous avons appris à nous compléter par certains aspects de notre métier. J'espère que nous pourrons poursuivre encore un bout de chemin ensemble.

Je tiens à remercier Valérie Burtet-Sarramegna et Nicolas Pocquet d'avoir accepté de co-encadrer cette thèse. Ce fut un plaisir d'échanger avec vous, et j'espère que nous pourrons poursuivre nos collaborations, voire en développer de nouvelles dans le futur.

Je tiens à remercier Maria-Carla Saleh et Dimitri Lavillette d'avoir accepté de faire partie de mon jury en tant que rapporteurs et d'évaluer mon travail. Les discussions et les réflexions qui en découleront seront à mon humble avis très intéressantes et stimulantes pour la suite de mon parcours.

Je tiens à remercier également Julien Pompon et Morgan Mangeas d'avoir accepté de faire partie de mon jury et d'examiner mon travail doctoral. Les échanges que l'on aura enrichiront ma réflexion scientifique.



Je tiens à remercier Yvon Cavaloc, Louis Lambrechts et Thomas Hüe d'avoir accepté d'être les membres de mon comité de suivi individuel. Vos conseils et vos encouragements m'ont été précieux au cours de ce doctorat.

Je tiens également à remercier Vincent Richard et Marc Jouan, respectivement précédent et actuel directeur de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. Merci de votre soutien dans mon évolution professionnelle.

Je tiens à remercier Cyrille Goarant, coordinateur scientifique de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. Un grand merci à toi pour tous les échanges que l'on a pu avoir, ta sollicitude et tes conseils depuis mes débuts à l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.

Je tiens à remercier Anna-Bella Failloux, Marie Vazeille, Laurence Mousson, John Aaskov et Louis Lambrechts pour leurs conseils. Merci à vous pour toutes les discussions menées, qui m'ont aidée dans ma réflexion et mes choix.

Je tiens à remercier toutes les personnes ayant fait partie de l'unité de recherche et d'expertise dengue et arboviroses. Quelle qu'ait été la durée de votre passage, les moments partagés m'ont apporté beaucoup de choses, que ce soit au niveau personnel ou professionnel. Une attention particulière pour Domi, Elodie, Catherine, et Marine. Vous m'avez toutes apportées à votre façon, et peut être sans le savoir, la motivation et le courage de poursuivre dans cette voie.

Je tiens à remercier l'ensemble du personnel de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, passé et présent. Merci pour tous les bons moments partagés ensemble, les fous rires, les idées farfelues et bien sûr les discussions plus sérieuses. Un grand merci aux scientifiques, mais également aux personnes de la DAF (Nathalie, Véronique, Pierre) sans qui l'Institut ne fonctionnerait pas aussi bien.

Je tiens à remercier mes amis d'ici et d'ailleurs pour tous nos moments partagés, nos crises de fous rires et nos virées en weekend. Un grand merci pour votre soutien et votre écoute au fil du temps.

Je tiens à remercier du plus profond de mon cœur ma famille. Vous avez toujours été là pour moi par votre soutien indéfectible et vos encouragements. Un remerciement particulier à mes parents, qui ont pu me donner les moyens de réussir tout ce que

j'entreprenais. Un grand merci également à ma sœur, Laetitia, sans qui je n'aurais probablement pas poursuivi mon séjour en France lors de mes études supérieures. Merci pour ton soutien passé et présent. Enfin je tiens à remercier affectueusement l'homme qui partage ma vie, Fred, ainsi que notre fille Emilie. Merci d'être à mes côtés et d'avoir toujours été là pour moi par vos encouragements, votre écoute et votre affection. Ce travail, c'est aussi grâce à vous que je l'ai accompli.



RESUME

Au cours de ces dernières années, la circulation de la dengue dans la région Pacifique et en Nouvelle-Calédonie s'est considérablement intensifiée avec des épidémies de plus en plus fréquentes, une détection du virus en saison fraîche, une co-circulation de plusieurs sérotypes/génotypes de dengue ainsi que d'autres arbovirus. En Nouvelle-Calédonie, le seul vecteur connu de dengue est *Aedes aegypti*. Considérant la dengue comme un problème de santé publique majeur, la Nouvelle-Calédonie a rejoint le World Mosquito Program afin de prévenir les épidémies de dengue par la mise en place d'une stratégie basée sur la bactérie *Wolbachia*. Cette stratégie innovante vise à diminuer la circulation des arbovirus grâce à des lâchers de moustiques *Ae. aegypti* porteurs de la bactérie *Wolbachia*, qui empêchent la réplication et la transmission du virus de la dengue (DENV). Dans ce contexte, une meilleure compréhension des mécanismes d'évolution et de transmission virale chez le vecteur, *Ae. aegypti*, était nécessaire. Ce travail de thèse s'est donc intéressé à l'étude de la fitness du virus de la dengue chez le vecteur calédonien *Ae. aegypti*, au travers de trois objectifs : i) évaluer la fitness de transmission des quatre sérotypes de DENV, ii) évaluer, *in vivo*, l'impact de la fitness compétitive de deux génotypes de DENV-1 sur la transmission virale, et iii) évaluer l'impact de la bactérie *Wolbachia* introduite dans le vecteur calédonien sur la fitness répllicative et de transmission du DENV. Ainsi, nous avons pu mettre en évidence que le vecteur calédonien était capable de transmettre les quatre sérotypes de DENV et qu'il pouvait participer à la sélection des souches de DENV participant à l'évolution du profil épidémiologique de la dengue en Nouvelle-Calédonie. En parallèle, nous avons confirmé l'impact négatif induit par la bactérie *Wolbachia* sur cette fitness virale chez notre vecteur. Ces travaux ont notamment permis de démontrer la complexité de la transmission virale chez le vecteur, et de soulever l'intérêt de conduire des projets de recherche dans un contexte épidémiologique pertinent afin de mieux appréhender la dynamique de la dengue en Nouvelle-Calédonie, voire dans les autres pays concernés par cette maladie.

Mots clés : Virus de la dengue, *Aedes aegypti*, Fitness de transmission virale, Compétition, *Wolbachia*, Compétence vectorielle, Nouvelle-Calédonie



ABSTRACT

In recent years, the circulation of dengue in the Pacific region and in New Caledonia has intensified considerably with more and more frequent epidemics, detection of the virus in the cool season, co-circulation of several dengue serotypes/genotypes as well as other arboviruses. *Aedes aegypti* is the only known vector for dengue virus (DENV) in New Caledonia. Considering dengue fever as a major public health problem, New Caledonia joined the World Mosquito Program to prevent dengue epidemics by implementing a strategy based on the *Wolbachia* bacteria. This innovative strategy aims to reduce the circulation of arboviruses by releasing *Ae. aegypti* mosquitoes infected with *Wolbachia* which avoid the replication and transmission of DENV. In this context, a better understanding of the mechanisms of viral evolution and transmission in the vector, *Ae. aegypti*, was needed. This thesis focused on the study of the DENV fitness in the Caledonian vector *Ae. aegypti*, through three objectives: i) assessing the transmission fitness of the four DENV serotypes, ii) evaluating the impact of competitive fitness, *in vivo*, of two DENV-1 genotypes on viral transmission, and iii) measuring the impact of *Wolbachia* bacteria introduced into the Caledonian vector on the replicative and transmission fitness of DENV. Thus, we demonstrated that the Caledonian vector could transmit the four DENV serotypes and that it could participate in the selection of DENV strains, participating in the evolution of the epidemiological profile of dengue fever in New Caledonia. Concurrently, we confirmed the negative impact induced by *Wolbachia* on this viral fitness in our vector. This work highlighted the complexity of viral transmission in the vector and raises the interest of conducting research projects in a relevant epidemiological context, to better understanding the dengue dynamics in New Caledonia, or even in other countries affected by this disease.

Keywords : Dengue virus, *Aedes aegypti*, Viral transmission fitness, Competition, *Wolbachia*, Vector competence, New Caledonia

TABLE DES MATIERES

Remerciements	v
Résumé	ix
Abstract	xi
Financements et récompenses	xv
Communications	xvii
Liste des Figures	xxi
Liste des tableaux	xxiii
Liste des abréviations	xxv
Partie I : Synthèse bibliographique	1
Chapitre I : Le virus de la dengue	3
1.1 Classification	3
1.2 Structure	4
1.3 Cycle de réplication	6
1.4 Diversité génétique : sérotypes, génotypes, clades	8
Chapitre II : Aspects cliniques de la dengue.....	11
2.1 Caractéristiques cliniques de la maladie	11
2.2 Diagnostic biologique de la maladie	13
2.3 Traitements et vaccins.....	15
Chapitre III : <i>Aedes aegypti</i> , vecteur de la dengue.....	19
3.1 Classification et bio-écologie	19
3.2 Cycle de vie	21
3.3 Importance médicale d' <i>Ae. aegypti</i>	24
3.4 Prévention et lutte antivectorielle.....	27
Chapitre IV : Epidémiologie de la dengue	33
4.1 Epidémiologie mondiale	33
4.2 Epidémiologie dans le Pacifique	35
4.3 Epidémiologie en Nouvelle-Calédonie	38
Chapitre V : La transmission des arbovirus	41
5.1 Plasticité génétique et fitness virale	41
5.2 Contraintes appliquées sur la transmission virale.....	43
Objectifs	47
Partie II : Démarche expérimentale	51
Chapitre I : Etude de la fitness de transmission des quatre sérotypes du virus de la dengue chez le vecteur <i>Ae. aegypti</i>	53

1.1	Contexte et démarche expérimentale	53
1.2	Résultats et conclusions	54
1.3	Publication 1.....	56
Chapitre II : Etude de l'impact de la fitness compétitive de deux génotypes de DENV-1 chez le vecteur <i>Ae. aegypti</i>		57
2.1	Contexte et démarche expérimentale	57
2.2	Résultats et conclusions	58
2.3	Publication 2.....	60
Chapitre III : Etude de l'impact de <i>wolbachia</i> sur la fitness virale du DENV chez le vecteur <i>Ae. aegypti</i>		61
3.1	Contexte et démarche expérimentale	61
3.2	Résultats et conclusions	63
3.3	Publication 3.....	65
Partie III : Discussion générale et perspectives		66
Chapitre I : Discussion générale		68
1.1	Rôle du vecteur dans la sélection des souches de DENV circulantes.....	68
1.2	Impact de la bactérie <i>Wolbachia</i> sur la transmission virale	70
Chapitre II : Perspectives.....		74
Bibliographie		76

FINANCEMENTS ET RECOMPENSES

Financements :

Les travaux menés dans le cadre de ce doctorat ont reçu le soutien financier de :

- L'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (*salaire et axe de recherche n°1*)
- Le Gouvernement de la Nouvelle-Calédonie (*salaire*)
- Les Actions Concertées Inter Pasteuriennes (ACIP, 06-2016) (*axe de recherche n°2*)
- Le World Mosquito Program (*axe de recherche n°3*)

Récompenses :

- Appel à projet de l'Ecole Doctorale du Pacifique pour un déplacement à un colloque international d'une valeur de 150 000 XPF

COMMUNICATIONS

Au cours de ces trois années, j'ai eu l'opportunité de participer à différents travaux en parallèle de ceux menés dans le cadre de ma thèse. Une contribution équivalente de deux auteurs pour un travail donné est mentionnée par un astérisque.

Publications scientifiques issues de ce travail de thèse (3) :

- **O'Connor O**, Calvez E, Inizan C, Pocquet N, Richard V, Dupont-Rouzeyrol M (2020). Vector competence of *Aedes aegypti* from New Caledonia for the four recent circulating dengue virus serotypes. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(5):e0008303. doi: 10.1371/journal.pntd.0008303.
- **O'Connor O**, Ou TP, Aubry F, Dabo S, Russet S, Girault D, In S, Minier M, Hoem T, Boyer S, Dussart P, Pocquet P, Burtet-Sarramegna V, Lambrechts L, Duong V, Dupont-Rouzeyrol M (2021). Potential role of vector-mediated natural selection in dengue virus genotype/lineage replacements in two epidemiologically contrasted settings. Soumis dans le journal « *Emerging Microbes and Infections* ».
- Pocquet N, **O'Connor O**, Flores HA, Tutagata J, Pol M, Hooker DJ, Inizan C, Russet S, Duyvestyn J, Pacidônio EC, Girault D, Minier M, Gonçalves DS, Simmons CP, Dupont-Rouzeyrol M, Rossi N (2021). Towards the end of dengue outbreak in New Caledonia: assessment of the local *Aedes aegypti* wMel strain. Prochainement soumis dans le journal « *Plos Neglected Tropical Diseases* ».

Autres publications scientifiques (7) :

- Inizan C, Minier M, Prot M, **O'Connor O**, Forfait C, Laumond S, Marois I, Biron A, Gourinat AC, Goujart MA, Descloux E, Sakuntabhai A, Tarantola A, Simon-Lorière E, Dupont-Rouzeyrol M (2021). Viral evolution sustains a dengue outbreak of enhanced severity. Soumis dans le journal « *Emerging Microbes and Infections* ».

- Inizan C*, **O'Connor O***, Worwor G, Cabemaiwai T, Grignon JC, Girault D, Minier M, Prot M, Ballan V, Pakoa GJ, Grangeon JP, Guyant P, Lepers C, Faktaufon D, Sahukhan A, Merilles OE Jr, Gourinat AC, Simon-Lorière E, Dupont-Rouzeyrol M (2020). Molecular characterization of dengue type 2 outbreak in Pacific islands countries and territories, 2017-2020. *Viruses*, 12(10):1081. doi: 10.3390/v12101081.
- Fernandes RS*, **O'Connor O***, Bersot MIL, Girault D, Dokunengo MR, Pocquet N, Dupont-Rouzeyrol M, Lourenço-de-Oliveira R (2020). Vector competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia for three Zika virus lineages. *Pathogens*, 9(7):575. doi: 10.3390/pathogens9070575.
- Rakotonirina A, Pol M, Kainiu M, Barsac E, Tutagata J, Kilama S, **O'Connor O**, Tarantola A, Colot J, Dupont-Rouzeyrol M, Richard V, Pocquet N (2020). MALDI-TOF MS: optimization for future uses in entomological surveillance and identification of mosquitoes from New Caledonia. *Parasit Vectors*, 13(1):359. doi: 10.1186/s13071-020-04234-8.
- Inizan C, Tarantola A, **O'Connor O**, Mangeas M, Pocquet N, Forfait C, Descloux E, Gourinat AC, Pfannstiel A, Klement-Frutos E, Menkes C, Dupont-Rouzeyrol M (2019). Dengue in New Caledonia: Knowledge and Gaps. *Trop Med Infect Dis*, 4(2):95. doi: 10.3390/tropicalmed4020095.
- Calvez E, **O'Connor O**, Pol M, Rousset D, Faye O, Richard V, Tarantola A, Dupont-Rouzeyrol M (2018). Differential transmission of Asian and African Zika virus lineages by *Aedes aegypti* from New Caledonia. *Emerg Microbes Infect*, 7(1):159. doi: 10.1038/s41426-018-0166-2.
- Calvez E, Mousson L, Vazeille M, **O'Connor O**, Cao-Lormeau VM, Mathieu-Daudé F, Pocquet N, Failloux AB, Dupont-Rouzeyrol M (2018). Zika virus outbreak in the Pacific: Vector competence of regional vectors. *PLoS Negl Trop Dis*, 12(7):e0006637. doi: 10.1371/journal.pntd.0006637.

Communications:

- **O'Connor O**, Lambrechts L, Pocquet N, Burtet-Sarramegna V, Dupont-Rouzeyrol M (2018). *Aedes aegypti* et les épidémies de dengue en Nouvelle-Calédonie : importance du vecteur et de l'environnement dans l'émergence virale. *Communication Affichée, Doctoriales, Ecole Doctorale du Pacifique, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.*
- **O'Connor O** (2019). *Aedes aegypti* et les épidémies de dengue en Nouvelle-Calédonie : importance du vecteur et de l'environnement dans l'émergence virale. *Communication Orale, Doctoriales, Ecole Doctorale du Pacifique, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.*
- **O'Connor O** (2019). *Aedes aegypti* et les épidémies de dengue en Nouvelle-Calédonie : importance du vecteur et de l'environnement dans l'émergence virale. *Communication Orale, Fête de la Science, Nouméa, Nouvelle-Calédonie.*
- **O'Connor O**, Aubry F, Dabo S, Russet S, Girault D, Pocquet N, Burtet-Sarramegna V, Lambrechts L, Dupont-Rouzeyrol M. Potential role of natural selection in a dengue virus genotype replacement in New Caledonia. *Communication Orale, International Congress for Tropical Medicine and Malaria (ICTMM) 2020, Bangkok, Thaïlande.* Ce congrès prévu en Septembre 2020 a été reporté en Août 2021 en raison de la crise sanitaire due à la COVID-19.



LISTE DES FIGURES

Figure 1 :	Organisation du génome du virus de la dengue	4
Figure 2 :	Structure du virion de la dengue et conformations de la protéine d'enveloppe	6
Figure 3 :	Cycle de réplication du virus de la dengue	8
Figure 4 :	Arbre phylogénétique construit à partir du gène codant pour l'enveloppe des différents sérotypes du virus de la dengue, obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance	9
Figure 5 :	Critères de classification des cas de dengue	12
Figure 6 :	Cinétique du virus et des anticorps de type IgM et IgG au cours d'une infection par le virus de la dengue	14
Figure 7 :	Carte présentant la répartition des moustiques <i>Aedes spp (Stegomyia)</i> vecteurs de dengue dans le Pacifique, 2014	20
Figure 8 :	<i>Aedes aegypti formosus</i> (à gauche) et <i>Aedes aegypti aegypti</i> (à droite)	21
Figure 9 :	Cycle de développement d' <i>Aedes aegypti</i>	22
Figure 10 :	Etapes du cycle de développement du virus dans le moustique	27
Figure 11 :	Principe de l'incompatibilité cytoplasmique et de la diffusion de la bactérie <i>Wolbachia</i> au sein de la population sauvage d' <i>Aedes aegypti</i>	31
Figure 12 :	Nombre cumulé de sérotypes du virus de la dengue déclarés par décennie depuis 1943	34
Figure 13 :	Emergence et circulation du sérotype 2 du virus de la dengue dans la région Pacifique entre 2014 et 2020	37
Figure 14 :	Chronologie des épidémies de dengue en Nouvelle-Calédonie entre 1971 et 2020	38

Figure 15 :	Diversité des systèmes de recherche utilisés pour investiguer les différents aspects de la fitness virale au sens large du terme	43
Figure 16 :	Interaction tripartite pour l'émergence d'une épidémie de dengue sous l'influence de l'environnement	48
Figure 17 :	Evolution de la résistance d' <i>Aedes aegypti</i> à la deltaméthrine sur la ville de Nouméa entre 2012 et 2018	61
Figure 18 :	Représentation schématique de la permissivité des cellules de l'épithélium digestif et des deux types de barrières existantes : la barrière à l'infection des cellules (« Midgut Infection Barrier », MIB) et la barrière à l'échappement des cellules (« Midgut Escape Barrier », MEB).	70

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Classification des géotypes du virus de la dengue et leur distribution géographique	10
--	----

LISTE DES ABREVIATIONS

% :	Pourcentage
°C :	Degré Celsius
ACIP :	Actions concertées inter pasteuriennes
ADE :	Antibody-dependant enhancement
ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
AUS-Tet :	Souche australienne d' <i>Ae. aegypti</i> dont wMel a été éliminée par traitement à la tétracycline
AUS-wMel :	Souche australienne d' <i>Ae. aegypti</i> infecté par wMel
Bti :	<i>Bacillus Thuringiensis serovar israelensis</i>
C :	Capside
CHIKV :	Virus du chikungunya
cm :	Centimètres
DALY:	Disability-adjusted life years
DASS:	Direction des affaires sanitaires et sociales
DEET :	N, N-Diéthyl-m-toluamide
DENV :	Virus de la dengue
DENV-1 :	Sérotype 1 du virus de la dengue
DENV-2 :	Sérotype 2 du virus de la dengue
DENV-3 :	Sérotype 3 du virus de la dengue
DENV-4 :	Sérotype 4 du virus de la dengue
DH :	Dengue hémorragique
DSC :	Dengue avec syndrome de choc
E :	Enveloppe
ELISA :	Enzyme-linked immunosorbent assay
FFU/mL :	Focus forming unit per milliliter
G x G :	Génotype x Génotype

IgG :	Immunoglobulines G
IgM :	Immunoglobulines M
Imd :	Immune deficiency
IPNC :	Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie
JAK/STAT :	Janus kinase/Signal transducers and activators of transcription
kb :	Kilobases
LAV :	Lutte antivectorielle
M :	Membrane
mm :	Millimètres
NC-wMel :	Souche calédonienne d' <i>Aedes aegypti</i> infecté par wMel
NC-WT :	Souche calédonienne d' <i>Aedes aegypti</i> non porteuse de wMel
nm :	Nanomètres
NS :	Non structurale
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
pH :	Potentiel hydrogène
PIB :	Produit intérieur brut
PIE :	Période d'incubation extrinsèque
PPAV :	Protection personnelle antivectorielle
prM :	Pré-membrane
QTL :	Quantitative trait locus
RdRp:	ARN polymérase ARN-dépendante
RIDL:	Release of insects carrying a dominant lethal genetic system
RNAi:	RNA interference
RT-PCR :	Reverse-transcriptase polymerase chain reaction
sfRNA :	Subgenomic flavivirus RNA
siRNA :	Small interfering RNAs
TCID50/mL :	50% tissue infectious dose per milliliter
TIS :	Technique de l'insecte stérile
URE-DA :	Unité de recherche et d'expertise sur la dengue et autres arboviroses

URE-EM : Unité de recherche et d'expertise en entomologie médicale
US : United State of America
wMel : *Wolbachia pipientis* isolée de *Drosophila melanogaster*
WMP: World Mosquito Program
ZIKV : Virus Zika

PARTIE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE



Source : <https://www.pinterest.com/pin/855121047969111320/>



CHAPITRE I : LE VIRUS DE LA DENGUE

1.1 CLASSIFICATION

Les arbovirus (de l'anglais ARthropod-BORne VIRUS) représentent un groupe hétérogène de virus responsables de zoonoses transmis à des hôtes mammifères par des arthropodes hématophages vecteurs (Mellor, 2000). Parmi l'ensemble des arbovirus recensés à l'heure actuelle à travers le monde, une centaine d'entre eux peuvent être pathogènes pour l'Homme. Les arbovirus responsables de pathologies humaines appartiennent principalement : i) au genre *Flavivirus* de la famille *Flaviviridae* (comprenant par exemple le virus de la dengue, le virus de la fièvre jaune ou encore le virus Zika), ii) au genre *Alphavirus* de la famille *Togaviridae* (avec par exemple le virus chikungunya, le virus Ross River), iii) et enfin au genre *Phlebovirus* appartenant à la famille *Bunyaviridae* (avec le virus Toscana par exemple) (Go et al., 2014; Gubler, 2002; Mellor, 2000; Papa, 2019).

La famille *Flaviviridae* comprend quatre genres : *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Pegivirus* et *Hepacivirus*, représentant un total de 89 virus (Simmonds et al., 2017). La plupart de ces virus infectent les oiseaux et/ou les mammifères, et beaucoup d'entre eux présentent un pouvoir pathogène, comme par exemple le virus de l'hépatite C appartenant au genre *Hepacivirus*. Le genre *Flavivirus* comprend le plus grand nombre de virus (au total 53), parmi lesquels la majorité sont des arbovirus. Ceux-ci sont subdivisés en complexes antigéniques et sont transmis soit par des moustiques (comme par exemple le sérocomplexe de l'encéphalite japonaise), soit par des tiques (comme le sérocomplexe des encéphalites à tiques) (Go et al., 2014; Mukhopadhyay et al., 2005; Simmonds et al., 2017).

Le virus de la dengue (DENV) appartient au genre *Flavivirus*. Ce virus se présente sous la forme d'un sérocomplexe comprenant quatre sérotypes (DENV-1 à DENV-4) (Henchal & Putnak, 1990). Une infection causée par un des sérotypes induit une immunité sérotypique croisée de courte durée et une immunité durable envers ce sérotype. Cette dernière ne protège pas d'une nouvelle infection par un autre sérotype (Gubler, 1998). Le DENV est préférentiellement transmis à l'Homme par les moustiques du genre *Aedes*, *Aedes aegypti* étant le principal vecteur (Gubler, 2002).

1.2 STRUCTURE

Le DENV, tout comme l'ensemble des *Flavivirus*, est un virus enveloppé à ARN simple brin de polarité positive. Le génome, d'environ 11 kilobases (kb), contient un seul cadre de lecture codant une seule polyprotéine. Celle-ci comprend 3 protéines de structure : la capsid (C), la membrane (M, exprimée initialement comme la pré-membrane prM qui est le précurseur de M) et l'enveloppe (E), ainsi que 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5). Une coiffe de type I et une terminaison non-polyadénylée forment respectivement les extrémités 5' et 3' non codantes du génome viral (Figure 1) (Lindenbach & Rice, 2003; Mukhopadhyay et al., 2005). L'extrémité 3' présente des pseudo-nœuds dans sa structure secondaire, qui confèrent une résistance à l'action d'une exoribonucléase cellulaire (XRN-1) impliquée dans la dégradation des ARN messagers. Il en résulte la production d'ARN subgénomiques appelés « subgenomic flavivirus RNA » (sfRNA), qui joueraient un rôle dans les mécanismes d'échappement du virus au système immunitaire (Chapman et al., 2014; Clarke et al., 2015; Manokaran et al., 2015; Moon et al., 2015; Ng et al., 2017).

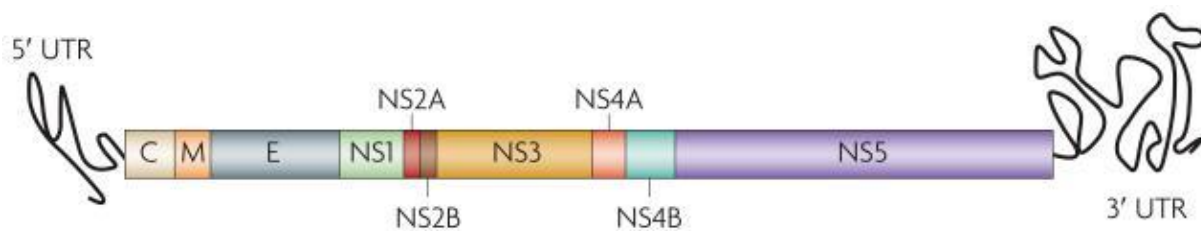


Figure 1. Organisation du génome du virus de la dengue.

Source : (Guzman et al., 2010)

Les protéines de structure forment les composants de la particule virale (appelée virion), tandis que les protéines non structurales sont impliquées dans la réplication de l'ARN viral (Perera & Kuhn, 2008). Le virion possède une forme sphérique avec un diamètre compris entre 50 et 60 nanomètres (nm) (Kuhn et al., 2002). Une nucléocapside constituée de la protéine de la capsid (C) renferme l'ARN viral. Celle-ci est elle-même entourée d'une bicouche lipidique et d'une enveloppe glycoprotéique externe. Cette dernière est composée de 180 copies d'une protéine de l'enveloppe (E) et d'une protéine de membrane (prM et M) qui sont fixées à la bicouche lipidique par des hélices transmembranaires (Zhang et al., 2003a). La protéine de membrane (M) joue un rôle important dans l'assemblage et la maturation des particules du

DENV. La protéine de l'enveloppe (E), qui est une protéine de fusion de classe II, est quant à elle impliquée dans la reconnaissance du ou des récepteurs et la fusion membranaire.

Lors la maturation du virion, l'enveloppe glycoprotéique peut prendre plusieurs formes avec une surface plutôt « épineuse » pour les formes immatures et une surface lisse pour les formes matures (Figure 2) (Perera & Kuhn, 2008). Ces différences structurales sont dues à des changements de conformation des protéines prM, M et E. Chez le virion immature, les protéines prM et E forment 90 hétérodimères qui se présentent sous la forme de 60 pointes trimères à la surface du virion, donnant cet aspect épineux (Figure 2A) (Zhang et al., 2003b). Cette particule virale est la première à bourgeonner dans le réticulum endoplasmique de la cellule infectée. Lors du transit du virion dans les voies de sécrétion de la cellule, l'exposition du virion au pH acide du trans-Golgi induit un nouveau changement de conformation des protéines prM et E. Les 90 hétérodimères se dissocient pour former 90 dimères qui reposent à plat contre la surface virale, donnant un aspect lisse à la surface virale. Cette modification permet la libération d'un site de clivage de la furine de l'hôte qui pourra alors cliver le peptide « pr » du groupe protéique prM (Yu et al., 2008). Le peptide « pr » clivé maintient sa position de coiffe sur les protéines E organisées en 90 homodimères parallèles à la surface du virion (Li et al., 2008). Les protéines M sont quant à elle intégrées à la membrane sous l'enveloppe ainsi formée (Figure 2B et 2C). Le virion mature est ensuite sécrété dans le milieu extracellulaire où le peptide « pr » est détaché de la particule virale permettant la libération du peptide de fusion de l'enveloppe (Figure 2D).

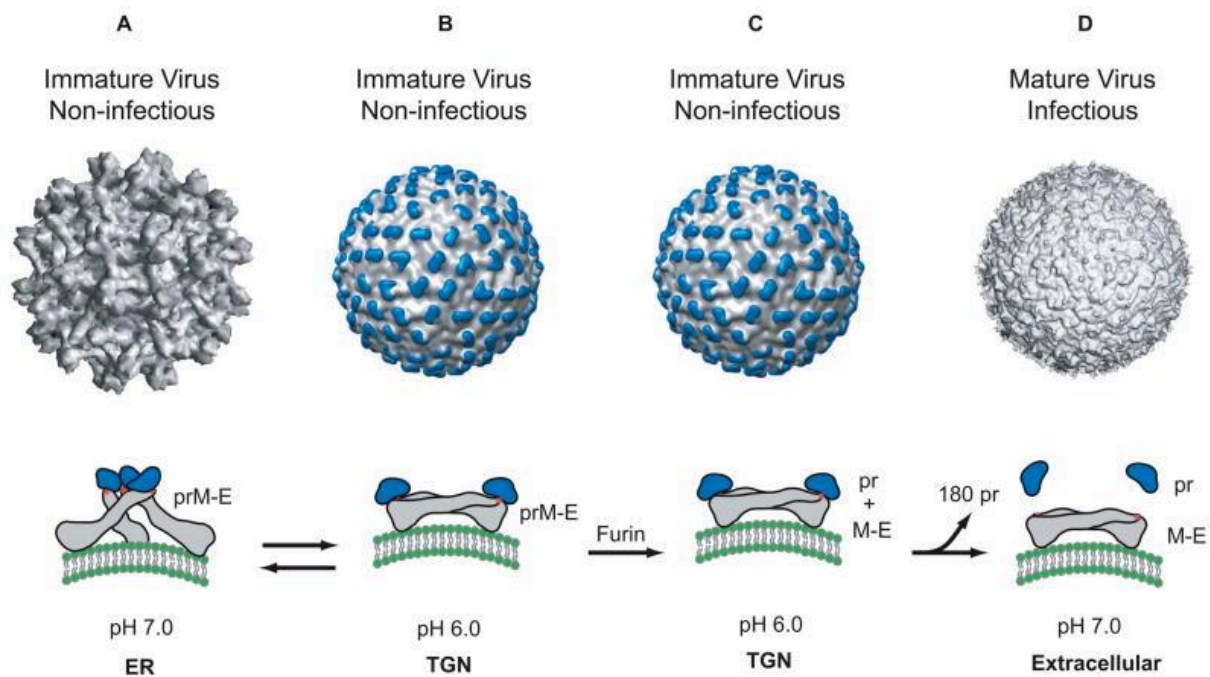


Figure 2. Structure du virion de la dengue et conformations de la protéine d'enveloppe.
Source : (Perera & Kuhn, 2008)

1.3 CYCLE DE REPLICATION

Le cycle de réplication du virus de la dengue est intracellulaire. Il présente les mêmes caractéristiques, qu'il prenne place dans une cellule de vertébré ou d'arthropode. Plusieurs protéines pouvant être des récepteurs ou des corécepteurs potentiels pour le virus ont été identifiées. Ces protéines membranaires sont variables selon le type cellulaire ou l'hôte (Cruz-Oliveira et al., 2015; Mukhopadhyay et al., 2005). Une fois fixé, le virus est internalisé par endocytose. L'acidification du pH cellulaire de l'endosome ainsi formé conduit à une série de changements dans la structure du virion qui déclenchent la fusion de l'enveloppe virale à la membrane endosomale. Ce processus permet la libération de la nucléocapside dans le cytoplasme de la cellule où des enzymes cellulaires du cytosol se chargeront de la dégrader. L'ARN génomique du DENV est ainsi libéré dans le cytoplasme où il joue le rôle d'ARN messager (Mukhopadhyay et al., 2005).

L'ARN viral est immédiatement traduit en une unique polyprotéine qui est clivée par des protéases en 10 protéines, les trois protéines de structure (C, M et E) et les sept protéines non structurales (NS1 à NS5) (Murray et al., 2008). La réplication du génome viral commence avec la formation d'un complexe de réplication lié aux membranes du réticulum endoplasmique et

mettant en jeu l'ARN génomique viral, des protéines virales et des protéines cellulaires (Welsch et al., 2009). La synthèse du brin d'ARN complémentaire de polarité négative est générée par l'ARN polymérase ARN-dépendante (RdRp) codée par la protéine NS5. Sous l'action de la RdRp, le brin d'ARN ainsi obtenu sert de matrice à la production de nouveaux brins d'ARN de polarité positive (Bollati et al., 2010; Khadka et al., 2011; Mukhopadhyay et al., 2005; Perera & Kuhn, 2008; Tay & Vasudevan, 2018). La RdRp n'ayant pas de système de corrections des erreurs, un taux de mutations pouvant aller de 10^{-4} à 10^{-6} substitutions par nucléotides et par cycle de réplication peut apparaître, pouvant conduire à l'apparition de quasi-espèces au sein de la population virale (Domingo, 1992; Domingo et al., 2006; Domingo & Perales, 2019; Kurosu, 2011; Sanjuán et al., 2010).

L'assemblage de l'ARN génomique viral et des protéines de structure produites a lieu à la surface du réticulum endoplasmique, lors d'un bourgeonnement dans le lumen. Les particules immatures ainsi formées transitent ensuite par les voies de sécrétion de l'appareil de Golgi. Le pH acide s'y trouvant permet la maturation des virions par clivage du peptide « pr », qui reste toutefois fixé sur la protéine E afin d'éviter une fusion membranaire précoce (Li et al., 2008). Les virions matures sont libérés dans le milieu extracellulaire par exocytose, où le peptide « pr » est dissocié des particules virales permettant la libération du peptide de fusion de l'enveloppe. Le virion mature devient alors à ce stade infectieux (Mukhopadhyay et al., 2005).

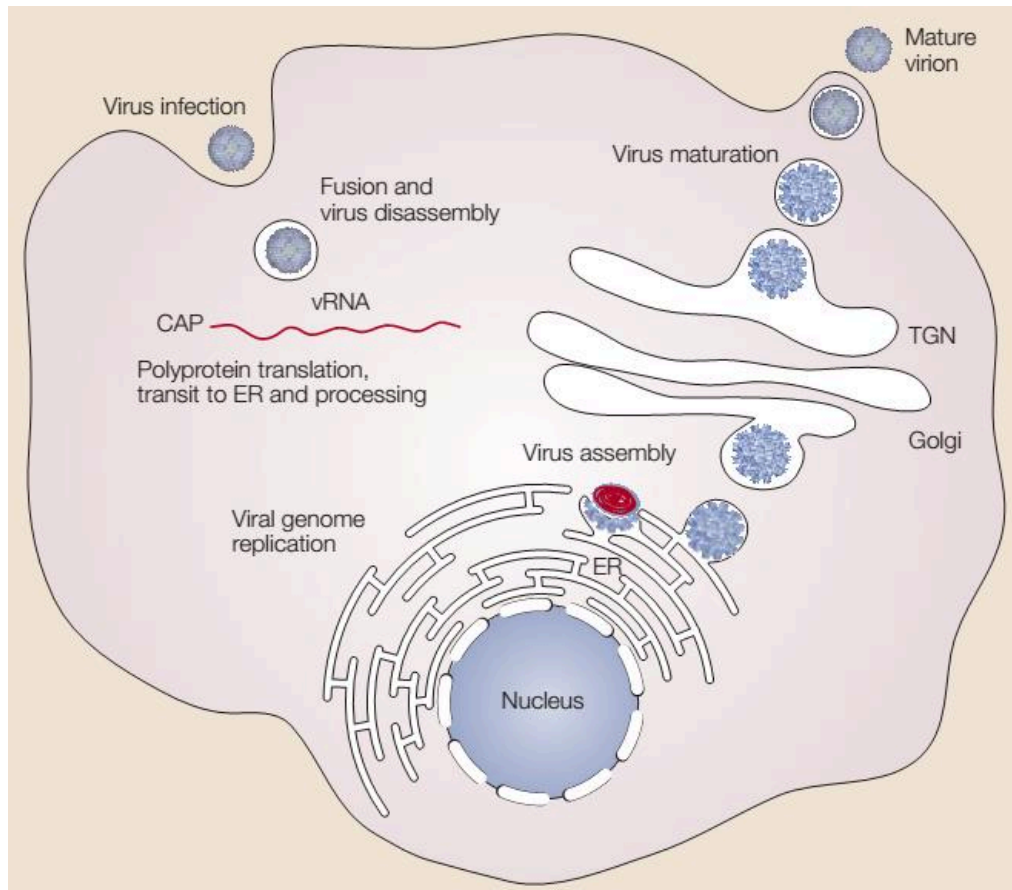


Figure 3. Cycle de réplication du virus de la dengue.
 Source : (Mukhopadhyay et al., 2005)

1.4 DIVERSITE GENETIQUE : SEROTYPES, GENOTYPES, CLADES

Le sérocomplexe de la dengue comprend quatre sérotypes du DENV, nommés DENV-1 à DENV-4, qui sont antigéniquement apparentés. Cette classification a été initialement définie sur la base de réactions croisées limitées dans divers tests sérologiques (Calisher et al., 1989). Plus tard, les analyses moléculaires ont mis en évidence une variabilité génétique en termes de séquences d'acides aminés de plus de 30% entre les différents sérotypes de DENV (Holmes, 2006; Rico-Hesse, 1990). De plus, des sous-groupes génétiquement distincts entre eux ont été identifiés au sein de chaque sérotype (Figure 4). Ces sous-groupes, appelés génotypes, englobent des isolats du DENV dont les séquences nucléotidiques au niveau de la jonction E/NS1 du génome viral ne présentent pas plus de 6% de divergence (Holmes & Twiddy, 2003; Rico-Hesse, 1990).

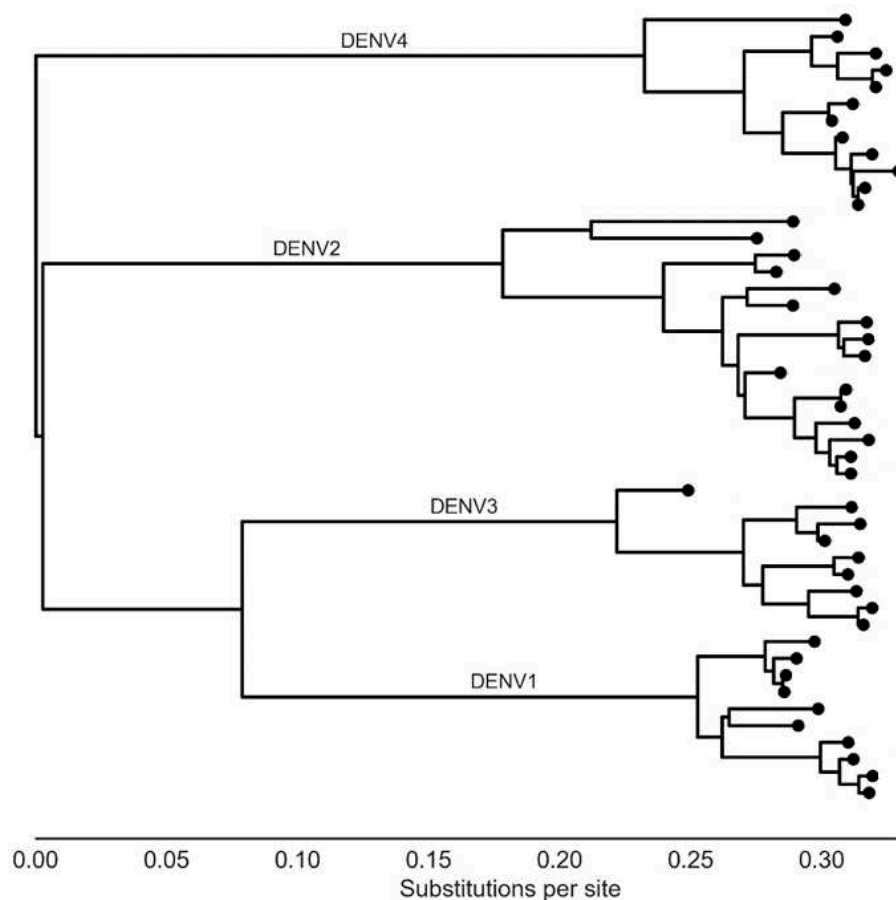


Figure 4. Arbre phylogénétique construit à partir du gène codant pour l’enveloppe des différents sérotypes du virus de la dengue, obtenu par la méthode du maximum de vraisemblance. Source : adapté de (Bell et al., 2019)

Plusieurs études phylogénétiques basées sur l’analyse de la séquence nucléotidique de la jonction E/NS1 ou du gène E dans sa globalité ont permis d’affiner la structuration de ces génotypes pour les quatre sérotypes. Ainsi, cinq génotypes sont inclus dans le DENV-1, nommés I à V (Goncalvez et al., 2002). Le DENV-2 est quant à lui divisé en six génotypes, appelés Asiatique I, Asiatique II, Cosmopolitain, Américain, Américain/Asiatique et Sylvatique (Holmes, 2006; Twiddy et al., 2002). Le DENV-3 et le DENV-4 comprennent chacun quatre génotypes, nommés I à IV pour DENV-3 et I, II, III et Sylvatique pour DENV-4 (Holmes, 2006; Lanciotti et al., 1997; Lanciotti et al., 1994). Les génotypes viraux sont souvent associés à l’origine géographique des isolats viraux les constituants (Tableau 1) (Rico-Hesse, 2003). A une échelle plus fine, une diversité génétique intra-génotype est également observée avec différents clusters, appelés clades ou lignées.

Tableau 1 : Classification des géotypes du virus de la dengue et leur distribution géographique. Source : adapté de (Harapan et al., 2020)

Sérotyp	Géotyp	Distribution géographique des isolats viraux
DENV-1	I	Asie du Sud-Est, Chine et Afrique de l'Est
	II	Thaïlande (isolées entre 1950 et 1960)
	III	Malaisie (isolat sylvatique)
	IV	Iles du Pacifique de l'Ouest et Australie
	V	Amérique, Afrique de l'Est, Asie
DENV-2	Asiatique I	Malaisie et Thaïlande
	Asiatique II	Vietnam, Chine, Taiwan, Sri Lanka, Philippines
	Cosmopolitain	Australie, Afrique de l'Est et de l'Ouest, Iles du Pacifique et de l'océan indien, sous-continent indien, Moyen-Orient
	Américain	Amérique Latine, Caraïbes, sous-continent indien, Iles du Pacifique
	Américain/Asiatique	Thaïlande et Vietnam, Amérique
	Sylvatique	Afrique de l'Ouest et Asie du Sud-Est
DENV-3	I	Indonésie, Malaisie, Philippines, Iles du Pacifique Sud
	II	Thaïlande, Vietnam et Bangladesh
	III	Sri Lanka, Inde, Afrique, Samoa et Thaïlande
	IV	Puerto Rico, Amérique Latine et Centrale, Tahiti
DENV-4	I	Thaïlande, Philippines, Sri Lanka et Japon
	II	Indonésie, Malaisie, Tahiti, Caraïbes et Amérique
	III	Thaïlande (isolats différents des autres isolats de Thaïlande)
	IV	Isolats sylvatiques en Malaisie

CHAPITRE II : ASPECTS CLINIQUES DE LA DENGUE

2.1 CARACTERISTIQUES CLINIQUES DE LA MALADIE

La dengue est une maladie virale transmise par les moustiques du genre *Aedes* touchant toutes les tranches d'âge de la population humaine. On estime que dans la majorité des cas (environ 50-75%), la dengue passerait inaperçue avec de nombreuses formes asymptomatiques et/ou paucisymptomatiques (Bhatt et al., 2013; Grange et al., 2014). Pour les personnes développant une forme symptomatique de la maladie, un large éventail de symptômes cliniques peut apparaître allant d'un simple syndrome grippal à des manifestations cliniques plus sévères pouvant induire le décès. Sur la base de ces manifestations, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a classé la dengue en deux catégories : la dengue classique (avec ou sans signes d'alerte) et la dengue sévère (OMS, 2013).

La dengue classique se caractérise par l'apparition brutale d'une forte fièvre (avoisinant les 40°C) après une période d'incubation de 4 à 10 jours suite à la transmission du virus par un moustique infecté lors de son repas sanguin. Cette fièvre élevée est accompagnée de divers symptômes bénins tels que des douleurs rétro-orbitaires, des céphalées, des douleurs articulaires et/ou musculaires, etc. Certains signes d'alerte présentant une possible évolution vers une dengue sévère peuvent apparaître lors de la phase de défervescence¹, entre le 3^{ème} et le 7^{ème} jour de la maladie, sous forme de douleurs abdominales, d'augmentation du volume du foie (hépatomégalie), de manifestations hémorragiques au niveau des muqueuses ou encore de vomissements persistants. Dans certains cas, une prise en charge médicale adaptée peut être nécessaire pour prévenir l'apparition de complications (Figure 5).

La dengue sévère est une complication potentiellement mortelle résultant principalement d'une augmentation de la perméabilité capillaire. Les manifestations cliniques de la dengue sévère sont des fuites plasmatiques, des hémorragies sévères, d'où l'appellation dengue hémorragique (DH), et/ou une défaillance des différents organes (Figure 5). Une fuite plasmatique massive peut conduire à des détresses respiratoires et, dans une certaine

¹ Diminution ou disparition de la fièvre au cours des maladies aigües

mesure, à un choc hypovolémique, aussi appelé dengue avec syndrome de choc (DSC), dont l'issue est souvent fatale. La DSC se caractérise par un pouls faible avec une pression sanguine qui diminue, une peau froide et humide et une altération de la conscience.

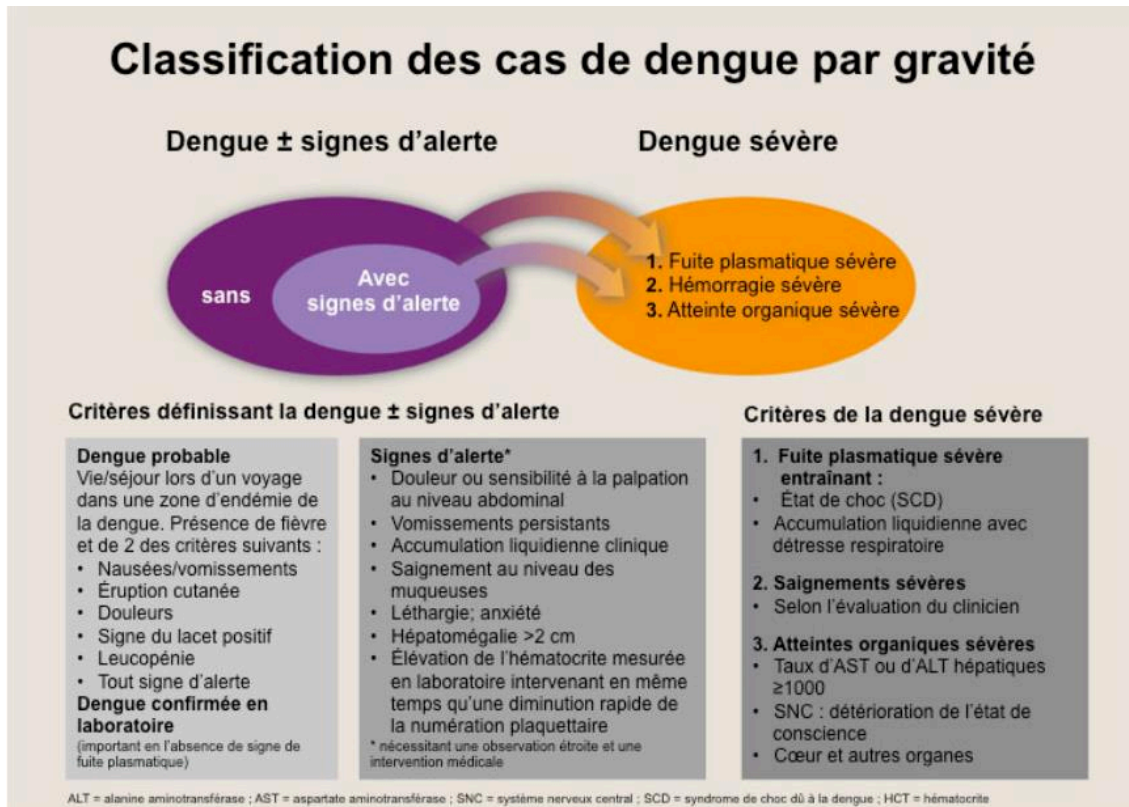


Figure 5. Critères de classification des cas de dengue.

Source : (OMS, 2013)

La pathogénèse de l'infection par le DENV met en jeu des facteurs liés au virus (comme par exemple l'antigène NS1 ou la variabilité du génome viral) et des facteurs liés à l'hôte (qui sont principalement impliqués dans la réponse immunitaire) (Bhatt et al., 2020). De ce fait, les différences antigéniques et génétiques existantes entre les quatre sérotypes influencent l'issue de la maladie, la protection induite par un vaccin, l'évolution virale et l'ampleur de l'épidémie. De plus, des variations antigéniques ont récemment été mises en évidence au sein des sérotypes, au niveau des génotypes (Katzelnick et al., 2015). En effet, certains isolats viraux d'un sérotype/génotype donné seraient antigéniquement plus proches de virus appartenant à un autre sérotype que de virus génétiquement apparentés. Ces variations antigéniques provoqueraient des réactions immunitaires croisées qui pourraient avoir des

conséquences sur la sévérité de la maladie, notamment lors de l'action d'anticorps facilitant l'infection, connue sous le nom d'Antibody-Dependant Enhancement (ADE). En effet, lors d'une primo-infection par le DENV, des anticorps neutralisants (spécifiques du sérotype incriminé) et des anticorps hétérologues (permettant une immunité croisée de courte durée contre les quatre sérotypes) sont produits. Lors d'une infection secondaire, ces anticorps hétérologues permettraient la formation de complexes immuns facilitant la pénétration des virus dans les cellules cibles, telles que les monocytes et les macrophages, via le récepteur Fc-gamma (Dejnirattisai et al., 2010; Guzman & Vazquez, 2010; Halstead & O'Rourke, 1977; Zompi et al., 2012). Il en résulterait alors une infection accrue avec une virémie plus élevée et une diminution de l'immunité de l'hôte conduisant ainsi à une sévérité accrue de la maladie (Boonnak et al., 2011; Chareonsirisuthigul et al., 2007; Ubol et al., 2010). Ainsi, diverses études s'attachant à caractériser les paramètres de sévérité de la maladie ont démontré qu'une infection secondaire par le DENV augmenterait le risque de développer une forme sévère (Halstead, 2015; Halstead et al., 1970). Ce phénomène d'ADE concernerait également les nourrissons développant pour la première fois une dengue et dont la mère est immunisée contre le DENV (Halstead, 2015; Kliks et al., 1988; Nimmannitya et al., 1969).

2.2 DIAGNOSTIC BIOLOGIQUE DE LA MALADIE

Le diagnostic de la dengue est de la plus haute importance en termes de santé publique. En effet, la symptomatologie des arboviroses entre elles est peu discriminante et d'autres pathologies infectieuses (virales et bactériennes) présentent des formes cliniques similaires à la dengue. Un diagnostic différentiel précis et efficace est donc indispensable pour permettre une meilleure prise en charge de la personne atteinte le cas échéant, ainsi que la mise en place de mesures adaptées pour le contrôle et la surveillance de la maladie. Au laboratoire, plusieurs outils pour le diagnostic de l'infection sont disponibles selon le stade d'évolution de la maladie (Guzman et al., 2010) (Figure 6).

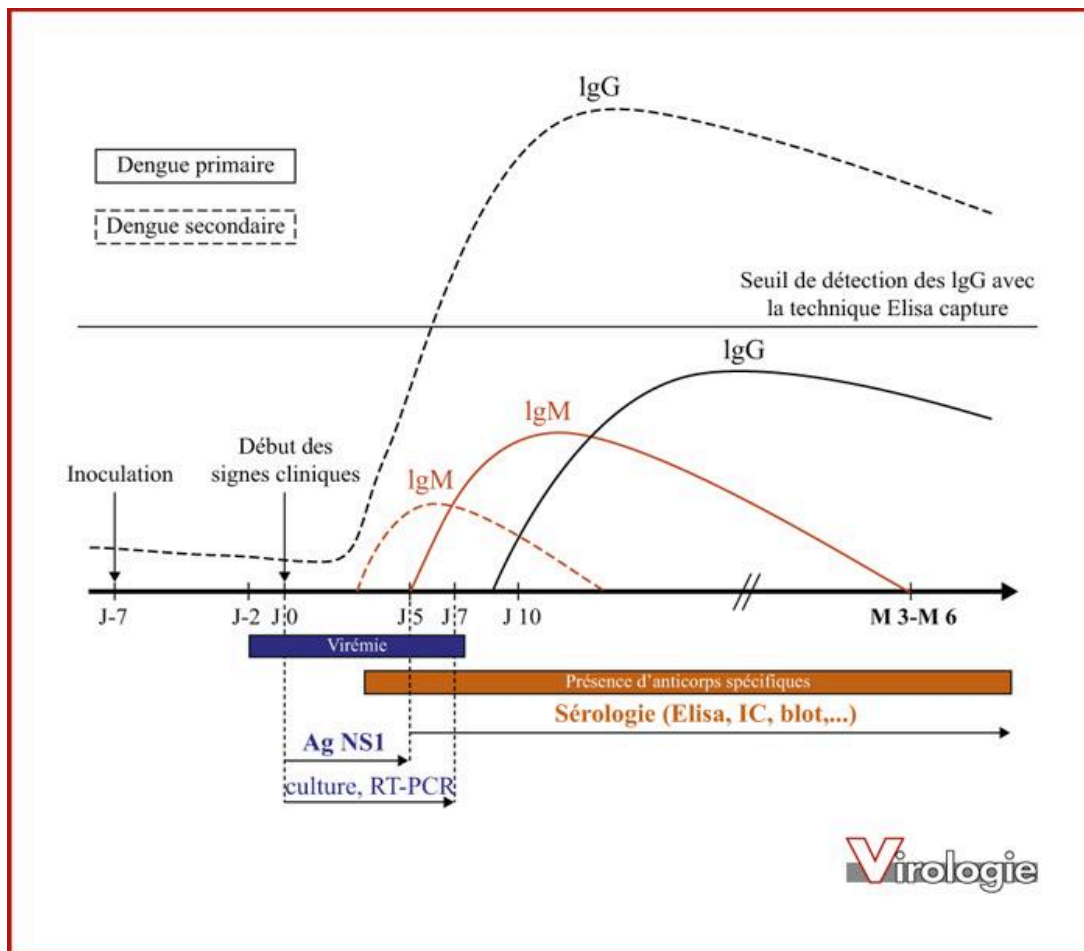


Figure 6. Cinétique du virus et des anticorps de type IgM et IgG au cours d'une infection par le virus de la dengue.

Source : (Najioullah et al., 2012)

Lors de la phase aiguë de la maladie (jusqu'à sept jours après le début de l'apparition des symptômes), le diagnostic de l'infection est considéré comme direct car il permet une détection du virus ou de ses antigènes à partir d'un prélèvement de sang. Les techniques couramment utilisées permettent de détecter d'une part le génome du virus grâce à la technique de RT-PCR (Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction) et, d'autre part, la protéine virale NS1, soit par une technique immuno-enzymatique ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) ou par un test immuno-chromatographique. La culture cellulaire permettant l'isolement du virus infectieux n'est, quant à elle, plus utilisée en routine par les laboratoires de biologie médicale du fait notamment de l'essor de la RT-PCR. De plus, nécessitant un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3 et une technicité élevée, la culture cellulaire est actuellement réservée aux centres d'expertise. Le virus de la dengue

comprenant quatre sérotypes antigéniquement différents, seules la RT-PCR et la culture cellulaire permettent à ce stade de préciser le sérotype incriminé dans l'infection en cours.

Au cours de la phase tardive de l'infection (à partir de cinq jours après l'apparition des symptômes), le diagnostic de l'infection est dit indirect car il se caractérise par la détection de la réponse immunitaire chez le patient. Le diagnostic sérologique repose principalement sur des techniques ELISA ou des tests immuno-chromatographiques permettant la détection des immunoglobulines M (IgM) et G (IgG) spécifiques. Ce diagnostic est un diagnostic probabiliste d'infection car des réactions croisées existent, notamment avec des virus appartenant à la même famille que le virus de la dengue. La confirmation d'une infection par le virus de la dengue pourra être apportée à partir du moment où l'analyse de deux échantillons de sang à 14 jours d'intervalle montrent une séroconversion ou une séroascension. Les techniques de séroneutralisation et d'inhibition de l'hémagglutination sont à l'heure actuelle toujours considérées comme les techniques sérologiques de référence par l'OMS. Cependant, ces deux approches nécessitent également une technicité élevée ainsi qu'un laboratoire de niveau de sécurité biologique 3, rendant leur mise en œuvre impossible par les laboratoires de biologie médicale. Elles sont employées par les centres d'expertise, la technique de séroneutralisation permettant notamment d'identifier le sérotype du virus de la dengue responsable de l'infection.

2.3 TRAITEMENTS ET VACCINS

A ce jour, il n'existe aucun traitement spécifique contre la dengue. Seuls des soins visant à atténuer la douleur, et dans certains cas à maintenir les volumes liquidiens, notamment par la réhydratation du patient ou des transfusions sanguines, sont possibles. Ces soins ont principalement pour but de limiter l'apparition de complications ou de symptômes plus sévères. Grâce à ces mesures de prise en charge médicale, le taux de mortalité associé à la dengue sévère peut être inférieur à 1% (WHO, 2020).

Plusieurs agents thérapeutiques (molécules visant soit le virus, soit des composés de l'hôte) ont été testés dans des essais cliniques sans obtention des succès escomptés (Harapan et al., 2020). Par exemple, le sulfonate de sodium carbazochrome, possédant une activité hémostatique, a été testé chez des enfants pour prévenir la perméabilité capillaire dans les

cas de DH et DSC (Tassniyom et al., 1997). Les résultats obtenus ont montré qu'un nombre équivalent d'enfants a développé un épanchement pleural et/ou un choc qu'ils aient reçu ou non le traitement. Cet agent thérapeutique n'empêcherait donc pas les fuites de plasma ou l'apparition de DSC. De la même manière, l'ensemble des essais cliniques menés avec les différents agents thérapeutiques potentiels a montré une absence de différence significative entre le groupe témoin et le groupe traité (Low et al., 2014; Nguyen et al., 2013; Tam et al., 2012; Tricou et al., 2010; Whitehorn et al., 2016). De ce fait, aucun de ces agents thérapeutiques n'est utilisable à l'heure actuelle.

A ce jour, seul le vaccin tétravalent vivant atténué CYD-TDV (Dengvaxia, Sanofi Pasteur, Lyon, France) est autorisé à être déployé dans certains pays où la dengue est endémique. Les résultats des essais cliniques de phase III menés en Asie et en Amérique Latine ont montré une efficacité de ce vaccin de 56,5% et 60,8% respectivement (Capeding et al., 2014; Villar et al., 2015). Cette efficacité est variable selon l'âge des personnes vaccinées et le sérotype de dengue incriminé : 59% pour le DENV-1, 45% pour le DENV-2, 73% pour le DENV-3 et 84% pour le DENV-4. De plus, un risque accru de développer une dengue sévère par les personnes vaccinées n'ayant aucun antécédent de dengue tels que les enfants de moins de 5 ans a été observé (Hadinegoro et al., 2015; Halstead & Russell, 2016; Sridhar et al., 2018). Aux vues de ces résultats, son utilisation est autorisée chez les personnes âgées de 9 à 45 ans ayant déjà été infectées au moins une fois par le virus la dengue (WHO, 2019; Wilder-Smith et al., 2019). Parallèlement, d'autres candidats vaccins sont également en cours de développement. Ainsi, le candidat vaccin tétravalent vivant atténué TAK-003 (anciennement DENVax, Takeda) a été testé en Asie et en Amérique Latine lors de la phase III de ses essais cliniques. Les résultats obtenus chez les enfants âgés de 4 à 16 ans ont montré une efficacité vaccinale globale de 80,2%. Cependant, cette efficacité est elle aussi variable selon le sérotype de dengue incriminé : 69,8% pour le DENV-1, 95,1% pour le DENV-2, 48,9 % pour le DENV-3 et 51% pour le DENV-4 (Biswal et al., 2020).

Une des difficultés majeures à l'heure actuelle dans le développement vaccinal est d'obtenir un vaccin capable d'apporter une protection contre les quatre sérotypes de la dengue et une immunité rapide sur le long terme, quel que soit l'âge de la population ou son statut immunitaire. Avec un seul vaccin commercialisé sous certaines restrictions et l'absence

de traitements efficaces, les seuls moyens de lutte contre la dengue reposent actuellement sur la prévention et la lutte antivectorielle.

CHAPITRE III : *Aedes aegypti*, VECTEUR DE LA DENGUE

3.1 CLASSIFICATION ET BIO-ÉCOLOGIE

Les moustiques sont des arthropodes appartenant à la classe *Insecta*, à l'ordre *Diptera*, au sous-ordre *Nematocera* et à la famille *Culicidae*. La famille des *Culicidae* regroupe plus de 3500 espèces existantes réparties en deux sous-familles, *Anophelinae* (désignant l'ensemble des anophèles) et *Culicinae*. La sous-famille *Culicinae* comprend 110 genres répartis en 11 tribus (Harbach, 2008). Parmi celles-ci, la tribu *Aedini* comprend le plus grand nombre de genres (83 au total) et d'espèces (plus de 1200) (Duvallet et al., 2017). Un grand nombre d'espèces importantes pour la transmission de filaires et d'arbovirus est compris dans cette tribu. On y trouve notamment des moustiques du genre *Aedes*, dont certaines espèces sont impliquées dans la transmission du DENV.

Au niveau mondial, de nombreuses espèces d'*Aedes* sont reconnues comme vectrices du DENV, les deux principales espèces étant *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. Dans la région Pacifique, ces deux espèces sont représentées avec une prédominance d'*Ae. aegypti* à travers les différentes îles du Pacifique, même si *Ae. albopictus* colonise progressivement la région (Guillaumot et al., 2012). De plus, d'autres espèces sont également capables de transmettre cet arbovirus, comme par exemple *Aedes polynesiensis*, *Aedes hensilli*, *Aedes rotumae*, *Aedes cooki*, etc. (Chow, 1967; Elliott, 1980; Guillaumot, 2005; Roth et al., 2014). Certaines de ces espèces ont une distribution géographique bien délimitée, avec une espèce pouvant être présente uniquement dans une île du Pacifique (Figure 7). En Nouvelle-Calédonie, le seul vecteur connu impliqué dans la transmission de la dengue à ce jour est *Ae. aegypti*. En effet, bien qu'*Ae. albopictus* soit présent dans des îles proches de la Nouvelle-Calédonie (comme le Vanuatu et Fidji), celui-ci n'a pas encore été détecté sur le territoire calédonien. Toutefois le risque d'introduction de ce dernier n'est pas négligeable comme en témoigne l'introduction récente de deux autres espèces de vecteur : *Aedes scutellaris* en 2016 (un vecteur du DENV) et *Anopheles bancroftii* en 2017 (un vecteur de *Plasmodium sp.*) (Pol et al., 2018; Rakotonirina et al., 2020). D'autres espèces d'*Aedes* sont également présentes en Nouvelle-Calédonie, comme par exemple *Aedes vigilax* ou *Aedes notoscriptus*, bien que leur rôle comme vecteur

de dengue n'a jamais été constaté et a été peu étudié (Fauran et al., 1984; Watson & Kay, 1999).

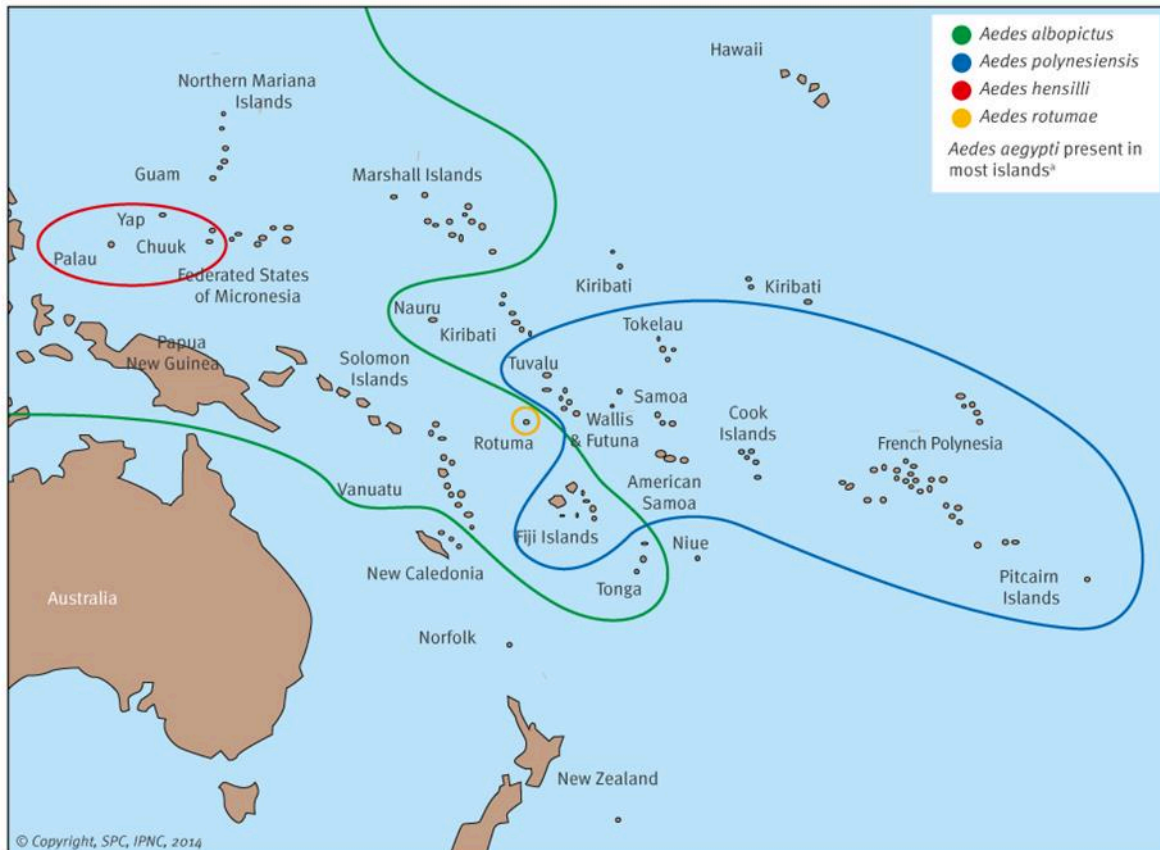


Figure 7. Carte présentant la répartition des moustiques *Aedes spp* (*Stegomyia*) vecteurs de dengue dans le Pacifique, 2014. Source : (Roth et al., 2014)

Ae. aegypti, non représenté sur cette carte, est présent dans tout le Pacifique à l'exception de l'Australie (hormis le Nord du Queensland), la Nouvelle Zélande, Hawaï, Futuna et quelques îles isolées.

Ae. aegypti est une espèce originaire d'Afrique, au sein de laquelle deux formes majeures peuvent être distinguées sur la base de critères morphologiques et éco-éthologiques. La première forme, *Ae. aegypti formosus*, est dite ancestrale avec une coloration très sombre de son tégument (Figure 8). Elle est observée en Afrique tropicale dans les milieux forestiers, où elles exploitent des gîtes larvaires naturels, et également dans certains milieux urbanisés. Ses préférences trophiques sont diverses, piquant aussi bien l'Homme que les animaux (Dégallier et al., 1988; Mattingly, 1967). La seconde forme, *Ae. aegypti aegypti* (communément appelée *Ae. aegypti*) présente une coloration plus claire de son tégument par rapport à *Ae. aegypti*

formosus (Figure 8). Elle est cosmotropicale avec un caractère hautement anthropophile. Inféodée aux milieux urbains, elle exploite des gîtes artificiels tels que des sous-pots de fleur, des pneus ou encore des réservoirs d'eau (Dégallier et al., 1988; Duvallet et al., 2017). Cette forme étant l'unique présente dans la région Pacifique et le vecteur majoritaire, seule celle-ci sera étudiée dans ce manuscrit.



Figure 8. *Aedes aegypti formosus* (à gauche) et *Aedes aegypti aegypti* (à droite).
Photo de Carolyn McBride

Ae. aegypti est une espèce endophage et endophile, c'est-à-dire que les moustiques piquent et se reposent à l'intérieur des habitations humaines. Cette espèce est diurne avec deux pics d'activité, au lever et au coucher du soleil. Sa préférence trophique est variable, piquant aussi bien l'Homme que d'autres animaux. Les femelles adultes piquent généralement plusieurs hôtes lors d'un cycle gonotrophique. *Ae. aegypti* se déplace peu, avec une distance de vol moyenne de 100 mètres (Harrington et al., 2005). Toutefois, l'utilisation de gîtes larvaires artificiels couplée à la résistance de ses œufs à la dessiccation offrent à cette espèce de moustique un mode alternatif de dissémination sur de longues distances via le transport par l'Homme (Duvallet et al., 2017; Jansen & Beebe, 2010).

3.2 CYCLE DE VIE

Le cycle de vie d'*Ae. aegypti* comporte une première phase aquatique, appelée préimaginale (comprenant les stades d'œufs, de larves et de nymphes), puis une phase aérienne dite imaginale (concernant les adultes) (Figure 9). Les œufs, de couleur brune et

d'environ 0.5 millimètres (mm) avec une forme ovale, sont déposés sur un support solide au plus proche de la surface de l'eau d'un gîte. Grâce à leur chorion imperméable à base de chitine, les œufs sont dits « quiescents » car ils peuvent résister plus ou moins longtemps au phénomène de dessiccation (Farnesi et al., 2015; Rezende et al., 2008; Vargas et al., 2014). Après immersion dans l'eau, les œufs éclosent au bout d'un ou deux jours pour libérer des larves aquatiques.

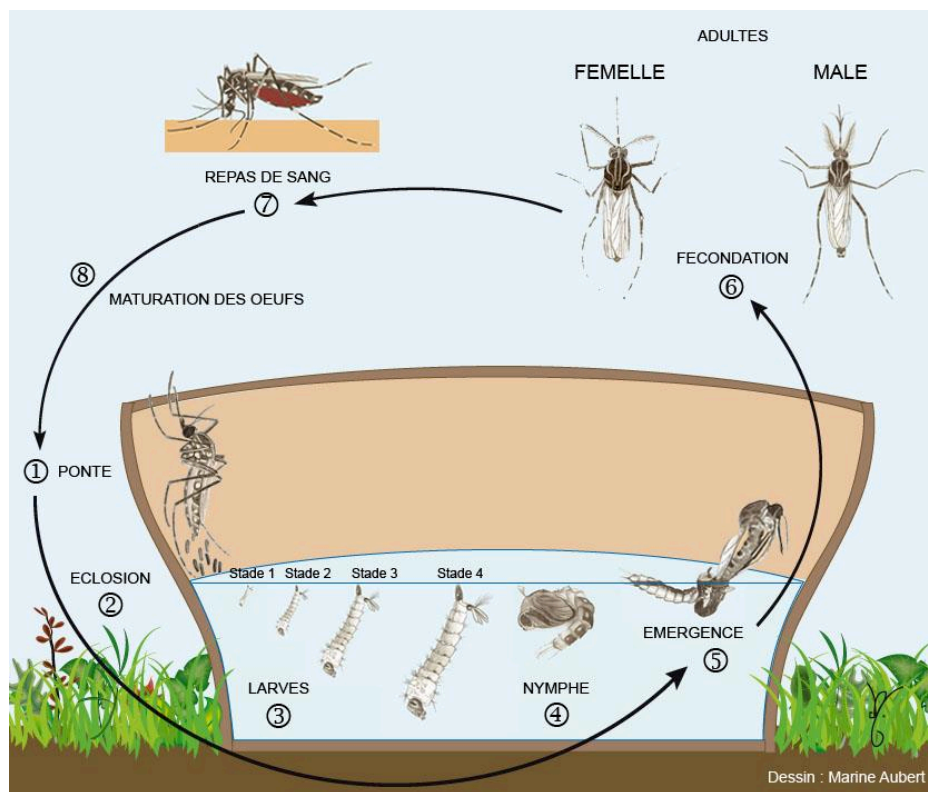


Figure 9. Cycle de développement d'*Aedes aegypti*.

Source : Institut Pasteur

Les larves sont en général microphages et se nourrissent de petites particules présentes dans l'eau du gîte grâce à des pièces buccales de type broyeur. Elles possèdent un siphon respiratoire situé à l'extrémité de leur abdomen qui leur permet de capter l'oxygène de l'air lorsqu'elles se placent à la surface de l'eau. Le développement larvaire est constitué de quatre stades successifs séparés par des mues. Celles-ci permettent leur augmentation en taille, le stade 1 mesurant environ 1 mm contre 1 centimètre (cm) pour le quatrième stade. Le temps de développement larvaire est variable, et il est modulé par les conditions environnementales

telles que la disponibilité en ressources alimentaires, la température de l'eau, la prédation ou encore les compétitions inter- et intraspécifiques (Courret et al., 2014; Krol et al., 2019; Steinwascher, 2018; Tun-Lin et al., 2000). La mue du quatrième stade larvaire conduit au dernier stade de la phase aquatique, le stade nymphal. Les nymphes, qui ont une forme en virgule avec leur abdomen recourbé, ne se nourrissent pas et respirent l'air ambiant grâce à leur deux trompettes respiratoires pro-thoraciques. Au cours de ce stade, qui dure en moyenne entre 1 et 3 jours, a lieu une métamorphose (appelée nymphose) qui permet au moustique de passer de la phase aquatique à un mode de vie aérien.

La nymphose dure en moyenne 15 minutes. Généralement, les femelles émergent après les mâles. Les adultes mesurent entre 5 et 20 mm, avec un corps composé d'une tête, un thorax et un abdomen. La tête comporte les organes sensoriels tels que les yeux composés et les antennes, ainsi que les pièces buccales de type piqueur-suceur avec notamment le proboscis. Les antennes présentent un dimorphisme sexuel. En effet, celles-ci sont plus longues et plumeuses chez les mâles tandis que chez les femelles, elles ont plus un aspect glabre. Le thorax est formé de trois segments (le pro-, le méso- et le métathorax) qui portent chacun une paire de pattes. Une paire d'ailes membraneuses est portée par le mésothorax, tandis que le métathorax possède une paire d'haltères (ou balanciers) qui assure la stabilité de l'insecte en vol. L'abdomen est quant à lui composé de 10 segments, les 3 derniers correspondant aux appendices génital et excréteur. L'anatomie interne est globalement constituée d'un système nerveux, d'un tube digestif occupant la plus grande majorité de la cavité de l'insecte (avec les glandes salivaires situées au niveau du prothorax), et un appareil génital mâle ou femelle le cas échéant. D'autres systèmes sont également présents comme le système circulatoire avec l'hémolymphe, le système excréteur, etc. (Duvallet et al., 2017).

Quelques jours après l'émergence des adultes, les femelles peuvent s'accoupler avec plusieurs mâles, mais, dans la majorité des cas, seulement l'un d'entre eux sera responsable de l'insémination de la femelle. Celle-ci conservera dans ses spermathèques (au nombre de 3) les spermatozoïdes du mâle durant toute sa vie. Bien que se nourrissant tous deux de liquides sucrés (nectar de fleur, sève d'arbre, etc.), seules les femelles sont hématophages. Ces repas de sang sont effectués à chaque cycle gonotrophique, soit tous les 2 à 5 jours. Lors de la piqure, la femelle injecte à l'hôte vertébré de la salive qui contient des molécules anti-hémostatiques permettant de prévenir la coagulation sanguine, la vasoconstriction et l'agrégation

plaquettaire (Fontaine et al., 2011; James, 1994). Ces repas sanguins garantissent un apport en protéines nécessaires à la maturation des œufs fécondés. Après une ovogénèse d'environ 3 jours, les femelles gravides recherchent alors un site où pondre. Elles pondent alors leurs œufs (entre 40 à 80 œufs par ponte) de manière fractionnée, pouvant ainsi disséminer leurs œufs dans plusieurs gîtes. La durée de vie moyenne des moustiques est de quelques semaines (environ 18 jours pour les mâles et 30 jours pour les femelles), bien que celle-ci peut être de plusieurs mois en laboratoire.

3.3 IMPORTANCE MEDICALE D'*Ae. AEGYPTI*

Ae. aegypti revêt une importance médicale car il est vecteur de nombreux arbovirus comme par exemple du DENV, du virus de la fièvre jaune, du virus Zika (ZIKV), ou encore du virus chikungunya (CHIKV). Parmi les trois définitions existantes pour désigner un vecteur, celle que nous retiendrons dans ce manuscrit désigne « tout arthropode hématophage qui assure la transmission biologique active d'un agent pathogène d'un vertébré à un autre vertébré » (Duvallat et al., 2017). Cette définition implique que l'agent infectieux se développe et/ou se multiplie dans le vecteur. Trois acteurs biologiques participent à la transmission vectorielle des arbovirus : le virus, le vecteur et l'hôte vertébré. L'ensemble des interactions existantes au sein de cette triade est sous l'influence de l'environnement, formant ainsi un système vectoriel.

L'évaluation du potentiel de transmission d'un agent infectieux par une population de vecteurs en conditions naturelles s'exprime au travers de la capacité vectorielle. Cette dernière évalue le nombre de piqûres potentiellement infectantes qu'un individu peut générer, par l'intermédiaire de la population vectrice et par unité de temps. La capacité vectorielle peut être quantifiée grâce à un modèle mathématique basé sur la formule suivante (Garrett-Jones & Grab, 1964) :

$$C = \frac{ma^2bp^n}{-lnp} \quad \text{où}$$

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

La capacité vectorielle dépend donc à la fois de facteurs extrinsèques et de facteurs intrinsèques. Parmi les facteurs extrinsèques, on note des facteurs liés à l'hôte (sa disponibilité, son statut immunitaire) ainsi que la densité des vecteurs qui est très fortement liée à l'environnement (pluviométrie, température). Les facteurs intrinsèques comprennent la durée de vie des vecteurs, leurs préférences trophiques, la fréquence de leur repas sanguin et enfin leur compétence vectorielle.

La compétence vectorielle désigne la faculté d'un vecteur à s'infecter après ingestion du repas de sang infecté, puis à assurer la multiplication et/ou le développement du pathogène et enfin à transmettre le pathogène au vertébré lors d'une piqûre ultérieure (Hardy et al., 1983). En d'autres termes, elle mesure le niveau de coadaptation entre l'agent infectieux et le vecteur. Elle dépend essentiellement de facteurs intrinsèques d'origine génétique, ainsi que de facteurs extrinsèques tels que la température. Ainsi, la compétence vectorielle prend en compte le génotype du vecteur. En effet, des différences de susceptibilité entre différentes populations d'*Ae. aegypti* ont par exemple été mises en évidence pour le ZIKV (Aubry et al., 2020; Calvez et al., 2018; Chouin-Carneiro et al., 2016), ou le DENV (Bennett et al., 2002; Diallo et al., 2008; Knox et al., 2003). D'autre part, le génotype viral a également son importance dans la compétence vectorielle d'un vecteur. En effet, il a été montré par exemple une différence de transmission du ZIKV selon sa lignée génétique (Fernandes et al., 2020; Hery et al., 2019; Pompon et al., 2017b). De même des différences de susceptibilité d'*Ae. aegypti* pour le DENV ont été observées en fonction du sérotype/génotype viral (Anderson & Rico-Hesse, 2006; Armstrong & Rico-Hesse, 2001; da Moura et al., 2015; Gaye et al., 2014). La compétence vectorielle dépend également des interactions spécifiques entre le génotype du vecteur et celui du virus, appelées interactions G x G, qui impactent le niveau de compétence d'*Ae. aegypti* à transmettre un virus donné (Fansiri et al., 2013; Lambrechts, 2011; Lambrechts et al., 2009). Bien que les mécanismes génétiques sous-jacents à ces interactions G x G soient

peu connus, des études suggèrent que des Quantitative Trait Loci² (QTL) joueraient un rôle dans l'infection de l'épithélium digestif d'*Ae. aegypti* par le DENV (Bennett et al., 2005; Bosio et al., 2000; Gomez-Machorro et al., 2004). D'autres facteurs comme l'immunité innée du moustique peuvent également influencer la compétence vectorielle. Les principales voies immunitaires de signalisation impliquées dans la défense antivirale chez le moustique sont les voies Toll, Imd, et JAK/STAT. Des études ont démontré que ces voies de signalisation avaient un impact sur la réplication du DENV au niveau de l'épithélium digestif du moustique en la limitant (Ramirez & Dimopoulos, 2010; Sim et al., 2013; Souza-Neto et al., 2009). La voie RNAi (« RNA interference ») joue elle aussi un rôle dans la régulation de l'infection du moustique en contrôlant la réplication virale au niveau du tube digestif ou des glandes salivaires par exemple lors d'une infection d'*Ae. aegypti* par le DENV (Franz et al., 2006; Mathur et al., 2010) ou par le CHIKV (McFarlane et al., 2014).

Le cycle de développement du virus chez *Ae. aegypti* comporte plusieurs étapes, avec la présence de barrières pouvant interrompre celui-ci (Figure 10). Si les barrières s'avèrent efficaces, le moustique infecté ne deviendra pas infectant, et ne sera par conséquent pas compétent (Franz et al., 2015; Hardy et al., 1983; Mellor, 2000). La première phase du cycle de développement viral chez le moustique consiste en l'ingestion du virus par la femelle lors d'un repas de sang pris chez un hôte vertébré virémique (où les virions infectants sont présents dans le sang circulant) (Figure 10, étape 1). Le virus doit ensuite pénétrer à l'intérieur des cellules épithéliales du tube digestif avant que la membrane péritrophique qui sépare le bol alimentaire de l'épithélium digestif ne se mette en place, ou des enzymes digestives ne l'altèrent (Figure 10, étape 2). Une fois à l'intérieur de l'épithélium digestif, le virus y subit une réplication intense. Les virions néoformés doivent ensuite franchir la lame basale qui soutient l'épithélium digestif afin d'être libérés dans la cavité générale de l'insecte (ou hémocœle) (Figure 10, étape 3). Le tube digestif représente la première barrière du cycle de développement du virus chez le vecteur, soit en bloquant la pénétration des virions dans celui-ci (« Midgut Infection Barrier »), soit en bloquant la sortie des virions vers l'hémocœle (« Midgut Escape Barrier ») (Franz et al., 2015). Une fois dans l'hémocœle, le virus pourra se disséminer dans l'ensemble des tissus et organes du moustique, jusqu'à gagner les glandes salivaires. Le virus devra ensuite pénétrer dans les cellules épithéliales des glandes salivaires,

² Locus impliqués dans la variation de caractères quantitatifs

où il se répliquera activement (Raquin & Lambrechts, 2017) (Figure 10, étape 4). Enfin, le virus devra sortir de l'épithélium salivaire pour être libéré avec la salive émise par la femelle lors d'un nouveau repas de sang chez un hôte vertébré (Figure 10, étape 5). Les glandes salivaires constituent la seconde barrière du cycle de développement du virus chez le vecteur, soit en bloquant la pénétration des virions dans celle-ci (« Salivary Gland Infection Barrier »), soit en bloquant la sortie des virions vers la salive (« Salivary Gland Escape Barrier ») (Franz et al., 2015). Le temps qui s'écoule entre l'ingestion du repas infectieux et le moment où le moustique devient apte à transmettre le virus présent dans la salive correspond à la période d'incubation extrinsèque (PIE).

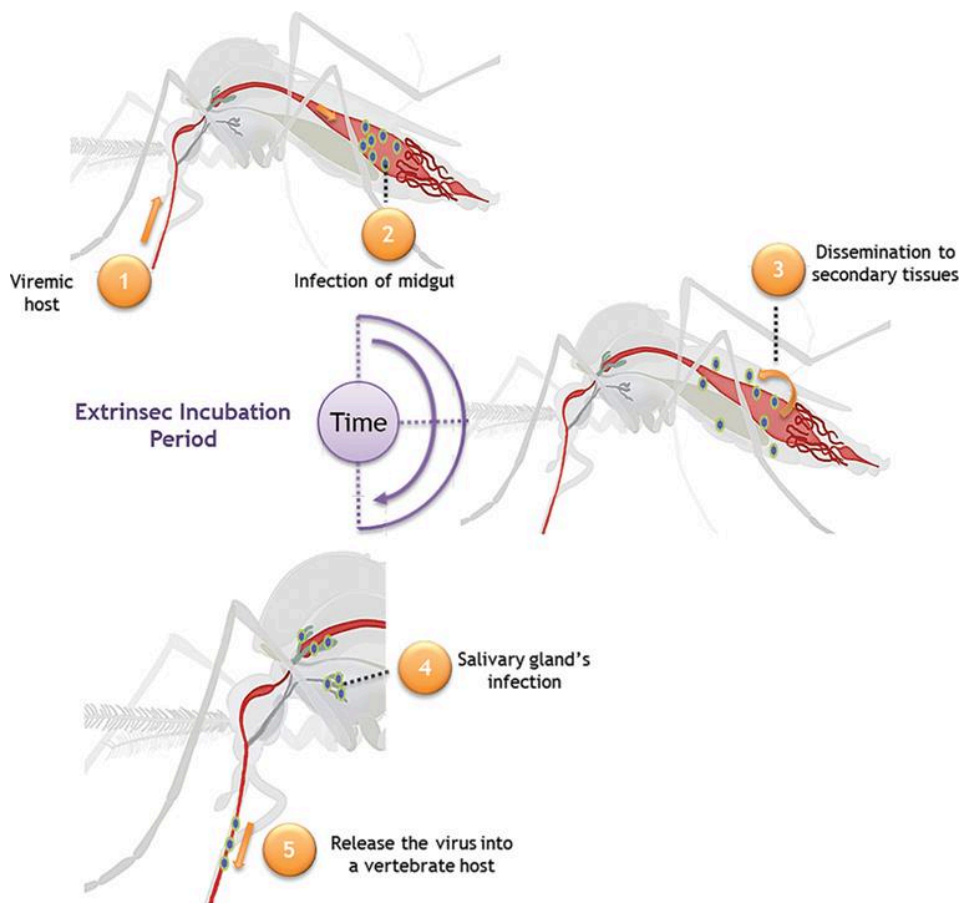


Figure 10. Etapes du cycle de développement du virus dans le moustique.
 Source : (Chouin-Carneiro & Dos Santos, 2017)

3.4 PREVENTION ET LUTTE ANTIVECTORIELLE

En l'absence de traitements et de vaccins efficaces, les seuls moyens de lutte contre la dengue reposent sur la prévention et la lutte antivectorielle. La prévention repose principalement sur l'information de la population via les médias et les réseaux sociaux (rappel des consignes de protection individuelle et de certains moyens de lutte réalisable par la population elle-même) et sur la protection personnelle antivectorielle (PPAV). La PPAV vise à réduire le risque de piqûres potentiellement infectantes par le port de vêtements (qui peuvent être ou non imprégnés d'un insecticide à base de perméthrine), l'utilisation de répulsifs cutanés (comme par exemple le N, N-Diéthyl-m-toluamide, DEET), ou encore la mise en place de moustiquaires. Pour être efficace, la PPAV doit prendre en compte la biologie des vecteurs (diurnes, nocturnes, crépusculaires), le mode de vie de l'hôte, et les différents contextes climatiques, écologiques, sanitaires, socio-économiques.

La lutte antivectorielle (LAV) a pour objectif de minimiser les risques d'endémisation ou d'épidémisation, de diminuer la transmission d'agents pathogènes par des vecteurs et de gérer les épidémies dans un cadre stratégique formalisé (Fontenille et al., 2009). La LAV utilise différentes stratégies comme la lutte mécanique, la lutte chimique, la lutte biologique ou encore la lutte génétique, cette dernière étant aux stades d'essais pour le moment. Généralement, l'efficacité de la LAV repose sur la combinaison de plusieurs de ces méthodes de lutte. La lutte mécanique consiste en l'aménagement de l'environnement afin de le rendre inapproprié au développement ou à la survie des vecteurs. Les actions de cette stratégie reposent principalement sur l'élimination physique des gîtes potentiels et/ou l'entretien de l'environnement (élimination des débris, drainage des gouttières, etc.). La lutte biologique consiste à détruire les larves ou à empêcher leur développement par l'introduction de micro-organismes ou de prédateurs naturels dans le biotope des moustiques. Ainsi des poissons larvivores (comme par exemple des Guppy) ou des bactéries produisant des toxines (comme par exemple *Bacillus Thuringiensis serovar israelensis*, *Bti*) peuvent être utilisés (Lacey, 2007; Seng et al., 2008). Cependant, la lutte biologique a ses limites, avec le risque de maintenir un gîte larvaire en cas de mortalité de ces organismes. La lutte chimique avec l'utilisation d'insecticides à visée larvicide et/ou adulticide est le principal outil de la LAV. Ces insecticides appartiennent principalement à quatre grandes familles d'insecticides de synthèse : les carbamates, les organophosphorés, les organochlorés, et les pyréthrinoïdes. Les carbamates et les organophosphorés sont des inhibiteurs de l'acétylcholinestérase, tandis que les

organochlorés et les pyréthriinoïdes agissent au niveau du canal sodium voltage dépendant, entraînant un effet « knock-down ». Ces quatre familles d'insecticides induisent une paralysie de l'insecte conduisant à sa mort. Pour lutter contre les stades larvaires, des régulateurs de croissance inhibant la nymphose ou la synthèse de chitine lors des mues sont également utilisés (Matsumura, 2010; Paul et al., 2006; Thavara et al., 2007).

Cependant, l'utilisation des insecticides en santé publique est limitée par l'apparition de mécanismes de résistance chez les vecteurs, les rendant inefficaces (Marcombe et al., 2011; Moyes et al., 2017; Yaicharoen et al., 2005). Par ailleurs, les épidémies d'arboviroses sont associées à des coûts élevés pour les pays concernés. A titre illustratif, le coût de l'épidémie de dengue ayant touchée la Nouvelle-Calédonie en 2012-2013 a été estimé à 1,6 milliard de francs Pacifique (environ 13 millions d'euros), soit 0,2% du PIB 2012 (Roy, 2014). A l'échelle mondiale, ce coût est ainsi particulièrement considérable (voir chapitre 4.1). Ces deux types d'arguments (traitements inefficaces et coût considérable des épidémies) rendent indispensable le développement de nouvelles méthodes de lutte contre les épidémies de dengue. Dans cette perspective, la lutte biologique apparaît de plus en plus comme une alternative à la lutte chimique. Ces nouvelles méthodes de lutte visent à diminuer ou à remplacer les populations de vecteurs localement (Alphey et al., 2013). Parmi celles-ci, on peut noter la technique de l'insecte stérile (TIS) qui vise à relâcher massivement sur le terrain des mâles stérilisés afin de réduire les densités de moustiques dans les générations suivantes (Alphey et al., 2010; Benedict & Robinson, 2003), la stérilisation des mâles pouvant se faire par irradiation ou par transgénèse avec l'insertion d'un gène léthal dominant (technique RIDL, « Release of Insects carrying a Dominant Lethal genetic system ») (Massonnet-Bruneel et al., 2013; Phuc et al., 2007; Wilke & Marrelli, 2012). La technique RIDL a été testée dans quelques pays comme par exemple en Malaisie et au Brésil où une réduction de la population sauvage d'*Ae. aegypti* a été observée (Carvalho et al., 2015; Lacroix et al., 2012). Ces techniques restent cependant encore complexes et coûteuses à mettre en œuvre, sans effet à long terme sur les populations de moustiques.

Une autre méthode de lutte biologique innovante est l'utilisation de bactéries endosymbiotiques, *Wolbachia*. Bien que naturellement présentes chez plus de 60% de toutes les espèces d'insectes, ces bactéries sont absentes chez *Ae. aegypti*. Des études ont montré que l'introduction de certaines souches *Wolbachia* chez *Ae. aegypti* peut conduire à une

réduction de son espérance de vie (Brownstein et al., 2003; McMeniman et al., 2009; Rasgon et al., 2003). De même, plusieurs études ont mis en évidence que la présence de cette bactérie chez les femelles induisait une modification de leur compétence vectorielle envers le DENV, le ZIKV ou encore le CHIKV, et qu'elle augmentait également la durée de la PIE (Carrington et al., 2018; Dutra et al., 2016; Moreira et al., 2009; Walker et al., 2011; Ye et al., 2015). En effet, cette bactérie modulerait l'infection du moustique par ces arbovirus en empêchant l'infection du tube digestif ou en réduisant la réplication virale au sein du vecteur. Deux autres aspects intéressants de cette technique résident dans le fait que cette bactérie *Wolbachia* diffuse naturellement dans la population d'*Ae. aegypti* car elle est transmise maternellement, et qu'elle induit un phénomène d'incompatibilité cytoplasmique qui favorise son maintien au sein de la population de moustiques (Figure 11). Cette stratégie *Wolbachia* est actuellement déployée ou en cours de déploiement dans onze pays (Brésil, Colombie, Mexique, Indonésie, Sri Lanka, Vietnam, Australie) et/ou îles du Pacifique (Fidji, Kiribati, Vanuatu, Nouvelle-Calédonie). Les premiers résultats obtenus en Australie et en Indonésie montrent une diminution significative de l'incidence de la dengue dans les zones couvertes par cette méthode de lutte (Indriani et al., 2020; Ryan et al., 2019).

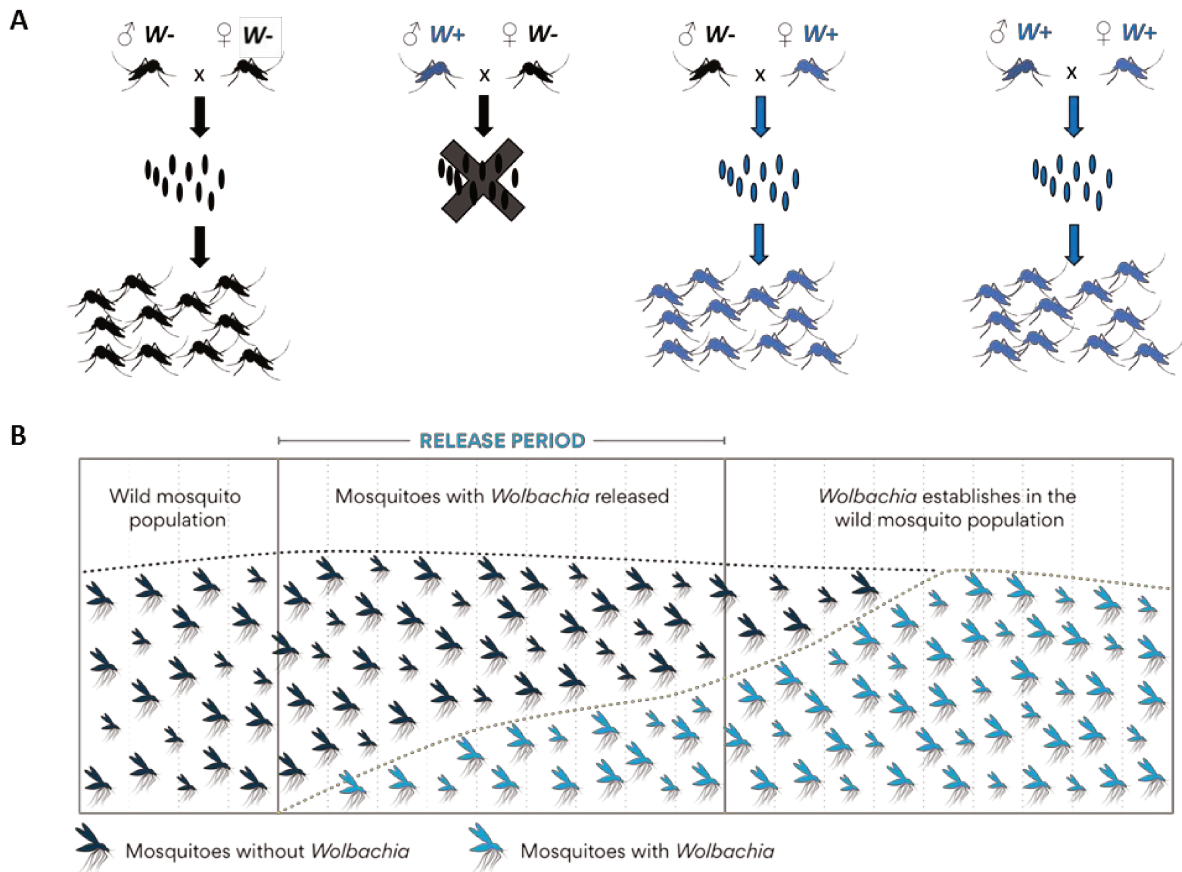


Figure 11. Principe de l'incompatibilité cytoplasmique et de la diffusion de la bactérie *Wolbachia* au sein de la population sauvage d'*Aedes aegypti*.

(A) Principe de l'incompatibilité cytoplasmique. Les quatre types d'accouplement possibles sont représentés avec leur descendance. L'incompatibilité cytoplasmique se traduit par l'absence de descendance viable lorsqu'un mâle infecté par la bactérie *Wolbachia* s'accouple avec une femelle non infectée par cette bactérie. (B) Principe de la diffusion des moustiques porteurs de la bactérie *Wolbachia* dans la nature.

Source : adapté du World Mosquito Program.

CHAPITRE IV : EPIDEMIOLOGIE DE LA DENGUE

4.1 EPIDEMIOLOGIE MONDIALE

Considérée de nos jours comme un problème de santé publique majeur au niveau mondial, la dengue est une maladie ancienne. En effet, des maladies présentant des formes cliniques potentiellement compatibles avec la dengue auraient été observées durant les dynasties chinoises de Jin (265-420 après Jésus-Christ), de Tang (en 610 après Jésus-Christ) et des Song du Nord (en 992 après Jésus-Christ), ainsi qu'en 1635 et 1699 dans les Caraïbes (Gubler, 1998; Guzman & Istúriz, 2010). Cependant, ce n'est qu'en 1779 et 1780 que les premières épidémies présumées de dengue ont été rapportées en Asie, en Afrique et en Amérique du Nord (Carey, 1971; Gubler & Clark, 1995). Entre 1780 et 1940, des épidémies de grande ampleur ressemblant à la dengue ont eu lieu de façon sporadique dans différentes régions géographiques, de l'Afrique à l'Inde en passant par l'Océanie et l'Amérique (Hayes & Gubler, 1992; Kuno, 2009; Vasilakis & Weaver, 2008). De plus, il est également possible que durant cette période de temps, le DENV soit devenu endémique dans certains centres urbains tropicaux. En effet, des personnes non immunisées contre le DENV visitant ces zones en période inter-épidémique, où aucune circulation apparente de la maladie était observée à ce moment, contractaient souvent une maladie semblable à la dengue dans les mois suivant leur arrivée suggérant l'existence d'une endémicité du DENV (Gubler, 1998).

La seconde guerre mondiale a profondément modifié l'épidémiologie de la dengue par ses impacts écologiques et démographiques. En effet, les importants mouvements de populations civiles ainsi que des troupes militaires, notamment américaines et japonaises, ont permis une diffusion de la dengue dans la région Asie-Pacifique. L'urbanisation incontrôlée qui s'ensuivit après la fin de la seconde guerre mondiale a également permis la propagation des moustiques vecteurs, ainsi que du virus de la dengue, dans de nouvelles aires géographiques (Gubler, 1997; Gubler, 1998). Ainsi, dans les années 1950, une co-circulation simultanée des quatre sérotypes du DENV a été observée dans de nombreuses villes d'Asie du Sud-Est, mettant en évidence l'hyper-endémicité de la dengue dans ces régions (Gubler, 1998; Gubler, 2004). Dans ce contexte, une épidémie à un sérotype est favorisée lorsque l'immunité de la population vis-à-vis d'un des quatre sérotypes diminue et / ou lorsqu'une nouvelle

souche du DENV émerge ou est introduite dans la région. En lien avec l'augmentation de la fréquence des épidémies de dengue, notamment en Asie du Sud-Est, des formes sévères de la maladie apparaissent. Ainsi, la première épidémie de DH a été décrite à Manille (Philippines) en 1953-1954 puis à Bangkok (Thaïlande) en 1958 (Halstead, 1980; Hammon et al., 1960). Depuis les années 1960, de nombreuses épidémies de dengue ont eu lieu dans toute la zone intertropicale (Vasilakis & Weaver, 2008), et les zones d'hyper-endémicité de la dengue n'ont cessé de croître (Figure 12) (Messina et al., 2014).

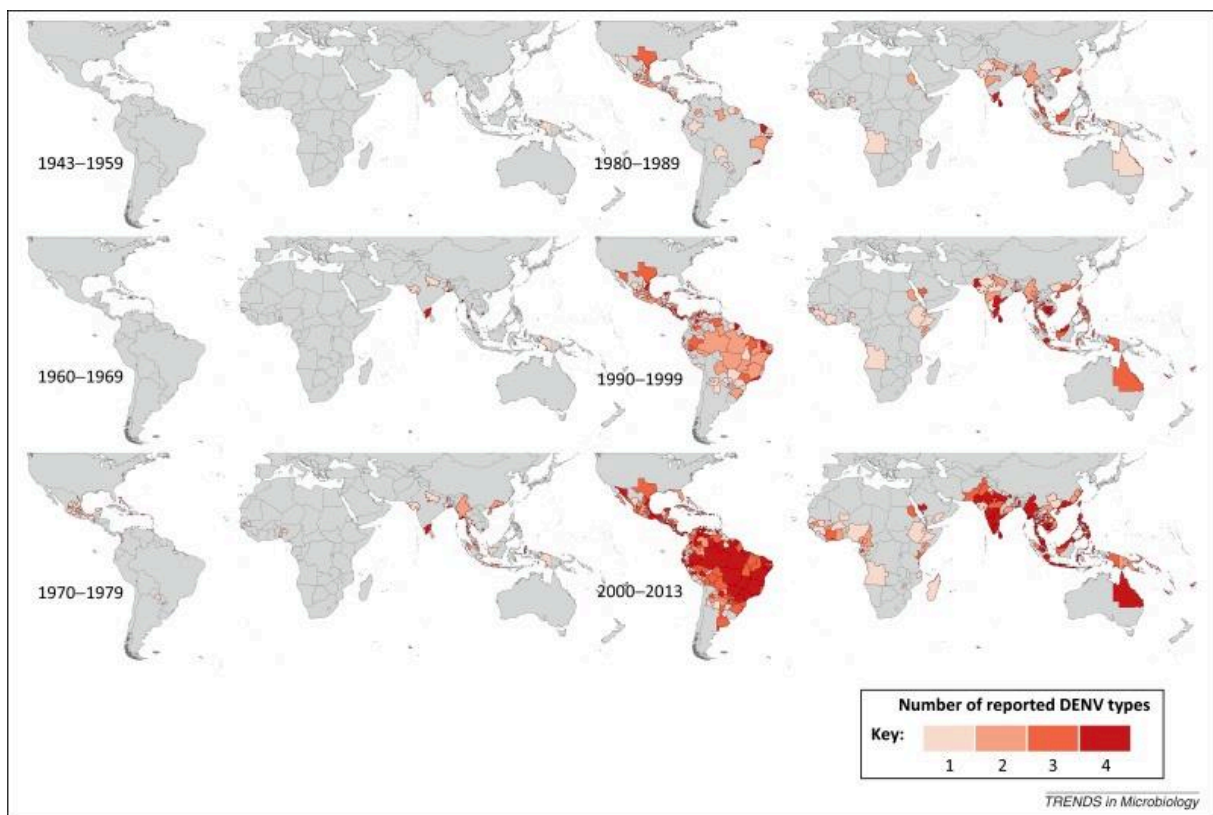


Figure 12. Nombre cumulé de sérotypes du virus de la dengue déclarés par décennie depuis 1943. Source : (Messina et al., 2014).

De nos jours, grâce à des études de prévalence, on estime que 3,6 milliards de personnes vivent dans des zones à risque réparties sur 128 pays (Beatty et al., 2009; Brady et al., 2012). Le nombre d'infections annuelles dues à la dengue est estimé entre 284 et 528 millions, dont seulement 96 millions de personnes atteintes présenteraient des symptômes (Bhatt et al., 2013; Stanaway et al., 2016). Parmi celles-ci, environ 500 000 personnes développeraient une dengue sévère, avec un taux de mortalité inférieur à 1% lorsqu'une prise en charge médicale

adaptée est mise en place (WHO, 2020). L'impact économique associé à la dengue est ainsi de plus en plus conséquent, avec une estimation du coût annuel de la maladie allant d'un milliard de dollars US (à un niveau régional) à 8,9 milliards de dollars US (au niveau mondial) en 2013 (Shepard et al., 2013; Shepard et al., 2016). A titre d'exemple, le coût global estimé de la dengue dans la super région Asie du Sud-Est, Asie de l'Est et Océanie en 2013 serait d'environ 4,8 milliards de dollars US (Shepard et al., 2016). Outre l'aspect économique, cette arbovirose serait globalement responsable de 1,14 millions d'années de vie ajustées sur l'incapacité (DALY, « disability-adjusted life years ») à 2,92 millions DALY au niveau mondial (GBD 2017 DALYs & HALE Collaborators, 2018; Stanaway et al., 2016).

4.2 EPIDEMIOLOGIE DANS LE PACIFIQUE

Les premières épidémies de dengue documentées dans le Pacifique ont concerné Hawaï en 1844, la Polynésie Française en 1852 puis Fidji et la Nouvelle-Calédonie en 1883 (Perry, 1950; Vasilakis & Weaver, 2008). Lors de la Seconde Guerre Mondiale, une épidémie de dengue s'est répandue à l'ensemble du Pacifique en lien avec le déplacement des troupes militaires lors de la bataille du Pacifique. Puis, au cours des années 1960, seule la Polynésie Française a été concernée par une épidémie de dengue (Rosen, 1967). A partir des années 1970, plusieurs épidémies majeures de dengue ont été recensées dans le Pacifique (Singh et al., 2005). Celles-ci apparaissaient sous un mode cyclique tous les trois à six ans, habituellement à la suite de l'introduction du virus en provenance d'Asie, d'Amérique ou d'autres îles du Pacifique. Un seul sérotype/génotype de dengue à la fois était généralement responsable des épidémies observées dans cette partie du monde, avec un changement de sérotype d'une épidémie à l'autre (Dupont-Rouzeyrol et al., 2014).

Depuis le début des années 2000, le profil épidémiologique des arbovirus dans la région Pacifique a évolué avec une circulation prolongée d'un sérotype de DENV, une co-circulation de plusieurs sérotypes de DENV, et la circulation d'autres arboviroses (comme le virus Zika ou le virus chikungunya) (Aubry et al., 2012; Cao-Lormeau & Musso, 2014; Inizan et al., 2019; Roth et al., 2014). Ainsi, le DENV-1 fut le sérotype majoritaire dans la région entre 2001 et 2018 (Cao-Lormeau & Musso, 2014; Dupont-Rouzeyrol et al., 2014; Inizan et al., 2019). Il émerge en 2001 en aux îles Cook, à Samoa et en Polynésie Française. En 2002, il gagne la

Nouvelle-Calédonie, les îles Salomon, Wallis et Futuna, Fidji et le Vanuatu (Lepers, 2003). Il réémerge en 2006 en Polynésie où il diffuse ensuite vers d'autres îles du Pacifique entre 2007 et 2019 (Inizan et al., 2020). Le DENV-2 émerge en 2014 à Fidji et Tuvalu après quinze ans d'absence de circulation dans la région. En 2016, il réapparaît aux îles Salomon et au Vanuatu, avant de diffuser vers d'autres îles du Pacifique entre 2017 et 2019. En 2020, le DENV-2 est le sérotype majoritaire dans la région avec une circulation observée à Fidji, aux îles Cook, en Polynésie Française, en Nouvelle-Calédonie et à Wallis et Futuna (Figure 13) (Inizan et al., 2020). Après dix-huit ans d'absence, le DENV-3 émerge en 2013-2014 dans différentes îles et archipels tels que le Vanuatu, Fidji, Kiribati, les îles Salomon la Polynésie Française, ou encore la Nouvelle-Calédonie (Cao-Lormeau et al., 2014a; Kucharski et al., 2018; Nogareda et al., 2013). Il réémerge ensuite en 2017 en Nouvelle-Calédonie avant de s'éteindre (Inizan et al., 2020; Inizan et al., 2019). A l'instar des autres sérotypes de DENV, le DENV-4 circule peu dans le Pacifique avec une seule émergence en 2007-2009 après trente ans d'absence de circulation dans la région (Cao-Lormeau et al., 2011; Dupont-Rouzeyrol et al., 2014; Li et al., 2010).

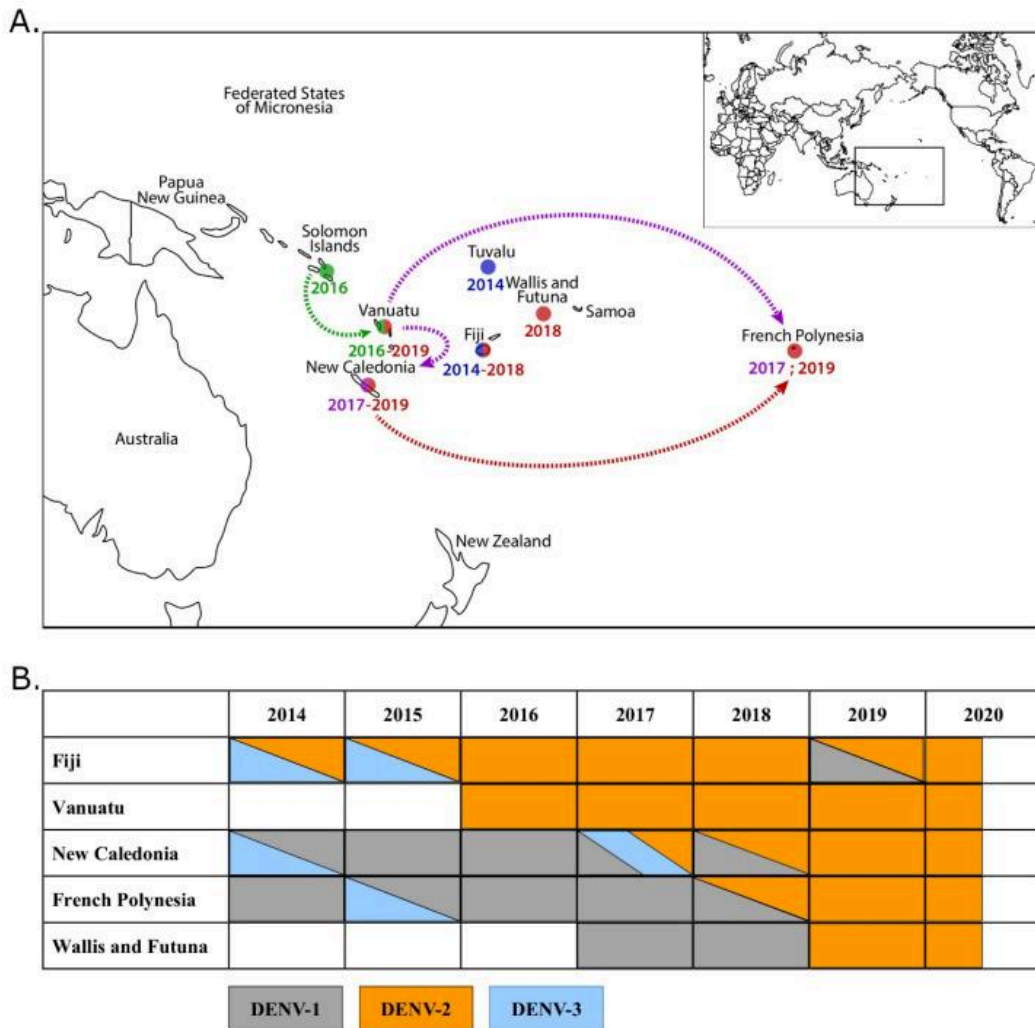


Figure 13. Emergence et circulation du sérotype 2 du virus de la dengue dans la région Pacifique entre 2014 et 2020. (A) Carte de la région Pacifique montrant la temporalité de l'émergence et de la circulation du DENV-2 entre 2014 et 2019. (B) Temporalité de la circulation du DENV dans différentes îles du Pacifique entre 2014 et 2020.

Source : (Inizan et al., 2020)

Deux autres arboviroses ont également circulé dans la région Pacifique. En 2013, le virus Zika émerge en Polynésie Française avant de toucher la Nouvelle-Calédonie. Il diffuse ensuite dans le reste du Pacifique en 2014 puis dans le reste du monde (Cao-Lormeau et al., 2014b; Musso et al., 2019; Musso et al., 2014; Petersen et al., 2016). En février 2016, l'OMS déclara le ZIKV comme une urgence de santé publique au niveau international. Le virus chikungunya a quant à lui été détecté pour la première fois en 2011 en Nouvelle-Calédonie (Dupont-Rouzeyrol et al., 2012). Des cas de CHIKV ont ensuite été observés en Papouasie Nouvelle-Guinée en 2012, à Yap et en Nouvelle-Calédonie en 2013, puis à Tonga en 2014. Au cours de

cette même année, des épidémies dues au CHIKV éclatent aux Samoa Américaines, à Samoa, à Tokelau et en Polynésie Française (Aubry et al., 2015). En parallèle, le CHIKV aurait diffusé depuis l'Asie du Sud-Est ou l'Océanie dans les Caraïbes en 2013, d'où il a ensuite diffusé dans de nombreux pays d'Amérique Centrale (Weaver & Forrester, 2015).

4.3 EPIDEMIOLOGIE EN NOUVELLE-CALEDONIE

La première épidémie de dengue documentée en Nouvelle-Calédonie a été observée dans les années 1880 (Perry, 1950). Suite à l'épidémie due au sérotype 1 de la dengue lors de la seconde Guerre Mondiale, la Nouvelle-Calédonie a ensuite connu une succession d'épidémies depuis les années 1970 selon le même profil d'occurrence que le reste de la région Pacifique (Singh et al., 2005). Classiquement, une épidémie survenait après une introduction du virus de la dengue en provenance d'Asie du Sud-Est ou d'une autre île du Pacifique. L'épidémie sévissait sur deux étés australs consécutifs avec une circulation à bas bruit, quasiment indétectable, du virus durant la saison fraîche. À la suite du second pic épidémique, la circulation du virus ralentissait progressivement pour s'éteindre dans certains cas avant l'introduction d'un nouveau sérotype viral. Des périodes de co-circulation de deux sérotypes du DENV pouvaient avoir lieu de façon transitoire (sur quelques mois), le temps que le sérotype nouvellement introduit supplante le précédent. Un seul sérotype/génotype de DENV était alors responsable d'une épidémie. Jusqu'en 2004, les épidémies de dengue en Nouvelle-Calédonie suivaient ce profil, avec une circulation observée alternée des quatre sérotypes de la dengue entre 1971 et 2004 (Figure 14).

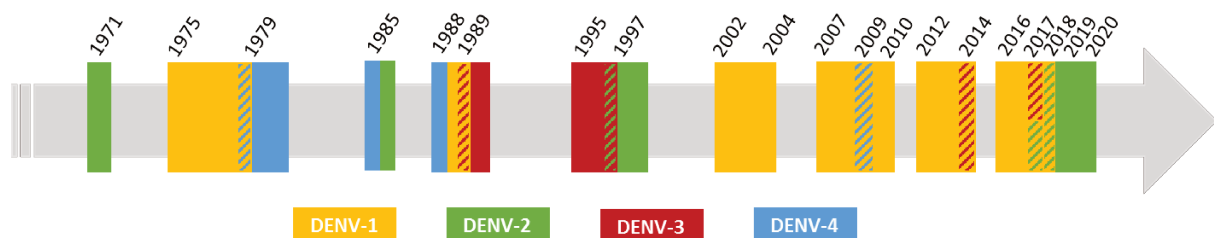


Figure 14. Chronologie des épidémies de dengue en Nouvelle-Calédonie entre 1971 et 2020. Source : Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de Nouvelle-Calédonie et Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie.

Cependant, depuis le début des années 2000, le profil épidémiologique de la dengue a évolué avec une persistance inhabituelle du DENV-1 et une intensification des épidémies (Figure 14). En 2003-2004, une épidémie de DENV-1 génotype IV eut lieu causant environ 3300 cas dont 19 décès. Le DENV-1 génotype IV émerge de nouveau en 2008 avec une co-circulation avec le DENV-4 génotype II en 2009 (sérotypage qui n'avait pas concerné le territoire depuis plus de 30 ans), sans qu'il y ait remplacement du DENV-1 par celui-ci. Au cours de cette épidémie, plus de 8000 cas ont été recensés, dont 5 décès. En 2012-2013, une nouvelle épidémie de DENV-1 éclate, dont l'ampleur en termes de nombre de cas a surpassé toutes les autres (avec un peu moins de 11000 cas enregistrés et 5 décès) (Dupont-Rouzeyrol et al., 2014). De manière surprenante, un remplacement de génotype au sein du DENV-1 est observé en 2012 : le DENV-1 génotype IV initialement responsable de l'épidémie fut remplacé en quelque mois par le DENV-1 génotype I. En 2014, on observe une co-circulation du DENV-1 génotype I et du DENV-3 génotype I avec une représentation équivalente des deux sérotypes, bien que le DENV-3 n'ait pas circulé en Nouvelle-Calédonie depuis dix-huit ans. De plus, une épidémie de Zika touche également la Nouvelle-Calédonie cette année-là (Dupont-Rouzeyrol et al., 2015). En 2016, une épidémie de DENV-1 génotype I débute avec une co-circulation avec le DENV-3 (génotype indéterminé) et le DENV-2 génotype Cosmopolitain en 2017. En 2018, le DENV-3 est éteint, mais une co-circulation de DENV-1 génotype I et de DENV-2 génotype Cosmopolitain est toujours observée, avec au total un peu plus de 2000 cas recensés. En 2019 et 2020, seule le DENV-2 génotype Cosmopolitain est détecté avec environ 4000 cas enregistrés (Inizan et al., 2020).

Ces données reflètent une intensification des épidémies au cours des dix dernières années et suggèrent que le profil épidémiologique de la dengue en Nouvelle-Calédonie est en train d'évoluer vers un mode endémo-épidémique, bien que l'introduction du virus de la dengue d'une autre région soit toujours nécessaire. Cette évolution serait en lien avec l'observation d'une circulation inter-épidémique de la dengue chaque année, des épidémies de plus grande ampleur que par le passé et une incidence de cas de dengue plus élevée durant la période fraîche. En mars 2020, la crise sanitaire mondiale liée à la COVID-19 a engendré la fermeture des frontières de la Nouvelle-Calédonie, ne permettant pas l'introduction de virus sur le territoire via des passagers rentrant de voyage. Pourtant, 63 cas de DENV-2 ont été

recensés tout au long de l'année 2020, renforçant par la même l'évolution de la Nouvelle-Calédonie vers une endémisation de la dengue (DASS., 2020).

CHAPITRE V : LA TRANSMISSION DES ARBOVIRUS

5.1 PLASTICITE GENETIQUE ET FITNESS VIRALE

Chez les virus à ARN, la réplication virale est assurée par la RdRp (ARN polymérase ARN-dépendante), qui ne possède pas d'activité exonucléasique permettant la correction des erreurs de lecture lors de la réplication du génome viral. De ce fait, un taux de mutation d'environ 10^{-4} à 10^{-6} substitutions par nucléotides et par cycle de réplication peut se produire (Sanjuán et al., 2010). Il a par ailleurs été montré que ce taux de mutation pouvait être variable pour un même isolât viral en fonction de l'environnement cellulaire, lui-même influencé par l'hôte (Combe & Sanjuán, 2014). Ce taux de mutation, couplé à une réplication virale rapide et à une population virale de grande taille, va générer une multitude de variants viraux, distincts génétiquement d'une ou plusieurs mutations, appelés « mutant swarms » (traduit en français : nuages de mutants). Lorsque ces mutants sont étroitement apparentés à une séquence nucléotidique dominante et qu'ils sont sélectionnés à un niveau populationnel au cours de leur évolution, ils forment une sous-population virale appelée quasi-espèce. Ainsi, les quasi-espèces virales correspondent à des distributions dynamiques de mutants viraux étroitement apparentés, résultant de et soumis à un processus continu de variabilité génétique, de compétition et de sélection, et qui agissent comme une unité de sélection (Domingo et al., 2006). Généralement, la sélection naturelle domine l'évolution des populations de virus de grande ampleur (Weaver et al., 2021). Ainsi, une sélection positive pourra sélectionner les variants viraux possédant une fitness virale accrue par rapport aux autres. De même, une sélection purifiante, visant à éliminer certains variants viraux, peut intervenir lorsque certaines mutations aléatoires et/ou délétères induisent une diminution de fitness. La sélection naturelle éliminera plus efficacement les mutations ayant un impact négatif plus grand sur la fitness du virus par rapport à celles ayant un impact moindre.

Les quasi-espèces joueraient un rôle important dans la pathogénèse des virus à ARN ou dans la fitness virale (Domingo et al., 2012). La fitness (ou valeur sélective) est un concept fondateur complexe à la base de l'écologie et de l'évolution. La définition générale de la fitness selon Darwin consiste à la transmission du matériel génétique à la descendance. Ainsi, au regard des virus, une première définition de la fitness virale a été introduite comme étant la



capacité d'un virus à produire des virions infectieux dans un environnement donné (Domingo & Holland, 1997). Cette définition sera par la suite considérée comme étant la fitness répliquative. Cependant, comme les virus se répliquent obligatoirement dans des hôtes, leur durée de vie et donc leur fitness telle qu'ainsi définie sont limitées. En effet, le système immunitaire de l'hôte peut neutraliser les virus et induire leur élimination, et d'autre part, la durée de vie de l'hôte aura également un impact sur la fitness des virus. Ainsi, pour survivre et conserver leur fitness, les virus doivent être transmis à un nouvel hôte. On parle alors de fitness de transmission (Wargo & Kurath, 2012). A une échelle plus large, la combinaison de la fitness répliquative et de la fitness de transmission contribue à la prédominance du matériel génétique viral à l'échelle de la population. Pour plusieurs virus d'importance médicale, il peut y avoir une co-circulation de différents sérotypes ou génotypes (ou encore clades/lignées) de ce même virus dans des zones géographiques étendues. Il arrive parfois qu'un de ces sérotypes, génotypes ou sous-type viral puisse remplacer les autres et devenir le type viral dominant dans cette région. Cette capacité d'un virus (sérotipe, génotype, clade ou variant) à devenir majoritaire dans la nature est définie comme la fitness épidémiologique (Domingo, 2010; Domingo et al., 2019). Les mécanismes impliqués dans cette fitness sont méconnus et doivent très probablement être influencés par de nombreux paramètres, comme par exemple le statut immunitaire de la population susceptible de l'hôte, la fitness répliquative des variants viraux incriminés chez les différents hôtes, la fitness de transmission de ceux-ci, etc.

Chez les arbovirus, les notions de fitness répliquative et de fitness épidémiologique correspondent aux définitions développées précédemment. Elles peuvent être investiguées par différentes approches (Figure 15). La notion de fitness de transmission est quant à elle plus complexe. En effet, de par leur transmission à deux hôtes différents et l'existence de barrières physiologiques chez le vecteur, la fitness de transmission des arbovirus peut s'appliquer à différents niveaux. Ainsi, en plus de la capacité du virus à être transmis du vecteur à l'hôte vertébré, ou inversement, la fitness de transmission d'un arbovirus peut également se mesurer à une échelle plus fine au sein même du vecteur. La fitness de transmission pourra également être définie par la capacité du virus à franchir les différentes barrières anatomiques que représentent l'épithélium du tube digestif et l'épithélium des glandes salivaires, sous-entendant par la même sa capacité à être transmis à d'autres compartiments du moustique. De la même manière, la transmission verticale des arbovirus

dans le vecteur est un mécanisme proposé de persistance du virus lorsque les conditions sont défavorables au mode de transmission horizontal (de l'hôte vertébré au vecteur, et vice versa) (Lequime & Lambrechts, 2014). Cette transmission du virus par des femelles infectées à leur descendance peut être aussi assimilée à une fitness de transmission (Figure 15). Les travaux présentés dans ce manuscrit aborderont principalement les notions de fitness répliquative et de fitness de transmission, qui se réfèrent dans ce cas à l'aptitude du virus à franchir les différentes barrières physiologiques chez le vecteur *Ae. aegypti*.

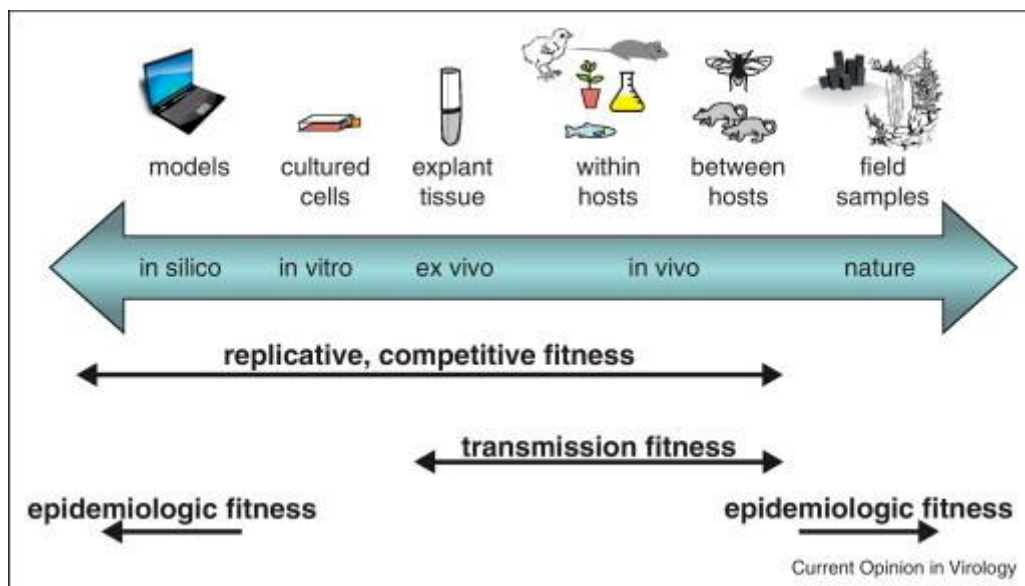


Figure 15. Diversité des systèmes de recherche utilisés pour investiguer les différents aspects de la fitness virale au sens large du terme.

Source : (Wargo & Kurath, 2012)

5.2 CONTRAINTES APPLIQUEES SUR LA TRANSMISSION VIRALE

L'alternance des hôtes obligatoires chez les arbovirus leur impose de nombreuses contraintes évolutives. En effet, les arbovirus doivent être capables de se répliquer dans deux types d'hôtes très différents : un hôte vertébré et un hôte invertébré. Cette capacité des virus à ARN à se répliquer dans deux hôtes très différents est classiquement associée à leur flexibilité génomique et à leur taux élevé de mutations (Weaver, 2006). Toutefois, une adaptation importante du virus à l'un des hôtes peut impacter sa fitness lorsque le virus doit se répliquer dans le second hôte. Les arbovirus doivent donc maintenir un compromis

(« trade-off ») en termes d'adaptation entre ces deux hôtes, ce qui expliquerait leur évolution plus lente comparée à d'autres virus à ARN à transmission directe (Ciota & Kramer, 2010; Coffey et al., 2013; Jenkins et al., 2002). Les nuages de mutants prennent ici toute leur importance en permettant, grâce à leur diversité génétique de grande ampleur, de maintenir des variants viraux bien adaptés aux différents types d'hôtes. En effet, une grande diversité génétique intra-hôte des arbovirus est essentielle pour leur fitness, comme cela a pu être démontré chez les deux types d'hôtes pour le CHIKV (Coffey et al., 2011; Rozen-Gagnon et al., 2014) et le virus du Nil Occidental (Ciota et al., 2012b; Ciota et al., 2007; Jerzak et al., 2007).

Les arbovirus sont également confrontés à des goulots d'étranglement (« bottlenecks ») lors du passage des barrières anatomiques chez le vecteur (Forrester et al., 2014). A titre illustratif, des études ont montré que lors de l'infection de l'épithélium intestinal, un faible nombre de cellules épithéliales étaient initialement infectées par rapport à l'ensemble des cellules le constituant (Franz et al., 2015; Scholle et al., 2004; Smith et al., 2008). Par conséquent, ces goulots d'étranglement provoquent une importante réduction de la taille de la population virale, réduisant également la diversité génétique (Forrester et al., 2012). Les variants viraux minoritaires, c'est-à-dire ceux présents en faible nombre, sont souvent éliminés lorsqu'ils sont soumis à ces goulots d'étranglement génétiques (Domingo & Perales, 2018). Toutefois, les arbovirus compenseraient ces goulots d'étranglement génétiques en régénérant de la diversité génétique lors de leur réplication dans les différents compartiments, ce qui permettrait de maintenir une certaine diversité génétique au cours de la transmission chez le vecteur (Brackney et al., 2011; Coffey et al., 2013; Lequime et al., 2016). Bien que ce niveau global de diversité génétique du virus soit maintenu, le répertoire de variants viraux peut, quant à lui, être significativement modifié (Ciota et al., 2012a; Sim et al., 2015; Stapleford et al., 2014).

A la différence de chez l'hôte vertébré où l'infection virale est spontanément résolutive, une infection virale persistante chez le vecteur est observée (Blair, 2011; Blair et al., 2000; Chen et al., 1994; Juárez-Martínez et al., 2013; Sánchez-Vargas et al., 2009). Cette infection persistante semble être une stratégie de survie du moustique, où le contrôle de la réplication virale est maintenu pour atteindre un équilibre entre le vecteur et le virus (Goic & Saleh, 2012). Les mécanismes impliqués dans l'établissement et le maintien des infections persistantes sont mal connus, mais il semble s'agir d'un processus multifactoriel (Salas-Benito & De Nova-

Ocampo, 2015). L'une des explications serait que les arbovirus établissent un équilibre délicat entre leur cinétique de réplication virale et l'échappement du système immunitaire (O'Neal et al., 2014; Samuel et al., 2018), avec notamment la voie RNAi, et plus précisément l'action des petits ARN interférents, siRNA (« small interfering RNAs »). En effet, des études récentes ont démontré que des ADN dérivés du virus, générés lors d'une infection virale, seraient importants pour la survie des moustiques et la persistance de l'infection (Goic et al., 2016; Poirier et al., 2018). Ces ADN viraux seraient issus de la transcription de génomes viraux défectueux sous l'action de la transcriptase inverse cellulaire de l'hôte. La protéine Dicer-2 est une protéine multifonctionnelle qui régulerait la production de ces ADN viraux par son domaine hélicase DExD/H (Poirier et al., 2018). Les ADN viraux inhiberaient ensuite la réplication virale par le déclenchement d'une réponse antivirale via la voie RNAi en produisant des siRNA. Les ADN viraux paraissent ainsi essentiels à la survie du moustique et à la tolérance de l'infection virale (Goic et al., 2016), d'où leur importance dans la dissémination et la transmission des arbovirus.

OBJECTIFS

L'émergence d'une épidémie de dengue dépend de l'interaction entre trois acteurs : l'hôte, le vecteur et le virus, elle-même sous l'influence de l'environnement (Figure 16). En Nouvelle-Calédonie, la dengue est l'arbovirose la plus répandue avec de nombreuses épidémies recensées depuis la seconde Guerre Mondiale. Cependant, à l'exception de données globales sur la circulation des arbovirus dans la région Pacifique (incluant la Nouvelle-Calédonie) (Cao-Lormeau & Musso, 2014; Roth et al., 2014; Singh et al., 2005) et d'une répartition géographique des vecteurs de la région établie dans les années 1960 (avec une mise à jour partielle depuis cette date) (Belkin, 1962; Guillaumot, 2005; Guillaumot et al., 2012; Roth et al., 2014), peu d'informations étaient disponibles. L'unité de recherche et d'expertise sur la dengue et autres arboviroses (URE-DA) de l'Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie (IPNC) s'est attelée dans un premier temps à caractériser, au niveau moléculaire, les virus ayant circulé ou circulant dans la région, afin de préciser les génotypes de DENV incriminés dans les épidémies (Dupont-Rouzeyrol et al., 2014; Dupont-Rouzeyrol et al., 2015). Dans un second temps, une caractérisation génétique du seul vecteur connu pour la dengue présent en Nouvelle-Calédonie, *Ae. aegypti*, a été effectuée par l'URE-DA, en collaboration avec l'unité de recherche et d'expertise en entomologie médicale (URE-EM, IPNC) (Calvez et al., 2016). Cette étude a permis de mettre en évidence une faible variabilité génétique entre les populations d'*Ae. aegypti* des trois provinces de la Nouvelle-Calédonie. En parallèle, une première évaluation en laboratoire de la compétence vectorielle de ce vecteur a été effectuée pour une souche de DENV-1 génotype I, démontrant que le vecteur calédonien était compétent pour ce sérotype/génotype du DENV (Calvez et al., 2017). Enfin, une étude de séroprévalence portant principalement sur la dengue a été menée en 2013 en partenariat avec les autorités sanitaires de la Nouvelle-Calédonie. Cette étude a montré qu'un peu plus de 50% de la population calédonienne possédait des IgG anti-dengue, attestant d'une importante susceptibilité de la population au DENV (Daures et al., 2014).

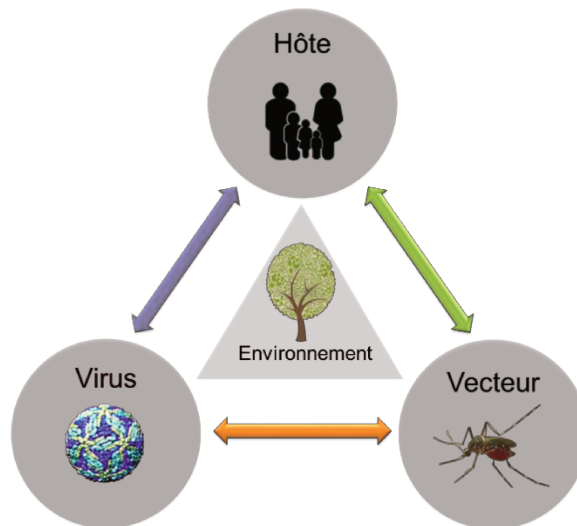


Figure 16. Interaction tripartite pour l'émergence d'une épidémie de dengue sous l'influence de l'environnement.

Source : IPNC

Au cours de ces dernières années, la circulation de la dengue dans la région Pacifique et en Nouvelle-Calédonie s'est considérablement intensifiée avec des épidémies de plus en plus fréquentes, une détection du virus en saison fraîche, une co-circulation de plusieurs sérotypes avec d'autres arbovirus, et une circulation prolongée d'un même sérotype sur plusieurs années. Dans un contexte insulaire comme celui de la Nouvelle-Calédonie, en présence d'un seul vecteur et d'une population partiellement immunisée, une meilleure connaissance des interactions existantes entre le virus et son vecteur dans cet environnement nous semble importante pour mieux comprendre l'épidémiologie de la dengue sur le territoire via une meilleure compréhension des mécanismes d'évolution et de transmission virale. En parallèle, la Nouvelle-Calédonie a rejoint le World Mosquito Program (WMP) en 2018 et les premiers lâchers de moustiques porteurs de la bactérie *Wolbachia* ont débuté au cours du second semestre 2019. La mise en place de la stratégie *Wolbachia* en Nouvelle-Calédonie impactera dans les années à venir le profil épidémiologique des arbovirus en impulsant une modification importante de l'environnement du virus au sein du vecteur et en influençant ces interactions G x G.

Nous avons choisi de centrer ce travail doctoral sur un arbovirus : le DENV, arbovirus qui a majoritairement circulé en Nouvelle-Calédonie et plus précisément par l'étude de la fitness du DENV chez le vecteur calédonien *Ae. aegypti*. Dans un premier temps, **une évaluation de**

la fitness de transmission des quatre sérotypes du DENV chez le vecteur local *Ae. aegypti* a été réalisée grâce à une étude de la compétence vectorielle du vecteur pour les différents sérotypes/génotypes du DENV ayant récemment circulé en Nouvelle-Calédonie. Les résultats issus de cette étude permettront de déterminer si les différences virologiques propres à chaque sérotype/génotype ont eu un impact sur la capacité du vecteur à transmettre ces DENV, en lien avec le profil épidémiologique observé. Dans un second temps, **une évaluation de l'impact de la fitness compétitive de deux génotypes de DENV-1 chez *Ae. aegypti* sur la transmission de la dengue** a été déterminée à l'aide d'une étude de compétition *in vivo*. Cette partie du travail avait pour objectif de savoir si une sélection virale chez le vecteur pourrait résulter d'une meilleur fitness de transmission d'un isolat de DENV par rapport à un autre. Enfin, **une évaluation de l'impact de la bactérie *Wolbachia* introduite dans le vecteur calédonien sur la fitness répllicative et de transmission du DENV** a été mise en œuvre. Ce dernier axe de recherche avait pour objectif de mesurer la compétence vectorielle du vecteur calédonien pour un isolat de DENV-2, ainsi que la fitness répllicative des quatre sérotypes du DENV, sous l'influence d'un nouveau facteur environnemental, représenté par la présence de la bactérie *Wolbachia*. Les résultats de ces travaux sont présentés par le biais d'articles scientifiques. Ils seront par la suite discutés dans un contexte plus général, et leurs perspectives présentées.

PARTIE II : DEMARCHE EXPERIMENTALE



CHAPITRE I : ETUDE DE LA FITNESS DE TRANSMISSION DES QUATRE SEROTYPES DU VIRUS DE LA DENGUE CHEZ LE VECTEUR *Ae. AEGYPTI*

1.1 CONTEXTE ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

La dengue est l'arbovirose la plus fréquente en Nouvelle-Calédonie, avec des épidémies recensées depuis la seconde guerre mondiale. Depuis 2008, la dynamique du DENV a évolué, avec la persistance inhabituelle du DENV-1, malgré l'introduction et la circulation locale de DENV-4 et de DENV-3 en 2009 et 2014 respectivement. Ces deux sérotypes de DENV n'ayant pas circulé en Nouvelle-Calédonie depuis plus de 18 ans, l'absence de remplacement du DENV-1 par ceux-ci est surprenant face à une population humaine tout aussi naïve (Dupont-Rouzeyrol et al., 2014; Inizan et al., 2019). Le vecteur de la dengue en Nouvelle-Calédonie, *Ae. aegypti*, a montré une faible différenciation génétique au sein de ses populations à l'échelle de la Nouvelle-Calédonie (Calvez et al., 2016). Cette faible variabilité génétique du vecteur n'impacterait pas l'issue de la compétence vectorielle comme cela a été précédemment démontré avec une souche virale de DENV-1 génotype I (Calvez et al., 2017). Ainsi la récente circulation prolongée du DENV-1 pourrait s'expliquer par des différences de compétence vectorielle en fonction du sérotype de DENV circulant. L'objectif de cette première partie de mes travaux de doctorat est donc d'évaluer, pour la première fois, la transmission des quatre sérotypes du DENV chez le vecteur calédonien, *Ae. aegypti*, via la mesure de sa compétence vectorielle pour chacun d'entre eux.

Pour déterminer la fitness de transmission de chaque sérotype de DENV chez *Ae. aegypti*, une souche virale représentative de chacun des quatre sérotypes de DENV (et des deux génotypes de DENV-1) ayant récemment circulé en Nouvelle-Calédonie a été sélectionnée comme suit : DENV-1 génotype IV de 2003 (Genbank MN539020), DENV-1 génotype I de 2016 (Genbank MN539019), DENV-2 de 1998 (Genbank MN539021), DENV-3 de 2014 (Genbank MN539022) et DENV-4 de 2009 (Genbank MN539023). Des femelles d'une même population d'*Ae. aegypti*, de la première génération de laboratoire F1, ont été artificiellement infectées par voie orale avec une suspension virale d'un de ces cinq DENV à un titre viral final de 1×10^7 FFU/mL. Les femelles pleinement gorgées ont été conservées à 28°C et 80% d'humidité sous

un cycle jour/nuit de 12h :12h avec un accès illimité à une solution sucrée à 10%. A 7 et 14 jours post-repas infectieux, une trentaine d'individus a été sacrifiée après la récolte des salives par salivation forcée. Les corps, les têtes et les salives de chaque individu ont été individuellement analysés par immunofluorescence après inoculation sur cellules C6/36 afin de déterminer la présence de particules virales infectantes et de les quantifier le cas échéant. Le taux d'infection correspond au nombre de corps infectés par le DENV par rapport à l'ensemble des moustiques analysés. Le taux de dissémination correspond au nombre de tête présentant une infection par le DENV par rapport au nombre de corps infectés. L'efficacité de transmission correspond quant à elle au nombre de salives dans lesquelles des particules virales du DENV ont été détectées par rapport à l'ensemble des moustiques analysés. Cette expérience a été réalisée de manière indépendante deux fois afin de tester la reproductibilité des résultats obtenus.

Ce travail a été financé par un projet interne à l'IPNC, projet que j'ai conçu et entièrement déployé expérimentalement. J'ai ensuite rédigé la version initiale du manuscrit et mis en œuvre sa soumission et les révisions attenantes.

1.2 RESULTATS ET CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude ont fait l'objet d'une publication dans le journal « PLOS Neglected Tropical Diseases » : **Vector competence of *Aedes aegypti* from New Caledonia for the four recent circulating dengue virus serotypes** (O'Connor et al., 2020).

Les résultats des deux expériences indépendantes n'ont montré aucune différence significative, nous permettant de conclure que ces derniers étaient reproductibles et qu'une analyse globale de ceux-ci pouvait en être réalisée. Ainsi, il a été démontré que les quatre sérotypes du DENV sont capables d'infecter la population calédonienne d'*Ae. aegypti*, avec des taux d'infection compris entre 18% et 58%. Aucune différence n'a été mise en évidence quant à leur capacité respective à infecter le moustique, à l'exception du DENV-4 qui présentait un taux d'infection plus faible que les autres DENV à 14 jours post-repas infectieux. Les taux de dissémination observés (43% à 100%) ont montré que les quatre sérotypes du DENV étaient capables de franchir la barrière intestinale du moustique. Le DENV-1 génotype I a notamment montré un taux de dissémination plus élevé que le DENV-1 génotype IV et que

le DENV-4 à 7 jours post-repas infectieux. L'analyse des salives a mis en évidence des efficacités de transmission n'excédant pas 21%. Bien que le DENV-1 génotype I présentait une efficacité de transmission plus élevée, seule une différence de transmission en ce sens a été observée entre le DENV-1 génotype I et le DENV-3.

L'analyse quantitative des différents compartiments du moustique (corps, tête et salive) a mis en évidence des différences entre les sérotypes de DENV en termes de quantité de particules infectieuses détectées au niveau du corps et de la tête. Globalement, les moustiques infectés par le DENV-1 (quel que soit le génotype testé) présentaient une charge virale plus faible par rapport aux moustiques infectés par les autres sérotypes du DENV. Cependant, au niveau des salives, les quantités de particules virales infectieuses détectées ne semblaient pas être différentes entre les différents sérotypes du DENV, bien que le faible nombre de salives positives au DENV ne nous ait pas permis de le confirmer.

Cette étude confirme pour la première fois expérimentalement la capacité du vecteur calédonien *Ae. aegypti* à transmettre les quatre sérotypes du DENV et, par la même, son rôle dans la survenue et la transmission du DENV en Nouvelle-Calédonie. L'importance du génotype viral a pu être explorée dans cette interaction G x G au sein d'un environnement contrôlé. Les résultats indiquent une fitness de transmission plus faible du DENV-4 lors de sa transmission au vecteur, ce qui pourrait peut-être en partie expliquer la rareté des épidémies dues à ce sérotype. Toutefois, au sein même du vecteur et lors de la transmission potentielle à l'hôte humain, le DENV-1 génotype I aurait tendance à avoir une meilleure fitness de transmission. La fitness répliquative du DENV-1 (génotype I et génotype IV confondus) serait à contrario plus faible que celle des autres sérotypes du DENV lors des étapes d'infection et de dissémination chez le vecteur. Ces résultats suggèrent des différences de fitness de transmission entre les sérotypes du DENV, et également entre les génotypes I et IV du DENV-1. Des études de compétition entre les différents DENV seraient nécessaires pour affiner l'évaluation de la fitness de transmission de ceux-ci, comme cela a pu être démontré dans de précédentes études (Vazeille et al., 2016). Toutefois, les conditions expérimentales appliquées dans ce type d'étude ne donnent qu'une approximation de ce qu'il se passe réellement dans la nature. En effet, d'autres facteurs (comme la température, la virémie chez l'hôte humain, ou encore le comportement alimentaire d'*Ae. aegypti*) peuvent influencer l'issue de ces interactions G x G (Armstrong et al., 2020; Carrington et al., 2013a; Duong et al., 2015; Gloria-

Soria et al., 2017). De même, les facteurs influençant la capacité vectorielle (comme la densité de vecteur) sont à prendre en compte car ceux-ci influencent également l'émergence d'une épidémie. Cette étude souligne l'importance d'approfondir les recherches sur les interactions virus-vecteur en essayant de prendre en compte ces différents facteurs propres à chaque zone géographique.

1.3 PUBLICATION 1

RESEARCH ARTICLE

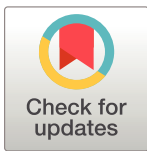
Vector competence of *Aedes aegypti* from New Caledonia for the four recent circulating dengue virus serotypes

Olivia O'Connor^{1*}, Elodie Calvez^{1‡}, Catherine Inizan¹, Nicolas Pocquet², Vincent Richard³, Myrielle Dupont-Rouzeyrol¹

1 Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE Dengue et Arboviroses, Institut Pasteur International Network, Noumea, New Caledonia, **2** Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, URE Entomologie Médicale, Institut Pasteur International Network, Noumea, New Caledonia, **3** Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Direction, Institut Pasteur International Network, Noumea, New Caledonia

‡ Current address: Arbovirus & Emerging viral diseases laboratory, Institut Pasteur du Laos, Institut Pasteur International Network, Vientiane, Lao PDR

* ooconnor@pasteur.nc



OPEN ACCESS

Citation: O'Connor O, Calvez E, Inizan C, Pocquet N, Richard V, Dupont-Rouzeyrol M (2020) Vector competence of *Aedes aegypti* from New Caledonia for the four recent circulating dengue virus serotypes. PLoS Negl Trop Dis 14(5): e0008303. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008303>

Editor: Duane J. Gubler, Duke-NUS GMS, SINGAPORE

Received: November 5, 2019

Accepted: April 17, 2020

Published: May 14, 2020

Copyright: © 2020 O'Connor et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: All DENV sequences files are available from the GenBank database (accession numbers MN539019 - MN539023). All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

Funding: This work was funded by the Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Abstract

In New Caledonia (NC), *Aedes aegypti* is the only proven vector of dengue virus (DENV), which is the most prevalent arbovirose in NC. Since World War II, the four DENV serotypes have circulated regularly in NC. The epidemiological profile, however, has evolved over the last ten years, with the persistence of DENV-1 circulation and the co-circulation of several DENV serotypes. The current study evaluated the ability of *Ae. aegypti* from NC to transmit four DENV serotypes (and two DENV-1 genotypes) isolated during recent outbreaks in NC. An *Ae. aegypti* F1 generation was twice independently orally challenged with each DENV strain (10^7 FFU/ml). Infection, dissemination and transmission rates and transmission efficiency were measured at day 7 and 14 post-exposure, as well as the quantity of infectious virus particles. Mosquito infection was observed as early as 7 days post-infection. Infection rates between 18 and 58% were measured for all DENV serotypes/genotypes tested. Although dissemination rates ranged from 78 to 100%, transmission efficiencies were low, with values not exceeding 21% at 14 days post-infection for all DENV strains. This study shows that NC *Ae. aegypti* are moderately competent for DENV in laboratory conditions. In link with epidemiological data, these results suggest implication of other factors in the sustained circulation of DENV-1 in New Caledonia.

Author summary

Aedes aegypti is the only known vector for dengue virus (DENV) in New Caledonia (NC). DENV are divided into four serotypes (DENV-1 to -4), based on their antigenic properties, these being subdivided into different genotypes. All four DENV serotypes have regularly circulated in New Caledonia in the past. An unusual persistence of DENV-1 has been observed during the last ten years, suggesting a possible preferential transmission of this DENV serotype by *Ae. aegypti*. In this study, we examine for the first time the ability of

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

Ae. aegypti from New Caledonia to transmit the four circulating DENV serotypes, and more precisely two genotypes of DENV-1. Our results demonstrate that this vector is moderately competent for DENV, with slight differences observed between DENV serotype/genotype in terms of transmission. These findings suggest that other factors are at play in the sustained circulation of DENV-1 and that further vector-virus interactions studies should be undertaken to better understand the DENV epidemiological profile in NC.

Introduction

Dengue fever is a worldwide public health concern, with approximately 390 million persons affected each year and 4 billion considered at risk [1]. A broad spectrum of clinical manifestations can be encountered, usually ranging from unapparent infections to mild-febrile illness. Severe forms of dengue, however, can occur with hemorrhagic manifestations, sometimes with a fatal outcome [2]. No specific antiviral treatment is available and dengue vaccines still need improvement [3].

Dengue virus (DENV) is a positive-sense single-stranded RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family. Four serotypes (DENV-1 to -4) can be antigenically distinguished. Infection by one serotype does not confer prolonged immunity against the others [4]. Like many RNA viruses, dengue viruses exhibit an extensive genetic diversity which makes it possible to identify distinct genotypes within each serotype [5]. DENV are transmitted to humans by the bite of infected *Aedes* mosquitoes, such as *Aedes aegypti* which is the most common vector, or, to a lesser extent, *Aedes albopictus* [6].

New Caledonia (NC) is an island territory located in the southwest Pacific Ocean, 1,210 km east of Australia. Its climate is subtropical with two-marked seasons: hot and rainy (December to May) and cold and dry, with temperature ranging from 18°C to 35°C. As many other Pacific Island Countries and Territories (PICTs), NC has regularly experienced DENV epidemics since World War II [7, 8]. Before 2000, epidemics occurred approximately every five years and outbreaks were due to a single DENV serotype/genotype, which was replaced by another one during the next epidemic. This DENV epidemiological profile, however, has changed over the last fifteen years. Indeed, we observed an unusual persistence of DENV-1, with the co-circulation of other DENV serotypes and/or other arboviruses such as Zika virus or chikungunya virus [9]. Interestingly, in 2012, DENV-1 genotype I “Asia” was introduced in NC and replaced the previous circulating DENV-1 genotype IV “Pacific” within six months [10]. This genotypic displacement led to a major outbreak in 2013 and possibly contributed to the uninterrupted circulation of DENV-1 until 2018 [9]. Thus, all four serotypes have circulated in NC in recent years: DENV-1 between 2002 and 2018; DENV-2 in 1997–1998 and 2017–2019; DENV-3 in 2014 and 2017; and DENV-4 in 2008–2009 [9].

Although many *Aedes* species are vectors of DENV in the Pacific region [11], the only known DENV vector in NC to date is *Ae. aegypti*. A previous study of NC *Ae. Aegypti* showed that the populations of the main island are genetically homogeneous [12]. This characterization of *Ae. aegypti* populations is important as mosquito genetic factors may influence their competence for arboviruses [13]. Previous work demonstrated the ability of *Ae. aegypti* from NC to transmit chikungunya or Zika viruses [14, 15]. Few data, however, are available regarding DENV and this vector’s capacity to transmit DENV in NC has not yet been investigated except for DENV-1 genotype I “Asia” [16].

The aim of this study was to evaluate the capacity of *Ae. aegypti* from NC to transmit the four serotypes of DENV. One DENV strain representative of each serotype/genotype isolated in NC during the recent outbreaks was selected as follows: DENV-1 genotype I "Asia" in 2016; DENV-1 genotype IV "Pacific" in 2003; DENV-2 genotype Cosmopolitan in 1998, DENV-3 genotype I in 2014 and DENV-4 genotype IIa in 2009.

Methods

Ethic statements

Viruses used in this study were obtained from sera from anonymized patients who were not opposed to the secondary use of their biological sample. According to New Caledonia regulations on animal care, all the experiments performed on animals were carried out following deliberation n°79 of 29/01/1989 relating to the practice of veterinary surgery.

Virus stock production

As part of the molecular characterization of DENV strains circulating in the south Pacific region, the envelope gene sequences of DENV strains from 1997 to 2016 were obtained as described elsewhere [10, 17, 18]. One epidemic viral strain of each DENV serotype/genotype, selected from 1997 to 2016 during NC outbreaks, was isolated from human serum after no more than three passages in C6/36 cells line (Table 1). Briefly, 50 µl of serum (or viral suspension) diluted in Leibovitz medium (Sigma-Aldrich), supplemented with 2% of fetal bovine serum (FBS, Gibco, ThermoFisher Scientific) and 10% of tryptose phosphate broth (Gibco, ThermoFisher Scientific) were inoculated onto a monolayer C6/36 cells. After 2 hours, the inoculum was removed and fresh media was added to the flask. The flask was then incubated for 5 days at 28°C.

Virus titration

Viral titer of each virus was determined by immuno-fluorescent focus assay. This was repeated independently three times. A ten-fold dilution of the viral suspension was inoculated onto C6/36 cells in a 96-well plate. After one hour of incubation at 28°C, an overlay consisting of 1:1 Leibovitz medium supplemented with 10% of FBS and 3.2% of carboxyl methylcellulose (Sigma-Aldrich) was added. The plate was then incubated for 5 days at 28°C. Cells were fixed with 4% formaldehyde (Pierce, ThermoFisher Scientific) at room temperature (RT) for 20 min. After a first incubation with phosphate-buffered saline (PBS, Pan Biotech, Dutscher) 0.5% Triton X-100 (Biorad) for 10 minutes at RT, cells were washed three times with PBS and then incubated with flavivirus-specific monoclonal antibody 4G2 (hybridoma D1-4G2-4-15) for one hour at 37°C. After washing, cells were incubated for one hour at 37°C with Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, ThermoFisher Scientific) at a 1:1000 dilution in PBS supplemented with 5% FBS. Foci were counted under a fluorescent microscope (Leica)

Table 1. Dengue virus strains used in this study.

DENV	Year of collection	Serotype	Genotype	GenBank accession number
DENV-1 genotype I "Asia"	2016	DENV-1	I "Asia"	MN539019
DENV-1 genotype IV "Pacific"	2003	DENV-1	IV "Pacific"	MN539020
DENV-2	1998	DENV-2	Cosmopolitan	MN539021
DENV-3	2014	DENV-3	I	MN539022
DENV-4	2009	DENV-4	IIa	MN539023

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008303.t001>

and the quantity of virus obtained was expressed as Focus Forming Unit per milliliter (FFU/mL).

Mosquito collection

Immature *Ae. aegypti* (larvae and pupae) were collected in Noumea in November 2016. Larvae and pupae were reared to adult forms which were maintained at $28 \pm 1^\circ\text{C}$, $80 \pm 10\%$ relative humidity and 12:12h light:dark cycle, with access to 10% sucrose solution *ad libitum*. F1 generation was produced by sib-mating and collective oviposition following blood feeding.

Oral challenge

The same population of mosquitoes was experimentally infected twice to evaluate the reproducibility of the results. Five- to seven day-old nulliparous *Ae. aegypti* F1 females were challenged with infectious blood-meals containing each of the different DENV serotype/genotype. Briefly, mosquitoes were allowed to feed for 20 min through a pig intestine membrane covering the base of a Hemotek system feeder containing the blood-virus mixture maintained at 37°C . The infectious blood meal consisted of a mix (2:1) of washed rabbit erythrocytes and viral suspension at 3×10^7 FFU/mL (final concentration at 10^7 FFU/mL). An adenosine triphosphate phagostimulant (Sigma-Aldrich), was added at a final concentration of 5mM. Fully engorged females were transferred into cardboard containers and maintained with 10% sucrose solution at $28 \pm 1^\circ\text{C}$, 80% relative humidity and 12:12h light:dark cycle.

Vector competence studies

At 7 and 14 days post-infection (dpi), a maximum of 30 *Ae. aegypti* females were randomly collected and chilled. The wings and legs of each were removed and the proboscis was inserted into a 20 μL filter tip filled with 5 μL of FBS. After 30 min, medium containing the saliva was added to 45 μL of Leibovitz medium and stored at -80°C . Whole mosquito carcasses were also stored at -80°C before processing. After removing the head, the body and the head of each mosquito was mechanically ground separately for 30 seconds at 6,000 rpm with metal beads in 350 μL of Leibovitz medium supplemented with 2% FBS, 10% tryptose phosphate broth and antibiotics/antifungals (100 units/mL of penicillin, 0.1 mg/mL of streptomycin and 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ amphotericin B, Gibco, ThermoFisher Scientific). The resulting homogenates were then centrifuged at 10,000 g for 5 min. The detection of viral particles in each homogenates or saliva sample was performed by virus titration as described above. The infection rate corresponds to the proportion of mosquitoes with infected body among all tested mosquitoes. The dissemination rate is the proportion of mosquitoes with infectious head among infected mosquitoes. The transmission rate is the proportion of mosquitoes with infectious viral particles in saliva among mosquitoes with infectious head, whereas transmission efficiency is the proportion of mosquitoes with virus in saliva among all tested mosquitoes.

Statistical analysis

Two replicate experiments were performed with the same population of mosquitoes and the same DENV strains. All percentages used for the comparison of the two experiments and the determination of the different rates and efficiency were statistically compared by Fisher's exact test. Quantitative data corresponding to virus titers obtained from positive mosquitoes were statistically compared by two-sample Wilcoxon test. To narrow down the risk estimations of the simple dichotomous-outcome analysis, multivariate analysis for the different rates and efficiency were performed using logistic regression modeling (log-linear model): the dependent

variable was the outcome expressed in two categories for each mosquito (presence or absence of virus), the independent variables were “days post-infection” (with 7 dpi as reference) and the DENV strains. All tests were performed using R software, considering p -values < 0.05 as significant [19].

Results

Reproducibility of the experiments

Two separate experiments were carried out under the same experimental conditions. In both cases, all DENV strains were able to infect mosquitoes, disseminate and be transmitted. No significant difference was found in rates obtained from these two independent vector competence experiments (Fisher’s exact test: p -values > 0.05) (Table 2). Consequently, both datasets were pooled for further global analysis as described hereafter.

Infection rate

Infection rates at 7 dpi ranged from 18% to 40% for the four DENV serotypes, with no significant difference (Fig 1A; S1 Table). At 14 dpi, infections rates ranged from 20% to 58%, with a significant lower infection rate for the DENV-4 strain compared to the others DENV (Fisher’s exact test: p -values = 0.03, < 0.001 , = 0.02 and < 0.001 , respectively for DENV-1 genotype I “Asia”, DENV-1 genotype IV “Pacific”, DENV-2 and DENV-3; Fig 1A). Results obtained from the log-linear model (S2 Table) showed that the infection rate was significantly higher at 14 dpi (OR = 2.04, 95%CI: 1.37–3.04). Infection rate was also significantly higher for DENV-1 genotype IV “Pacific” compared to DENV-4 as reference, after considering results of the univariate analysis (OR = 2.88, 95%CI: 1.53–5.4).

Dissemination rate

At 7 dpi, dissemination rates ranged from 43% (DENV-3 and DENV-4) to 90% (DENV-1 genotype I “Asia”; Fig 1B). The dissemination rate for DENV-1 genotype I “Asia” was significantly higher compared to DENV-1 genotype IV “Pacific” and DENV-4 (Fisher’s exact test: p -values = 0.01 and 0.03 respectively). At 14 dpi, the dissemination rates ranged from 78% to 100% (Fig 1B), with no significant differences between viruses. Results obtained from the log-linear model (S2 Table) showed that dissemination rate was significantly higher at 14 dpi (OR = 9.98, 95%CI: 4.09–24.34). Dissemination rate was also significantly higher for DENV-1 genotype I “Asia” compared to DENV-4 as reference, considering results of the univariate analysis (OR = 18.45, 95%CI: 1.97–172.81).

Transmission rate

Transmission rates at 7 dpi ranged from 0% (DENV-2 and DENV-3) to 33%, with no significant differences shown between the viruses (Fig 1C). At 14 dpi, transmission rates ranged from 14% to 50%, with a significant lower transmission rate for DENV-3 compared to DENV-1 genotype I “Asia” (Fisher’s exact test: p -values = 0.02; Fig 1C). Results obtained from the log-linear model (S2 Table) showed that the transmission rate was statistically higher at 14 dpi (OR = 3.57, 95%CI: 1.18–10.82). Transmission rates were also significantly higher for DENV-1 genotype I “Asia” and DENV-4 compared to DENV-3 as reference, considering results of the univariate analysis (OR = 6.67, 95%CI: 1.57–28.42 and OR = 7.1, 95%CI: 1.27–39.79 respectively).

Table 2. Infection, dissemination and transmission rates obtained for the two independent experiments (a and b) at 7 and 14 days post-infection (dpi) according to the four dengue serotypes.

DENV strains	Experiment	Days post-infection (dpi)	Number of individuals	% of infection	<i>p</i> -value* for infection	% of dissemination	<i>p</i> -value* for dissemination	% of transmission	<i>p</i> -value* for transmission
DENV-1 genotype I "Asia"	a	7	15	33 (5/15)	0.26	100 (5/5)	0.14	20 (1/5)	0.99
DENV-1 genotype I "Asia"	b	7	30	17 (5/30)		80 (4/5)		25 (1/4)	
DENV-1 genotype IV "Pacific"	a	7	18	39 (7/18)	0.99	29 (2/7)	0.70	0 (0/2)	0.99
DENV-1 genotype IV "Pacific"	b	7	30	40 (12/30)		42 (5/12)		20 (1/5)	
DENV-2	a	7	12	42 (5/12)	0.27	60 (3/5)	0.39	0 (0/3)	NA
DENV-2	b	7	30	23 (7/30)		57 (4/7)		0 (0/4)	
DENV-3	a	7	8	13 (1/8)	0.99	0 (0/8)	0.99	0 (0/0)	NA
DENV-3	b	7	30	20 (6/30)		50 (3/6)		0 (0/3)	
DENV-4	a	7	15	47 (7/15)	0.17	43 (3/7)	0.38	33 (1/3)	0.99
DENV-4	b	7	30	23 (7/30)		43 (3/7)		33 (1/3)	
DENV-1 genotype I "Asia"	a	14	18	33 (6/18)	0.55	100 (6/6)	0.55	67 (4/6)	0.99
DENV-1 genotype I "Asia"	b	14	30	47 (14/30)		100 (14/14)		43 (6/14)	
DENV-1 genotype IV "Pacific"	a	14	18	67 (12/18)	0.55	100 (12/12)	0.24	33 (4/12)	0.18
DENV-1 genotype IV "Pacific"	b	14	30	53 (16/30)		88 (14/16)		14 (2/14)	
DENV-2	a	14	21	52 (11/21)	0.39	100 (11/11)	0.15	36 (4/11)	0.70
DENV-2	b	14	30	37 (11/30)		82 (9/11)		44 (4/9)	
DENV-3	a	14	16	63 (10/16)	0.76	80 (8/10)	0.99	25 (2/8)	0.28
DENV-3	b	14	29	55 (16/29)		88 (14/16)		7 (1/14)	
DENV-4	a	14	15	27 (4/15)	0.45	50 (2/4)	0.99	100 (2/2)	0.25
DENV-4	b	14	30	17 (5/30)		100 (5/5)		20 (1/5)	

NA: Not Achievable / *: Value obtained when data of the two experiments were statistically compared

Infection (number of infected bodies / number of mosquitoes tested)

Dissemination (number of infected heads / number of infected bodies)

Transmission (number of infected saliva / number of infected heads)

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008303.t002>

Transmission efficiency

No significant difference was found between DENV transmission efficiencies (Fisher’s exact test: *p*-values > 0.05; Fig 1D). The efficiency of transmission for all the DENV strains at 7 dpi did not exceed 4%, with no viral transmission observed for DENV-2 and DENV-3 infected mosquitoes. At 14 dpi, transmission efficiencies were observed for all four DENV serotypes, ranging from 7% to 21%, with the higher transmission efficiency observed for DENV-1 genotype I “Asia” infected mosquitoes. However, no significant difference was found (Fisher’s exact test: *p*-values > 0.05). Results obtained from the log-linear model (S2 Table) showed that the transmission efficiency was statistically higher at 14 dpi (OR = 6.34, 95%CI: 2.40–16.7).

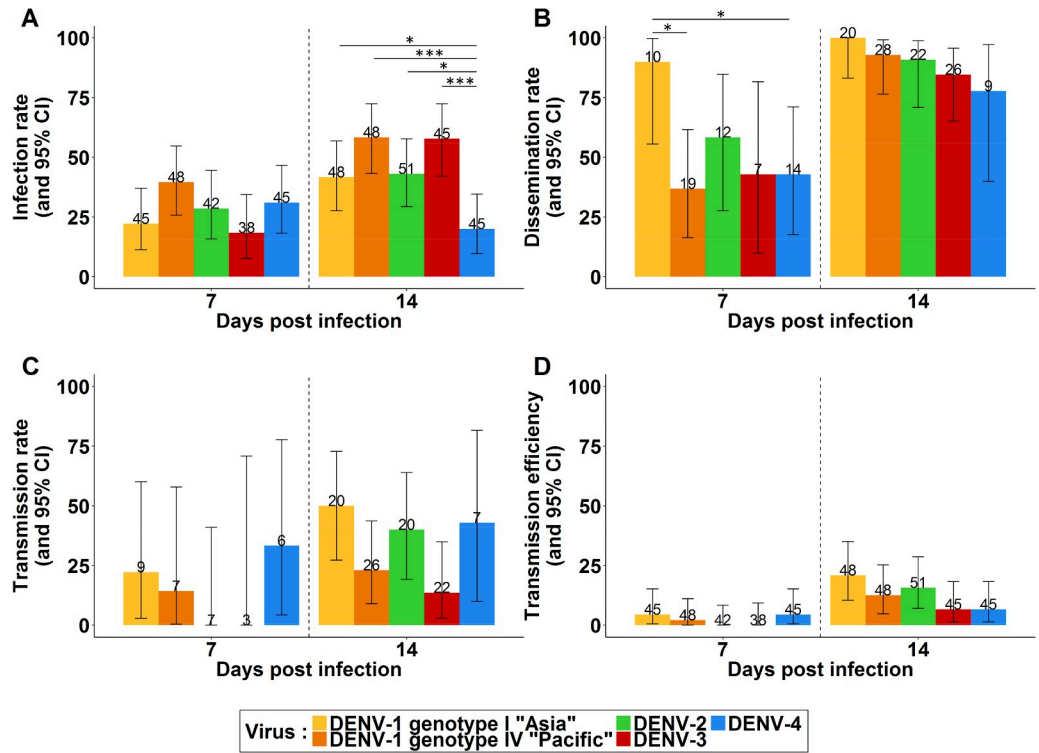


Fig 1. Vector competence results for *Aedes aegypti* from New Caledonia orally infected with different DENV serotype/genotype. (A) Infection rate, (B) dissemination rate, (C) transmission rate, and (D) transmission efficiency at 7 and 14 days post-infection. Error bars represent 95% confidence intervals. The number of mosquitoes tested is indicated in brackets above each bar plot. Significant differences are indicated by asterisks (Fisher’s Exact test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008303.g001>

Transmission efficiency was also significantly higher for DENV-1 genotype I “Asia” compared to DENV-3 as reference, considering results of the univariate analysis (OR = 4.33, 95%CI: 1.15–16.2).

Quantity of infectious viral particles among positive mosquitoes at 14 dpi

The quantity of infectious viral particles was determined for each positive mosquito at 14 dpi in parallel with the different vector competence indices (Fig 2; S3 Table). Regarding infection status, the medians of viral titer per positive bodies at 14 dpi ranged from 1.25×10^3 to 1.22×10^5 FFU/mL/body (Fig 2A). Mosquitoes infected with DENV-1 had a significantly lower quantity of infectious viral particles in their bodies compared to the other DENV (two-sample Wilcoxon test: p -value < 0.001 , < 0.001 , $= 0.01$ and < 0.001 , < 0.001 , $= 0.002$ respectively for DENV-1 genotype I “Asia” and DENV-1 genotype IV “Pacific” compared to DENV-2, DENV-3 and DENV-4). The median viral titers obtained for DENV-2 infected mosquitoes was significantly higher than that obtained from DENV-3 infected mosquitoes (two-sample Wilcoxon test: p -value = 0.01).

Regarding dissemination status, the medians of viral titers per head ranged from 3.7×10^2 to 1.70×10^4 FFU/mL/head (Fig 2B). The quantity of infectious viral particles in the heads was significantly higher for DENV-2 compared to DENV-1 genotype I “Asia”, DENV-1 genotype IV “Pacific” and DENV-3 (two-sample Wilcoxon test: p -value = 0.04, < 0.001 and = 0.02 respectively). DENV-1 genotype IV “Pacific” infected mosquitoes had a significantly lower viral titer

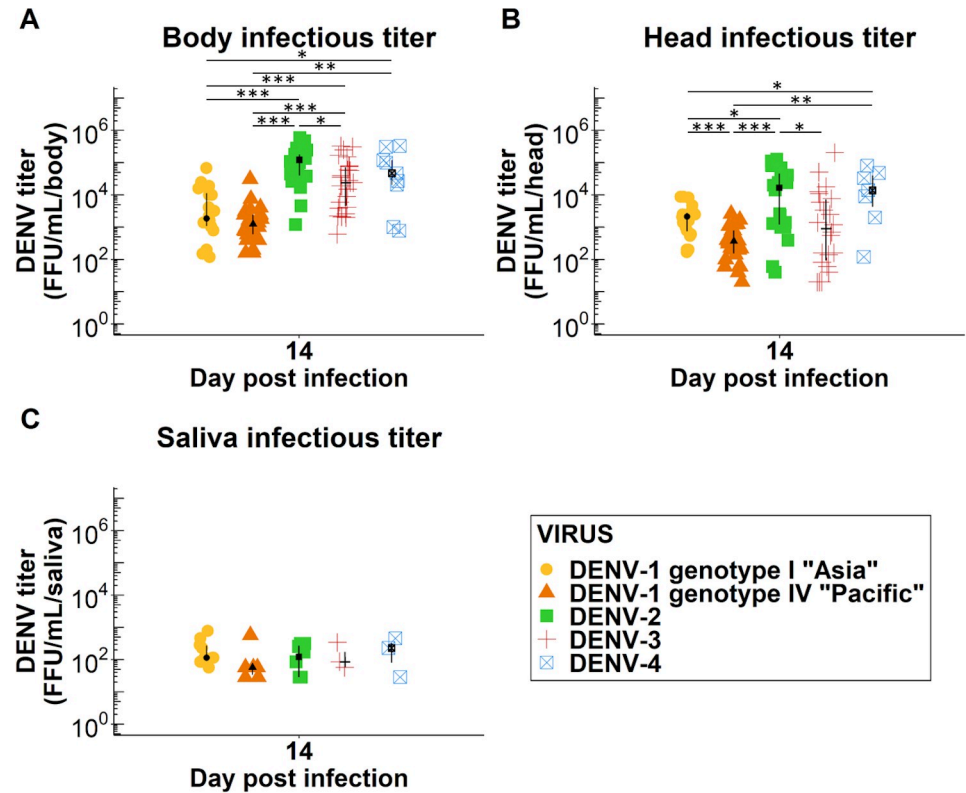


Fig 2. Viral titers obtained from positive bodies, heads and saliva according to the DENV serotype/genotype strain. (A) Body infection titer, (B) head infection titer and (C) saliva infection titer at 14 days post-infection. Median and interquartile range are shown for each viral strain. Significant differences are indicated by asterisks (Two-sample Wilcoxon test; * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008303.g002>

in their heads compared to DENV-1 genotype I “Asia” and DENV-4 (two-sample Wilcoxon test: p -value < 0.001 and $= 0.002$ respectively). The quantity of DENV-4 infectious viral particles per heads was significantly higher than that obtained for DENV-1 genotype I “Asia” (two-sample Wilcoxon test: p -value $= 0.03$).

Regarding the transmission—the key aspect of the virus cycle in the vector—the viral titers medians ranged from 57 to 229 FFU/mL/saliva at 14 dpi (Fig 2C). No statistical analyses were performed due to the small number of saliva analyzed.

Discussion

Since 2008, DENV circulation has increased in NC and caused recurrent outbreaks with cases detected every year. DENV-1 has been the major circulating serotype in NC until 2017, co-circulating with DENV-4 in 2009, DENV-3 in 2014, DENV-2 and -3 in 2017 and DENV-2 in 2018 [8–10]. This epidemiological profile with the prolonged circulation of DENV-1 during 15 years was particularly unusual for NC [9]. In this context, our study aimed to evaluate the ability of *Ae. aegypti* population from NC to transmit the four circulating DENV serotypes and two genotypes of DENV-1. Vector competence is defined as the ability of a mosquito to be infected, to disseminate and finally to be able to transmit a given virus [20]. It is based on a close interaction between the virus and the vector, which can lead to different outcomes depending on the fitness of both at the time of the experiment. To remove this bias, we performed two replicates experiments whose results were not significantly different. This

observation, combined with the fact that the results obtained for DENV-1 genotype I “Asia” infected mosquitoes are equivalent to those obtained in our previous study [16], gives reliability to our results. NC *Ae. aegypti* is a competent vector for dengue viruses, with the detection of infectious virus in saliva from 7 dpi for three out of five DENV strains.

All four DENV serotypes can infect NC *Ae. aegypti* from 7 dpi. Infection rates of mosquitoes do not differ by DENV strain, except for DENV-4 which has a lower infection rate. Overall, infection rates were moderate (50–60%), suggesting the possible existence of a midgut infection barrier that impedes viral infection of mesenteric epithelial cells [21]. The dissemination rates, however, were around 50% at 7 dpi and 80–100% at 14 dpi, suggesting a weak midgut escape barrier, if any. Despite this dissemination, the transmission rates did not exceed 50% whichever the dpi, suggesting the presence of a salivary glands barrier. Our experimental design does not allow us to specify whether this barrier occurs at the entry in and/or escape from the salivary glands. Overall, the transmission efficiencies were low with no differences observed between DENV strains in pairwise comparison. These results, however, need to be modulated in view of the results obtained with the log-linear model which revealed that DENV-1 genotype I “Asia” would have a slightly higher transmission risk compared to DENV-3. In addition to these observations, infectious viral titers obtained from the infection and dissemination indices at 14 dpi showed differences between the DENV serotypes, with a tendency towards lower infectious viral titers for DENV-1. These differences do not seem to have an impact on transmission efficiencies: although the low number of positive saliva samples did not allow us to verify this fact statistically, viral titers in saliva seemed similar between all the DENV strains tested. We can suppose that this may be the result of a discontinuous release of virions in the saliva as it was shown that salivary glands are a site for replication and accumulation of DENV [22].

Vector competence studies have been performed in other countries [23] with varying results due in part to the non standardization of protocols, making their comparison difficult. Field *Ae. aegypti* populations were mainly used in these studies, but the DENV strains used were mostly old strains, with an overrepresentation of DENV-2 strains [23–25]. Nevertheless, the infection rates of NC *Ae. aegypti* we report here are lower compared to those reported in studies in Africa [24, 26], in South East Asia [27] or in the Caribbean [28], suggesting that NC *Ae. aegypti* are less susceptible to DENV infection. Many intrinsic and extrinsic factors [13] are involved in the modulation of *Ae. aegypti* vector competence, as early at the midgut infection phase. Indeed, genetic variants from both *Ae. aegypti* population and the virus can play a role in vector competence, whereby the outcome of the infection depends on the specific combination of mosquito and virus genotypes [29, 30]. The susceptibility of mosquitoes to infection can also be influenced by the insect microbiome [31, 32] and the microbiota interplays in the activation of mosquito immune responses. Although we evidenced moderate infection rates, the dissemination and the transmission rates are similar to those found in the different studies. The extrinsic incubation period for *Ae. aegypti* from NC, however, seems to be shorter, with transmission observed from 7 dpi for DENV-1 and DENV-4.

Vector competence experiments in the laboratory measure the ability of mosquitoes to transmit arboviruses. However, the experimental conditions applied in this type of experiment are only an approximation of what happens in nature. In our experimental conditions, a slightly difference was observed in terms of transmission efficiency between DENV-1 genotype I “Asia” and DENV-3. Several factors, however, need to be considered. Indeed, only a single DENV strain per serotype/genotype was tested, which constitutes a bias of our experimental design considering the diversity of DENV serotype/genotype strains which circulate during an outbreak. Furthermore, the extrinsic incubation temperature may have an impact on the infection of the mosquito [33, 34] and on the transmission of arboviruses [35, 36]. Moreover, the

infectious viral dose initially present in the blood meal may also affect the infection rate of *Ae. Aegypti* [37]. Yet another parameter to take into account is the natural multiple blood feeding behavior of *Ae. aegypti* which can increase the competence of this species for DENV [38, 39]. Furthermore, DENV co-infection experiments in *Ae. aegypti* can highlight significant competitive virus advantage, while no difference in vector competence is observed when mono-infection experiments are performed [40]. Finally, others factors such as virus genetics may have played an important role in the evolution of the dengue epidemiological profile in NC in the recent years [41]. Some studies have indicated that DENV genotype replacements were associated with differences in viral fitness, such as a higher viremia in humans [42] or a higher vectorial capacity [43–46]. In our study, no major difference was observed in the capacity of our local vector to transmit the four DENV serotypes. This indicates that factors related to humans would most probably best explain the persistence of DENV-1. All of these parameters should be taken into account in the future in order to better understand the relationship between the virus and the vector in a particular epidemiological context.

To conclude, our study provides the first experimental evidence of the ability of NC vector population *Ae. aegypti* to transmit all four DENV serotypes. Further studies on virus-vector interactions should be undertaken in the light of our results to better understand the DENV epidemiological profile in NC and the evolutionary dynamics of DENV at a larger scale. Indeed, DENV evolutionary dynamics are often characterized by DENV serotypic and/or genotypic replacements that can be epidemiologically significant. With only one proven vector for dengue in NC and the occurrence of DENV-1 genotype displacement in 2012, NC would be an ideal observatory to investigate the possible role of the vector in the selection of DENV variants and to better understand the evolutionary mechanisms driving DENV genotype replacement. Deepening our knowledge in this field is all the more important as DENV genotypes may differ in their antigenic properties and thus potentially have an impact on vaccine design.

Supporting information

S1 Table. Infection, dissemination, transmission efficiencies at 7 and 14 days post-infection (dpi) according to the four DENV serotypes.

(DOCX)

S2 Table. Log-linear model results according with the part of mosquitoes analyzed.

(DOCX)

S3 Table. Medians and interquartile ranges of viral titers measured per positive bodies, positive heads and positive saliva at 14 days post-infection (dpi) according to the four DENV serotypes.

(DOCX)

Acknowledgments

We thank our colleagues Cyrille Goarant for helpful discussions and for rabbit blood samples and Morgane Pol for mosquitoes rearing. We are very grateful to Arnaud Tarantola for editing.

Author Contributions

Conceptualization: Olivia O'Connor, Myrielle Dupont-Rouzeyrol.

Formal analysis: Olivia O'Connor, Elodie Calvez, Catherine Inizan, Nicolas Pocquet, Vincent Richard.

Funding acquisition: Olivia O'Connor, Myrielle Dupont-Rouzeyrol.

Methodology: Olivia O'Connor, Nicolas Pocquet, Vincent Richard.

Resources: Olivia O'Connor, Elodie Calvez.

Supervision: Myrielle Dupont-Rouzeyrol.

Writing – original draft: Olivia O'Connor, Myrielle Dupont-Rouzeyrol.

Writing – review & editing: Olivia O'Connor, Elodie Calvez, Catherine Inizan, Nicolas Pocquet, Vincent Richard, Myrielle Dupont-Rouzeyrol.

References

- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013; 496(7446):504–7. <https://doi.org/10.1038/nature12060> PMID: [23563266](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23563266/)
- Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition. Geneva: World Health Organization.; 2009.
- Robinson ML, Durbin AP. Dengue vaccines: implications for dengue control. *Curr Opin Infect Dis*. 2017; 30(5):449–54. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000394> PMID: [28719400](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28719400/)
- Gubler DJ. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*. 1998; 11(3):480–96. PMID: [9665979](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9665979/)
- Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*. 2009; 9(4):523–40. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.02.003> PMID: [19460319](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19460319/)
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect*. 2009; 11(14–15):1177–85. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.05.005> PMID: [19450706](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19450706/)
- Imrie A, Zhao Z, Bennett SN, Kitsutani P, Laille M, Effler P. Molecular epidemiology of dengue in the Pacific: introduction of two distinct strains of dengue virus type-1 [corrected] into Hawaii. *Ann Trop Med Parasitol*. 2006; 100(4):327–36. <https://doi.org/10.1179/136485906X105589> PMID: [16762113](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16762113/)
- Singh N, Kiedrzyński T, Lepers C, Benyon EK. Dengue in the Pacific—an update of the current situation. *Pac Health Dialog*. 2005; 12(2):111–9. PMID: [18181502](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18181502/)
- Inizan C, Tarantola A, O'Connor O, Mangeas M, Pocquet N, Forfait C, et al. Dengue in New Caledonia: Knowledge and Gaps. *Trop Med Infect Dis*. 2019; 4(2).
- Dupont-Rouzeyrol M, Aubry M, O'Connor O, Roche C, Gourinat AC, Guigon A, et al. Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001–2013. *Virology*. 2014; 11:61. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-11-61> PMID: [24684835](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24684835/)
- Guillaumot L. Arboviruses and their vectors in the Pacific—status report. *Pac Health Dialog*. 2005; 12(2):45–52. PMID: [18181493](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18181493/)
- Calvez E, Guillaumot L, Millet L, Marie J, Bossin H, Rama V, et al. Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016; 10(1):e0004374. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0004374> PMID: [26799213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26799213/)
- Tabachnick WJ. Nature, nurture and evolution of intra-species variation in mosquito arbovirus transmission competence. *Int J Environ Res Public Health*. 2013; 10(1):249–77. <https://doi.org/10.3390/ijerph10010249> PMID: [23343982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23343982/)
- Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D'Ortenzio E, Thiberge JM, et al. Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2012; 12(12):1036–41. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0937> PMID: [23167500](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23167500/)
- Calvez E, O'Connor O, Pol M, Rousset D, Faye O, Richard V, et al. Differential transmission of Asian and African Zika virus lineages by *Aedes aegypti* from New Caledonia. *Emerg Microbes Infect*. 2018; 7(1):159. <https://doi.org/10.1038/s41426-018-0166-2> PMID: [30254274](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30254274/)
- Calvez E, Guillaumot L, Girault D, Richard V, O'Connor O, Paoaafaite T, et al. Dengue-1 virus and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia. *Parasit Vectors*. 2017; 10(1):381. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2319-x> PMID: [28793920](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28793920/)

17. Aubry M, Roche C, Dupont-Rouzeyrol M, Aaskov J, Viallon J, Marfel M, et al. Use of serum and blood samples on filter paper to improve the surveillance of Dengue in Pacific Island Countries. *J Clin Virol*. 2012; 55(1):23–9. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2012.05.010> PMID: [22695001](#)
18. Cao-Lormeau VM, Roche C, Musso D, Mallet HP, Dalipanda T, Dofai A, et al. Dengue virus type 3, South Pacific Islands, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20(6):1034–6. <https://doi.org/10.3201/eid2006.131413> PMID: [24856252](#)
19. R Foundation for Statistical Computing V, Austria. R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2016.
20. Mellor PS. Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol*. 2000; 123(4):231–47. <https://doi.org/10.1053/jcpa.2000.0434> PMID: [11041993](#)
21. Franz AW, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*. 2015; 7(7):3741–67. <https://doi.org/10.3390/v7072795> PMID: [26184281](#)
22. Raquin V, Lambrechts L. Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. *Virology*. 2017; 507:75–81. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2017.04.009> PMID: [28431281](#)
23. Souza-Neto JA, Powell JR, Bonizzoni M. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infect Genet Evol*. 2019; 67:191–209. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2018.11.009> PMID: [30465912](#)
24. Kamgang B, Vazeille M, Tedjou AN, Wilson-Bahun TA, Yougang AP, Mousson L, et al. Risk of dengue in Central Africa: Vector competence studies with *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations and dengue 2 virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(12):e0007985. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007985> PMID: [31887138](#)
25. Seixas G, Jupille H, Yen PS, Viveiros B, Failloux AB, Sousa CA. Potential of *Aedes aegypti* populations in Madeira Island to transmit dengue and chikungunya viruses. *Parasit Vectors*. 2018; 11(1):509. <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3081-4> PMID: [30208974](#)
26. Gaye A, Wang E, Vasilakis N, Guzman H, Diallo D, Talla C, et al. Potential for sylvatic and urban *Aedes* mosquitoes from Senegal to transmit the new emerging dengue serotypes 1, 3 and 4 in West Africa. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019; 13(2):e0007043. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007043> PMID: [30759080](#)
27. Vazeille M, Rosen L, Mousson L, Failloux AB. Low oral receptivity for dengue type 2 viruses of *Aedes albopictus* from Southeast Asia compared with that of *Aedes aegypti*. *Am J Trop Med Hyg*. 2003; 68(2):203–8. PMID: [12641412](#)
28. Poole-Smith BK, Hemme RR, Delorey M, Felix G, Gonzalez AL, Amador M, et al. Comparison of vector competence of *Aedes mediovittatus* and *Aedes aegypti* for dengue virus: implications for dengue control in the Caribbean. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015; 9(2):e0003462. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003462> PMID: [25658951](#)
29. Lambrechts L. Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol*. 2011; 27(3):111–4. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2010.12.001> PMID: [21215699](#)
30. Fansiri T, Fontaine A, Diancourt L, Caro V, Thaisomboonsuk B, Richardson JH, et al. Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. *PLoS Genet*. 2013; 9(8):e1003621. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003621> PMID: [23935524](#)
31. Jupatanakul N, Sim S, Dimopoulos G. The insect microbiome modulates vector competence for arboviruses. *Viruses*. 2014; 6(11):4294–313. <https://doi.org/10.3390/v6114294> PMID: [25393895](#)
32. Dennison NJ, Jupatanakul N, Dimopoulos G. The mosquito microbiota influences vector competence for human pathogens. *Curr Opin Insect Sci*. 2014; 3:6–13. <https://doi.org/10.1016/j.cois.2014.07.004> PMID: [25584199](#)
33. Gloria-Soria A, Armstrong PM, Powell JR, Turner PE. Infection rate of *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue virus depends on the interaction between temperature and mosquito genotype. *Proc Biol Sci*. 2017; 284(1864).
34. Richards SL, Mores CN, Lord CC, Tabachnick WJ. Impact of extrinsic incubation temperature and virus exposure on vector competence of *Culex pipiens quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae) for West Nile virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2007; 7(4):629–36. <https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0101> PMID: [18021028](#)
35. Tesla B, Demakovskiy LR, Mordecai EA, Ryan SJ, Bonds MH, Ngonghala CN, et al. Temperature drives Zika virus transmission: evidence from empirical and mathematical models. *Proc Biol Sci*. 2018; 285(1884).
36. Carrington LB, Armijos MV, Lambrechts L, Scott TW. Fluctuations at a low mean temperature accelerate dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*. 2013; 7(4):e2190. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002190> PMID: [23638208](#)

37. Duong V, Lambrechts L, Paul RE, Ly S, Lay RS, Long KC, et al. Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(47):14688–93. <https://doi.org/10.1073/pnas.1508114112> PMID: [26553981](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26553981/)
38. Armstrong PM, Ehrlich HY, Magalhaes T, Miller MR, Conway PJ, Bransfield A, et al. Successive blood meals enhance virus dissemination within mosquitoes and increase transmission potential. *Nat Microbiol*. 2020; 5(2):239–47. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0619-y> PMID: [31819213](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31819213/)
39. Magalhaes T, Robison A, Young MC, Black WCt, Foy BD, Ebel GD, et al. Sequential Infection of *Aedes aegypti* Mosquitoes with Chikungunya Virus and Zika Virus Enhances Early Zika Virus Transmission. *Insects*. 2018; 9(4).
40. Vazeille M, Gaborit P, Mousson L, Girod R, Failloux AB. Competitive advantage of a dengue 4 virus when co-infecting the mosquito *Aedes aegypti* with a dengue 1 virus. *BMC Infect Dis*. 2016; 16:318. <https://doi.org/10.1186/s12879-016-1666-0> PMID: [27390932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27390932/)
41. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003; 59:315–41. [https://doi.org/10.1016/s0065-3527\(03\)59009-1](https://doi.org/10.1016/s0065-3527(03)59009-1) PMID: [14696333](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14696333/)
42. Vu TT, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, et al. Emergence of the Asian 1 genotype of dengue virus serotype 2 in viet nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in South-East Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010; 4(7):e757. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000757> PMID: [20651932](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20651932/)
43. Quiner CA, Parameswaran P, Ciota AT, Ehrbar DJ, Dodson BL, Schlesinger S, et al. Increased replicative fitness of a dengue virus 2 clade in native mosquitoes: potential contribution to a clade replacement event in Nicaragua. *J Virol*. 2014; 88(22):13125–34. <https://doi.org/10.1128/JVI.01822-14> PMID: [25187539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25187539/)
44. Lambrechts L, Fansiri T, Pongsiri A, Thaisomboonsuk B, Klungthong C, Richardson JH, et al. Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission. *J Virol*. 2012; 86(3):1853–61. <https://doi.org/10.1128/JVI.06458-11> PMID: [22130539](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22130539/)
45. Hanley KA, Nelson JT, Schirtzinger EE, Whitehead SS, Hanson CT. Superior infectivity for mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. *BMC Ecol*. 2008; 8:1. <https://doi.org/10.1186/1472-6785-8-1> PMID: [18269771](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18269771/)
46. Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 75(5):886–92. PMID: [17123982](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17123982/)

CHAPITRE II : ETUDE DE L'IMPACT DE LA FITNESS COMPETITIVE DE DEUX GENOTYPES DE DENV-1 CHEZ LE VECTEUR *Ae. AEGYPTI*

2.1 CONTEXTE ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

Des études phylogénétiques ont montré que la dynamique évolutive de la dengue est caractérisée par un remplacement rapide de génotypes ou de clades. A notre connaissance, la Nouvelle-Calédonie a connu pour la première fois ce phénomène en 2012, avec un remplacement de génotype au sein du DENV-1. En effet le DENV-1 génotype IV a été remplacé en quelques mois par le DENV-1 génotype I au cours de la saison fraîche entre les deux pics épidémiques caractérisant le profil épidémique en Nouvelle-Calédonie. Ce remplacement de génotype fut suivi par une épidémie de grande ampleur en 2013 en termes de nombre de cas recensés (Dupont-Rouzeyrol et al., 2014). L'immunité de l'hôte humain étant conditionnée à hauteur du sérotype, une différence de fitness virale entre ces deux génotypes chez le vecteur pourrait expliquer ce remplacement du virus circulant. Une étude précédente a mis en évidence une différence de fitness de transmission entre les deux génotypes du DENV-1 au sein du moustique lors de la dissémination du DENV (O'Connor et al., 2020). Toutefois, le design expérimental de cette étude n'a pas permis d'investiguer plus avant la fitness virale de ces génotypes pour expliquer le remplacement de génotype observé en Nouvelle-Calédonie. L'objectif de cette deuxième partie de ce travail de thèse est donc d'évaluer l'impact de la fitness compétitive des génotypes I et IV du DENV-1 chez le vecteur *Ae. aegypti* sur la transmission virale.

Pour déterminer la fitness compétitive des génotypes I et IV du DENV-1, deux souches virales représentatives de chaque génotype isolées en 2012 ont été sélectionnées (Genbank :MW265690, MW265687, MW265693 et MW265688). Des femelles d'une population d'*Ae. aegypti*, de la génération F2, ont été artificiellement infectées par voie orale avec une suspension virale contenant une souche de génotype I et une souche de génotype IV en ratio 50 : 50 et 10 : 90 pour un titre viral final de 5×10^6 FFU/mL. Les femelles pleinement gorgées ont été conservées à 28°C et 80% d'humidité sous un cycle jour/nuit de 12h :12h avec un accès illimité à une solution sucrée à 10%. A 7 et 14 jours post-repas infectieux, une

trentaine d'individus a été sacrifiée après la récolte des salives par une salivation forcée. Les corps, les têtes et les salives de chaque individu ont été individuellement analysés par RT-PCR en temps réel spécifique de chaque génotype de DENV-1 afin de déterminer le statut infectieux des moustiques aux différentes étapes d'infection, de dissémination et de transmission. Les taux d'infection et de dissémination sont déterminés de la même manière que dans le chapitre précédent (voir publication 1). Le taux de transmission correspond quant à lui au nombre de salives positives pour le DENV par rapport au nombre de têtes infectées.

Ce travail s'est inscrit dans le cadre d'un financement ACIP (Actions Concertées Inter Pasteuriennes) en collaboration avec l'Institut Pasteur du Cambodge et l'Institut Pasteur, Paris. Dans le cadre de ce travail collaboratif d'envergure, j'ai personnellement mené le travail expérimental portant sur la Nouvelle-Calédonie, avec le soutien d'une partie du personnel de l'unité, et notamment celui d'un stagiaire en deuxième année de certification professionnelle « assistant ingénieur en biologie-biochimie-biotechnologies » que j'ai personnellement encadré. J'ai par ailleurs également rédigé la version initiale du manuscrit correspondant (publication 2), et mis en œuvre sa soumission.

2.2 RESULTATS ET CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude ont récemment été soumis dans le journal « Emerging Microbes and Infections » : **Potential role of vector-mediated natural selection in dengue virus genotype/lineage replacements in two epidemiologically contrasted settings.**

Les quatre combinaisons virales possibles ont été testées avec les deux ratios infectieux. Une infection des moustiques dès 7 jours post-repas infectieux a été observée pour ces quatre combinaisons virales quel que soit le ratio infectieux initial du repas sanguin. Le DENV-1 a été détecté soit sous la forme de mono-infection par le génotype I ou le génotype IV uniquement, soit sous la forme de co-infection avec le génotype I et le génotype IV. A quantité égale dans le repas de sang, une prédominance significative du génotype I sur le génotype IV a été observée dès l'étape d'infection chez *Ae. aegypti* pour deux puis trois combinaisons virales, à 7 et 14 jours post-repas infectieux respectivement. Lors de la dissémination virale au sein du moustique, le même profil infectieux que celui de l'étape précédente a été observé avec une prédominance du génotype I sur le génotype IV. L'analyse des salives a montré une meilleure

transmission du génotype I pour une seule combinaison virale à 7 jours post-repas infectieux. Toutefois, pour les salives récoltées à 14 jours post-repas infectieux, une prédominance du génotype I sur le génotype IV a été observée pour les quatre combinaisons virales.

L'analyse des moustiques ayant pris un repas sanguin contenant un ratio infectieux 10 : 90 en faveur du génotype IV a montré des résultats plus hétérogènes. Une prédominance significative du génotype I sur le génotype IV a été observée pour deux combinaisons virales quel que soit le jour d'analyse. Ces deux combinaisons contenaient la même souche de génotype IV, suggérant une fitness plus faible de cette souche comparée à la deuxième souche de génotype IV testée dans cette étude. Le profil infectieux observé à l'étape de dissémination était identique à celui de l'infection. L'analyse des salives a montré une meilleure transmission du génotype I pour une seule combinaison virale, bien que ce génotype ait également été détecté dans les salives de deux autres combinaisons virales. Bien que présent en quantité minoritaire dans le repas sanguin infectieux, une prédominance du génotype I semble ressortir de nouveau.

Cette étude démontre que le remplacement de génotype du DENV-1 observé en 2012 pourrait être lié à l'existence d'une différence de fitness de transmission entre deux génotypes de DENV-1 chez le vecteur *Ae. aegypti*. Les résultats indiquent une meilleure fitness de transmission du DENV-1 génotype I par rapport au génotype IV dès l'étape de l'infection de l'épithélium digestif du moustique. Cet avantage de transmission pour le génotype I semble être également conservé lorsque les deux génotypes ont été mis en compétition avec une quantité moindre du génotype I. Ceci est d'autant plus pertinent que le génotype I a été détecté dans les salives des moustiques, or, la présence de virus dans ce compartiment est l'étape ultime de la transmission du DENV à l'hôte humain. Ainsi, une sélection d'un virus ayant une meilleure fitness de transmission chez le vecteur pourrait être un des mécanismes à l'origine des remplacements de DENV. De manière intéressante, cette meilleure fitness de transmission ne semble pas avoir impacté la transmission virale chez l'hôte humain, du fait de l'épidémie de grande ampleur et de la circulation prolongée de ce génotype qui s'ensuivent. Toutefois, les conditions expérimentales employées dans cette étude ne nous permettent pas de définir quels sont les facteurs à l'origine de cette fitness de transmission accrue du génotype I par rapport au génotype IV. Une meilleure fitness répliquative ou une production plus importante de sfRNA par le DENV-1 génotype I pourrait expliquer en partie cette fitness

de transmission plus élevée. En effet, une étude portant sur un remplacement de lignée du DENV à Porto-Rico a montré l'existence d'un lien entre une meilleure fitness épidémiologique et une plus grande quantité de sfRNA produite par la lignée invasive au sein du vecteur (Pompon et al., 2017a). De plus, les remplacements de lignées du DENV observés à Porto-Rico et au Nicaragua ont également été associés à une production accrue de sfRNA par la lignée invasive chez l'hôte humain (Manokaran et al., 2015). Ce facteur viral semble donc jouer un rôle important dans la transmission du DENV (Finol & Ooi, 2019; Syenina et al., 2020). C'est pourquoi l'étude des sfRNA correspondant pourrait représenter une perspective intéressante de poursuite de nos travaux, afin d'explorer leur rôle potentiel dans les remplacements de génotypes/lignées durant les épidémies de DENV.

2.3 PUBLICATION 2

1 **Title**

2 **Potential role of vector-mediated natural selection in dengue virus genotype/lineage**
3 **replacements in two epidemiologically contrasted settings**

4

5 **Authors**

6 Olivia O'Connor^{1*}, Tey Putita Ou², Fabien Aubry³, Stéphanie Dabo³, Sylvie Russet¹,
7 Dominique Girault¹, Saraden In², Marine Minier⁴, Thavry Hoem², Sébastien Boyer⁵, Philippe
8 Dussart^{2¶}, Nicolas Pocquet⁴, Valérie Burtet-Sarramegna⁶, Louis Lambrechts^{3°}, Veasna
9 Duong^{2°}, Myrielle Dupont-Rouzeyrol^{1°}

10

11 ¹ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Dengue and Arboviruses Research and Expertise Unit,
12 Institut Pasteur International Network, Noumea, New Caledonia

13 ² Institut Pasteur du Cambodge, Virology Unit, Institut Pasteur International Network, Phnom
14 Penh, Cambodia

15 ³ Insect-Virus Interactions Unit, Institut Pasteur, UMR2000, CNRS, Paris, France

16 ⁴ Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, Medical Entomology Research and Expertise Unit,
17 Institut Pasteur International Network, Noumea, New Caledonia

18 ⁵ Institut Pasteur du Cambodge, Medical Entomology Unit, Institut Pasteur International
19 Network, Phnom Penh, Cambodia

20 ⁶ Université de la Nouvelle-Calédonie, Institute For Exact and Applied Sciences, Noumea, New
21 Caledonia

22 ¶ Present address: Virology Unit, Institut Pasteur de Madagascar, Institut Pasteur International
23 Network, Antananarivo, Madagascar.

24

25 * Corresponding author: ooconnor@pasteur.nc

26 ° These authors equally contributed to the study

27

28 **Abstract**

29 Dengue virus (DENV) evolutionary dynamics are characterized by frequent DENV
30 genotype/lineage replacements, which can be associated with changes in disease severity and
31 human immunity. New Caledonia (NC) and Cambodia, two contrasted epidemiological
32 settings, experienced a DENV-1 genotype IV to I replacement in 2012 and a DENV-1 genotype
33 I lineage 3 to 4 replacement in 2005-2007, respectively. These replacements were both followed
34 by a massive dengue outbreak but their underlying evolutionary drivers have not been
35 elucidated. In this study, we tested the hypothesis that these genotype/lineage switches reflected
36 a higher transmission fitness of the replacing DENV genotype/lineage in the mosquito vector
37 using *in vivo* competition experiments. For this purpose, field-derived *Aedes aegypti* from NC
38 and Cambodia were orally challenged with epidemiologically relevant pairs of four DENV-1
39 genotype I and IV strains from NC or four DENV-1 genotype I lineage 3 and 4 strains from
40 Cambodia, respectively. The relative transmission fitness of each DENV-1 genotype/lineage
41 was measured by quantitative RT-PCR for infection, dissemination, and transmission rates.
42 Results showed a clear transmission fitness advantage of the replacing DENV-1 genotype I
43 from NC within the vector. A similar but more subtle pattern was observed for the DENV-1
44 lineage 4 replacement in Cambodia. Our study supports the hypothesis that vector-driven
45 selection contributed to the DENV-1 genotype/lineage replacements in these two contrasted
46 epidemiological settings. These findings reinforce the idea that natural selection taking place
47 within the mosquito vector plays an important role in DENV short-term evolutionary dynamics.

48

49 Keywords: Dengue virus, genotype/lineage replacement, *Aedes aegypti*, transmission fitness,
50 competition assay.

51

52 **Introduction**

53 Dengue virus (DENV) is the most important arthropod-borne viral pathogen affecting humans
54 worldwide, with approximately 390 million people infected each year and four billion
55 considered at risk [1]. The symptoms of dengue fever are broad, ranging from asymptomatic or
56 mild conditions to life-threatening symptoms. Severe forms of dengue can result in hemorrhagic
57 manifestations, sometimes with a fatal outcome [2]. DENV is transmitted to humans through
58 the bite of infected *Aedes* mosquitoes, primarily *Aedes aegypti*.

59 DENV is a positive-sense, single-stranded RNA virus belonging to the *Flaviviridae* family and
60 the *Flavivirus* genus. Similar to many RNA viruses, DENV displays extensive genetic diversity
61 generated in part by the error-prone RNA-dependent RNA polymerase and by genome
62 recombination [3]. Four genetically distinct serotypes (DENV-1 to -4) sharing approximately
63 65% amino acid identity can be distinguished [4]. Each serotype can be subdivided in several
64 genotypes that have no more than 6% nucleotide sequence divergence [5, 6]. Phylogenetic
65 analyses based on the DENV envelope gene sequence identified 5 genotypes for DENV-1:
66 genotype I, representing strains from Southeast Asia, China and East Africa; genotype II,
67 representing old strains from Thailand; genotype III, representing the sylvatic strain; genotype
68 IV, representing strains from the Pacific islands and Australia; and genotype V, representing all
69 strains collected in the Americas and West Africa [5]. Moreover, each genotype can be
70 subdivided into multiple lineages based on the analysis of the envelope gene.

71 Phylogenetic analyses of DENV genetic diversity have revealed that DENV short-term
72 evolutionary dynamics are characterized by rapid turnover of DENV genotypes and lineages
73 [7, 8]. These replacement events can lead to the extinction of the circulating DENV
74 genotype/lineage, or its replacement by a new genotype or lineage [7-15]. Such mechanism has
75 been documented for all DENV serotypes. Indeed, in the 1980s and 1990s, DENV-3 lineage
76 replacements were observed in Sri Lanka and Thailand [7, 14, 15], whereas DENV-4 lineage

77 replacements were identified in Puerto Rico [8]. Further, DENV-1 lineage or genotype
78 replacements were observed in Myanmar, Cambodia and Thailand in the 1990s and the early
79 2000s [7, 9-11], and DENV-2 genotype replacements were observed in America and in Vietnam
80 [12, 13].

81 These genotype/lineage switches have important implications for dengue epidemiology.
82 Indeed, both epidemiological observations and *in vitro* studies suggest that distinct genotypes
83 have a different potential to cause severe dengue epidemics [16]. As an example, the appearance
84 of dengue hemorrhagic fever cases in the Americas in 1981 was associated with the introduction
85 of a DENV-2 Southeast Asian genotype that supplanted the native American genotype [12, 17].
86 Furthermore, recent studies indicated that protection from homologous DENV re-infection may
87 be incomplete in some circumstances and that the immune response can vary within the same
88 serotype [18, 19]. The mechanisms underlying the DENV genotype/lineage turnover, however,
89 remain poorly understood. Some studies have suggested that these dynamics are the result of
90 stochastic events [9, 15]. Conversely, other studies have proposed that this turnover arises from
91 differences in viral fitness, such as higher viremia in humans [13] or higher transmissibility in
92 mosquitoes [10, 20-22]. Indeed, a significantly higher replicative index of the replacing DENV
93 strain was observed in some DENV lineage replacements as early as initial infection
94 establishment in *Ae. aegypti*. The increase of viral titer in the midgut was associated with a
95 greater dissemination efficiency, suggesting a higher viral transmission rate and/or a shorter
96 extrinsic incubation period [20, 21]. Despite the complex epidemiological pattern of dengue,
97 the turnover of DENV genotypes and lineages is observed in all dengue-affected regions
98 irrespective of their epidemic, endemic or even hyper-endemic status. In this study, we
99 investigated these replacements in two epidemiologically contrasted countries: New Caledonia
100 (NC) (epidemic) and Cambodia (hyper-endemic).

101 The circulation of DENV in NC, a French overseas territory of 280,000 inhabitants located in
102 the South Pacific region, has been previously characterized by an epidemic transmission of a
103 single dominant DENV serotype/genotype for three to five years, with subsequent replacement
104 by another serotype/genotype. This epidemiological profile has evolved over the last fifteen
105 years, with epidemics becoming more frequent, co-circulation of several arboviruses and an
106 unusual persistence of DENV-1 [23]. Phylogenetic analyses performed on DENV-1 strains
107 isolated between 2001 and 2017 showed that NC experienced a replacement of the genotype
108 IV with the genotype I in 2012 [23, 24]. The introduction of the genotype I in NC was associated
109 with a major outbreak in 2013, (more than 10,000 cases diagnosed), high rate of hospitalization
110 in a short time period, and uncommon complications (Guillain-Barré syndrome, ophthalmic
111 disorder) [24, 25]. Since 2018, DENV-1 genotype I was replaced by DENV-2 in NC [26].

112 In contrast, Cambodia is a dengue endemic country with 10,000 to 60,000 cases reported per
113 year. All four DENV serotypes co-circulate each year although the predominant serotype has
114 alternated mainly between DENV-1, DENV-2, and DENV-3 during the last decades [27].
115 DENV-1 co-circulated with other serotypes as a minor serotype between 2000 and 2009 [11,
116 28]. DENV-1 strains isolated over this period belong to genotype I grouped into four lineages
117 (L1 to L4) with specific dynamics [11]. Indeed, three lineages replacements were observed as
118 follow: in 2000-2003 L2 displaced L1, in 2002-2003 L3 displaced L2, and in 2005-2007, the
119 lineage L3 was replaced by L4 [11]. In 2011, DENV-1 was detected throughout the country
120 and caused an outbreak of high magnitude in 2012 [29]. Unlike DENV-3 which was
121 sporadically detected after causing a major outbreak in 2007, DENV-1 continued to circulate
122 as dominant serotype until 2015.

123 Interestingly, these genotype/lineage replacements were associated with periods of low DENV-
124 1 circulation both in Cambodia and in NC [11, 24, 29]. Periods of low virus transmission could
125 favor the emergence of previously rare variants randomly replacing the previously dominant

126 variants, resulting in a ladder-like tree topology [8, 30-32]. The genotype/lineage replacements
127 observed in NC and Cambodia are inconsistent with this scenario because a newly introduced
128 genotype/lineage replaced the resident one after a period of co-circulation [11, 24]. They are
129 more consistent with an adaptive replacement reflecting the higher fitness of the invasive
130 genotype/lineage relative to the resident one. However the selective forces involved have not
131 been identified to date. Here, we investigated whether the DENV genotype/lineage replacement
132 events observed in these two epidemiologically contrasted settings (NC and Cambodia) could
133 reflect viral fitness differences in the mosquito vector.

134

135 **Materials and Methods**

136 Viruses – Thirty-three epidemic DENV-1 strains were selected in NC from 2009 to 2017 and
137 twenty-one DENV-1 strains were selected in Cambodia from 2005 to 2016. Viruses were
138 isolated from human serum by three successive passages in *Aedes albopictus* (C6/36) cells,
139 maintained in Leibovitz's L-15 medium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA) supplemented
140 with 5% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, ThermoFisher Scientific, Paisley,
141 UK) and 10% tryptose phosphate broth (Gibco, ThermoFisher Scientific, Paisley, UK). After
142 five days of incubation at 28°C, supernatants were collected. For DENV-1 strains selected for
143 competition assays, viral titer of each strains was determined by immuno-fluorescent focus
144 assay as described previously [33] using the anti-DENV complex antibody, clone D3-2H2-9-
145 21 (Millipore, Temecula, CA, USA), and was expressed as focus-forming unit per milliliter
146 (FFU/mL). If necessary, two concentration methods were used to reach the appropriate viral
147 titer for the different competition assays. Viruses were either centrifuged using Vivaspin 6
148 centrifugal concentrator (Sartorius, Stonehouse, UK) or added with Polyethylene Glycol (PEG,
149 Sigma-Aldrich, Germany) and centrifuged at 1800 rpm for 1 hour.

150 Whole-genome sequencing and phylogenetic analysis – Whole-genomes of the fifty-four
151 DENV-1 strains selected in this study were obtained by high-throughput sequencing of cell-
152 culture supernatant as previously described [34]. The resulting whole-genomes were deposited
153 in GenBank (Supplementary Table 1). Additionally, five whole-genome sequences from
154 Cambodia already available in GenBank (FJ639684, FJ639687, HM181944, FJ639685, and
155 GU131893) were added to the analysis. Phylogenetic analysis of DENV-1 was conducted on
156 whole-genome sequences from NC and Cambodia with reference sequences from GenBank
157 representing the five genotypes of DENV-1. Alignment was done using the MAFFT software
158 [35]. The best substitution model for the alignment sequence was determined in W-IQ-Tree tool
159 using the Model selection option, resulting in the GTR + G4 + I as the best model. The whole-
160 genome phylogenetic tree was constructed by the Maximum Likelihood method based on the
161 best substitution model with 1.000 bootstrap replicates in W-IQ-Tree tool [36]. DENV-3
162 (AY858048) was used as the out-group.

163 Quantitative RT-PCR – Viral RNA from all samples (body, head/legs/wings, and saliva)
164 obtained in this study was extracted with the QIAamp Viral RNA mini kit (Qiagen, Hilden,
165 Germany) according to the manufacturer's instructions. The detection and quantification of
166 DENV-1 genotypes I and IV (DENV-1 GI and GIV) and DENV-1, genotype I, lineages 3 and
167 4 (DENV-1 L3 and L4) was performed by specific TaqMan quantitative RT-PCR assays with
168 the Superscript III Platinum One-Step qRT-PCR kit (ThermoFisher Scientific, Carlsbad, CA,
169 USA). Genotype or lineage-specific primers and probes, which target the NS2B gene for New
170 Caledonian and the E gene for Cambodian strains, were used (Supplementary Table 2).
171 Amplifications were performed on either a LightCycler 480 instrument II (Roche, Basel,
172 Switzerland) or a Bio-Rad CFX96 Real-Time Detection System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
173 according to the following program: one cycle (50°C, 15 min; 95°C, 2 min) followed by 45
174 cycles (95°C, 15 s; 57°C, 1 min).

175 Mosquitoes – *Ae. aegypti* larvae and pupae were collected at the end of the hot season (May
 176 2018) in Noumea, NC and in April 2019 in Phnom Penh, Cambodia. Immature stages were
 177 brought back to the laboratory and reared to the adult stage. Adults were then maintained with
 178 access to 10% sucrose solution *ad libitum* at 28°C ± 1°C, 80% ± 10% relative humidity and
 179 12:12h light:dark cycle. F1 and F2 generations were successively produced by sib-mating and
 180 collective oviposition following blood feeding.

181 In vivo competition assay – Two DENV-1 strains representatives of each genotype (GI and
 182 GIV) or lineage (L3 and L4) were selected from the phylogenetic tree (Figure 1) obtained in
 183 this study to measure their relative fitness by competition assays in mosquitoes. Five- to seven-
 184 day-old nulliparous *Ae. aegypti* F2 females were challenged with infectious blood meals at a
 185 final concentration of 5.10⁶ FFU/mL with two initial FFU ratios (DENV-1 GI/GIV relative
 186 percentage: 50/50 and 10/90, or DENV-1 L3/L4: 50/50) (Table 1).

187

188 **Table 1:** List of DENV-1 strains used in this study for *in vivo* competition assays. Mix of
 189 viruses were as follows, for NC: GI.a/GIV.c, GI.a/GIV.d, GI.b/GIV.c, GI.b/GIV.d and for
 190 Cambodia: L3.a/L4.c, L3.a/L4.d, L3.b/L4.c, L3.b/L4.d.

DENV-1 strain	Genotype/ Lineage	Country	Titer used in 50/50 ratio	Titer used in 10/90 ratio
DENV-1 GI.a	Genotype I	NC	2.5.10 ⁶ FFU/mL	0.5.10 ⁶ FFU/mL
DENV-1 GI.b	Genotype I	NC	2.5.10 ⁶ FFU/mL	0.5.10 ⁶ FFU/mL
DENV-1 GIV.c	Genotype IV	NC	2.5.10 ⁶ FFU/mL	4.5.10 ⁶ FFU/mL
DENV-1 GIV.d	Genotype IV	NC	2.5.10 ⁶ FFU/mL	4.5.10 ⁶ FFU/mL
DENV-1 L3.a	Lineage 3	Cambodia	2.5.10 ⁶ FFU/mL	NT
DENV-1 L3.b	Lineage 3	Cambodia	2.5.10 ⁶ FFU/mL	NT
DENV-1 L4.c	Lineage 4	Cambodia	2.5.10 ⁶ FFU/mL	NT
DENV-1 L4.d	Lineage 4	Cambodia	2.5.10 ⁶ FFU/mL	NT

191 NT: not tested

192

193 For each competition *Ae. aegypti* from NC and Cambodia were orally challenged with the
194 selected DENV-1 strains from NC and Cambodia respectively. For this purpose, an infectious
195 blood meal, consisting of a 2:1 mix of washed rabbit erythrocytes and viral suspension
196 supplemented with 5 mM of an adenosine triphosphate phagostimulant (Sigma-Aldrich), was
197 offered to mosquitoes for twenty minutes using a Hemotek membrane feeding system. Fully
198 engorged females were transferred into cardboard containers and maintained at 28°C ± 1°C,
199 80% relative humidity and 12:12h light:dark cycle with free access to 10% sucrose solution. At
200 7 and 14 days post challenge (pc), 30 *Ae. aegypti* mosquitoes randomly collected were subjected
201 to a forced salivation. Briefly, after removing their wings and legs, their proboscis was inserted
202 into a 20-µL filter tip filled with 5 µL FBS for 30 minutes. At the end of the incubation time,
203 this mixture containing the saliva was added to 45 µL of Leibovitz's L-15 medium and stored
204 at -80°C. After decapitation, the body and the head of each mosquito were mechanically
205 homogenized for 2 minutes at 2000 rpm using a mini-BeadBeater 96 (BioSpecProducts,
206 Bartlesville, OK, USA) with metal beads in 200 µL of Leibovitz medium supplemented with
207 2% FBS, 10% tryptose phosphate broth and antibiotics/antifungals (100 units/mL of penicillin,
208 0.1 mg/mL of streptomycin and 0.25 µg/mL amphotericin B, Gibco, ThermoFisher Scientific,
209 Carlsbad, CA, USA) in NC. In Cambodia, the body and head/legs/wings were stored in 400 µL
210 phosphate buffered saline (PBS) supplemented with 10 % FBS, 1% Penicillin/Streptomycin,
211 1% Amphotericin B (GIBCO, Waltham MA, USA) until homogenization. The homogenization
212 was performed using a MagNA Lyser (Roche, Basel, Switzerland) with ceramic beads at 6,500
213 rpm for 50 sec. The lysates thereby obtained were then centrifuged at 10,000 g for 5 minutes
214 and stored at -80°C. The detection of viral RNA from body, head and saliva for each
215 competition was performed by two specific quantitative RT-PCR assays as described above.
216 The viral infection profile for the three vector competence indices (infection, dissemination and
217 transmission rates) was determined as follows: i) the infection rate is the number of mosquitoes

218 with a DENV positive body among all tested mosquitoes, ii) the dissemination rate is the
219 number of mosquitoes with an infected head divided by the number of mosquitoes with a DENV
220 positive body, and iii) the transmission rate is the number of mosquitoes with a DENV positive
221 saliva divided by the number of mosquitoes with an infected head.

222 Statistical analysis – The outcome of competition assays was analyzed by detecting each
223 genotype/lineage in individual mosquitoes and comparing their relative frequency for infection,
224 dissemination, and transmission indices. The 2 x 2 contingency tables of presence/absence for
225 both competing viruses were compared by McNemar’s chi-squared test for paired nominal data.
226 All statistical analyses and data plotting of competition assays were performed with R v3.6.1
227 software [37], considering *p*-values < 0.05 as statistically significant.

228 Ethics statement – In NC, the use of DENV strains obtained from the serum of anonymized
229 patients was granted by the Consultative Ethics Committee of New Caledonia 26.11.2019 and
230 by the Comité de Protection des Personnes Sud-Est II (N° Eudract 2019-A03114-53). In
231 Cambodia, the use of DENV strains obtained from patients enrolled in the National Program
232 for Dengue Surveillance program by Ministry of Health of Cambodia was approved by National
233 Ethics Committee for Health Research (N° 264NECHR).

234

235 **Results**

236 Phylogenetic analysis – Fifty-four whole genomes of DENV-1 strains from NC and Cambodia
237 clustered within two of the five DENV-1 genotypes with 85% (45/54) within genotype I (Figure
238 1). Five lineages were observed inside the genotype I. The twenty-one Cambodian strains from
239 this study belonged to genotype I. They fell into three (lineage L3, L4 and L5) of the five distinct
240 lineages among other Cambodian strains reported previously. DENV-1 strains in lineage L3
241 circulated between 2002 and 2007, L4 between 2003 and 2016 and L5 between 2007 and 2016.

242 Twenty-five New Caledonian strains collected from 2012 to 2017 clustered in lineage L5 along
243 with five Cambodian strains collected in 2014, 2015 and 2016 (Figure 1). The eight last strains
244 from NC collected between 2009 and 2012, fell into genotype IV, and are closely related to a
245 virus sampled in French Polynesia in 2001.

246



247

248 **Figure 1: Phylogenetic tree of whole genomes of DENV-1 strains.** MAFFT alignment
 249 software was used to perform multiple sequence alignment of Cambodia strains indicated by a
 250 black circle (strains included in our study) and a grey circle (strains from previous study), and
 251 New Caledonia strains indicated by a black triangle with other reference strains available in
 252 GenBank. Two DENV-1 strains representatives of each genotype (GIV in orange and GI in
 253 blue) from New Caledonia or lineage (L3 in yellow and L4 in sky-blue belonging to genotype
 254 I) from Cambodia were selected for in vivo competition assay. The phylogenetic relationships
 255 were estimated by the maximum-likelihood method based on the GTR + I + G4 model with
 256 1,000 bootstrap replicates in W-IQ-Tree tool. The dengue virus 3 (AY858048) was used to root
 257 the tree. The scale shows the length of branch representing 0.01 nucleotide substitutions per
 258 site.

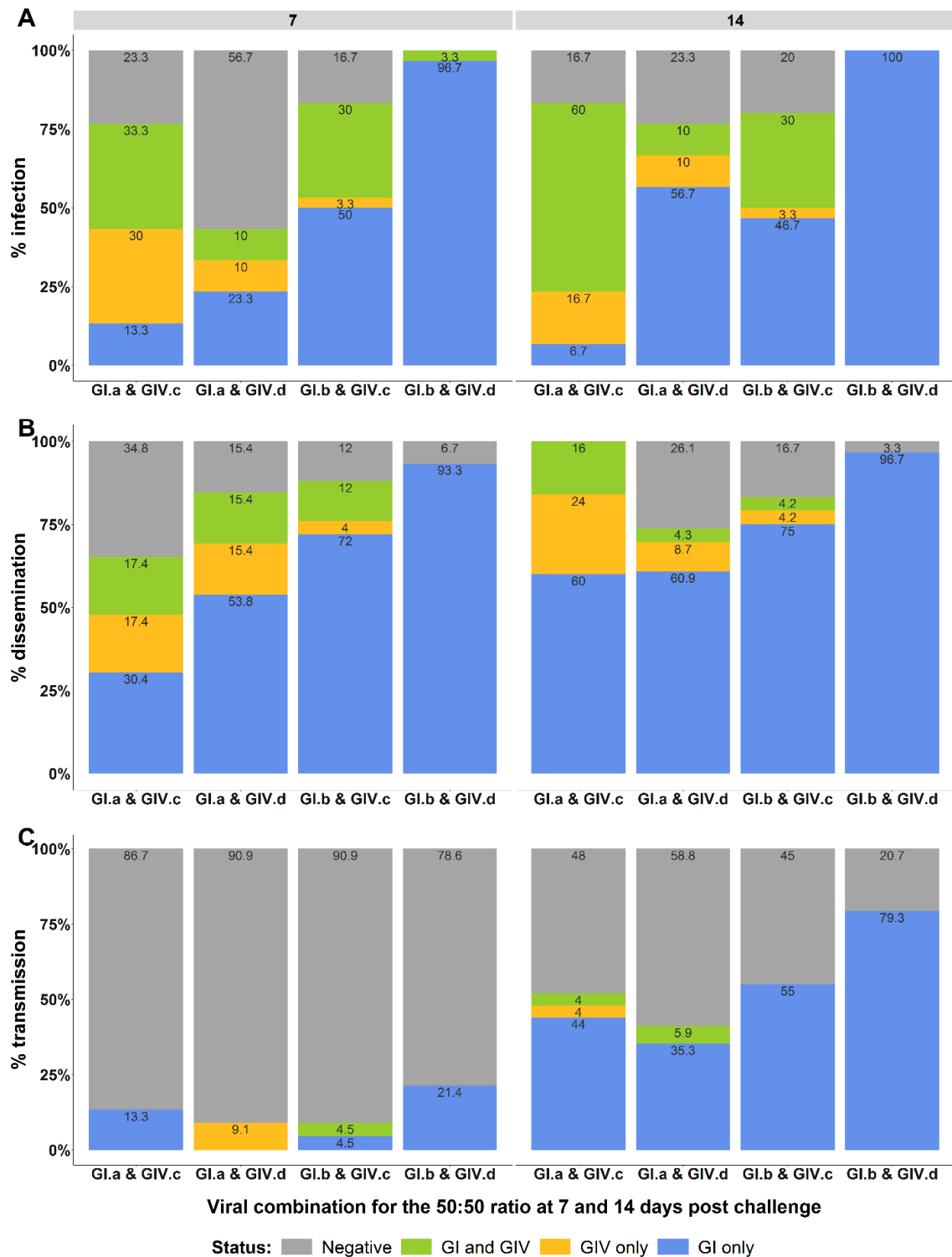
259
260 Phylogenetic analyses indicated that the last lineage replacement occurred in Cambodia
261 between 2005 and 2007 with an extinction of DENV-1 lineage L3 and an expansion of L4.
262 Lineage L4 then circulated until 2016 and co-circulated with lineage L5 since 2015. However,
263 no extinction of lineage L4 was observed during the period (Figure 1). Among the 21
264 Cambodian strains, five belong to this co-circulation period with three assigned to lineage L3
265 and two to lineage L4. Genotype replacement also occurred in NC in 2012 with a co-circulation
266 of both genotypes during this period, as observed previously [24]. Among the 33 NC DENV
267 strains collected for this study, nine belong to this co-circulation period with three strains falling
268 into genotype IV and six into genotype I. For *in vivo* competition assays, two strains of each
269 genotype from NC (GI and GIV) or lineage from Cambodia (L3 and L4) isolated during these
270 periods of co-circulation (2012 for NC and 2005-2007 for Cambodia) that favored the
271 expansion of the newly introduced genotype (GI for NC) or lineage (L4 for Cambodia) were
272 selected (Figure 1).

273 DENV-1 genotypes (GI and GIV) competition assays – Co-infection of *Ae. aegypti* mosquitoes
274 with DENV-1 GI and GIV from NC were performed using two strains of each DENV-1
275 genotype (GI.a, GI.b, GIV.c, GIV.d). DENV-1 was detected in mosquitoes either as mono-
276 infection of GI or GIV or as co-infection with GI and GIV from 7 days pc, regardless of the
277 initial ratio or viral combination (Figures 2 and 3).

278 With the 50:50 infectious ratio, infection rates ranged from 43.3% to 100% and from 76.7% to
279 100% at 7 and 14 days pc, respectively. A significant predominance of DENV-1 GI relative to
280 DENV-1 GIV was observed at 7 days pc for the two viral combinations with the GI.b isolate
281 (p -values = 0.001 and < 0.001, for GI.b & GIV.c and GI.b & GIV.d combinations, respectively).
282 At 14 days pc, a third viral combination also showed a significantly higher infection with
283 DENV-1 genotype I (p -values = 0.004, = 0.002 and = 0.002, for GI.a & GIV.d, GI.b & GIV.c

284 and GI.b & GIV.d, respectively) (Figure 2A). The same profile was observed for dissemination
285 rates with a significantly higher dissemination of DENV-1 GI for two and three out of the four
286 viral combinations at 7 and 14 days pc, respectively (p -values < 0.001 at 7 days pc for GI.b &
287 GIV.c and GI.b & GIV.d, and $= 0.01$, < 0.001 , < 0.001 at 14 days pc for GI.a & GIV.d, GI.b &
288 GIV.c and GI.b & GIV.d respectively) (Figure 2B). Viral transmission was detected at 7 and
289 14 days pc, ranging from 9% to 21.4% and 41.2% to 79.3%, respectively (Figure 2C). At 7 days
290 pc, only the viral combination GI.b & GIV.d showed a transmission advantage for DENV-1 GI
291 compared to DENV-1 GIV (p -values $= 0.04$). The DENV-1 GI was significantly better
292 transmitted compared to DENV-1 GIV at 14 days pc for the four combinations (p -values $= 0.01$,
293 $= 0.04$, $= 0.003$ and $= 0.003$ for GI.a & GIV.c, GI.a & GIV.d, GI.b & GIV.c and GI.b & GIV.d,
294 respectively).

295



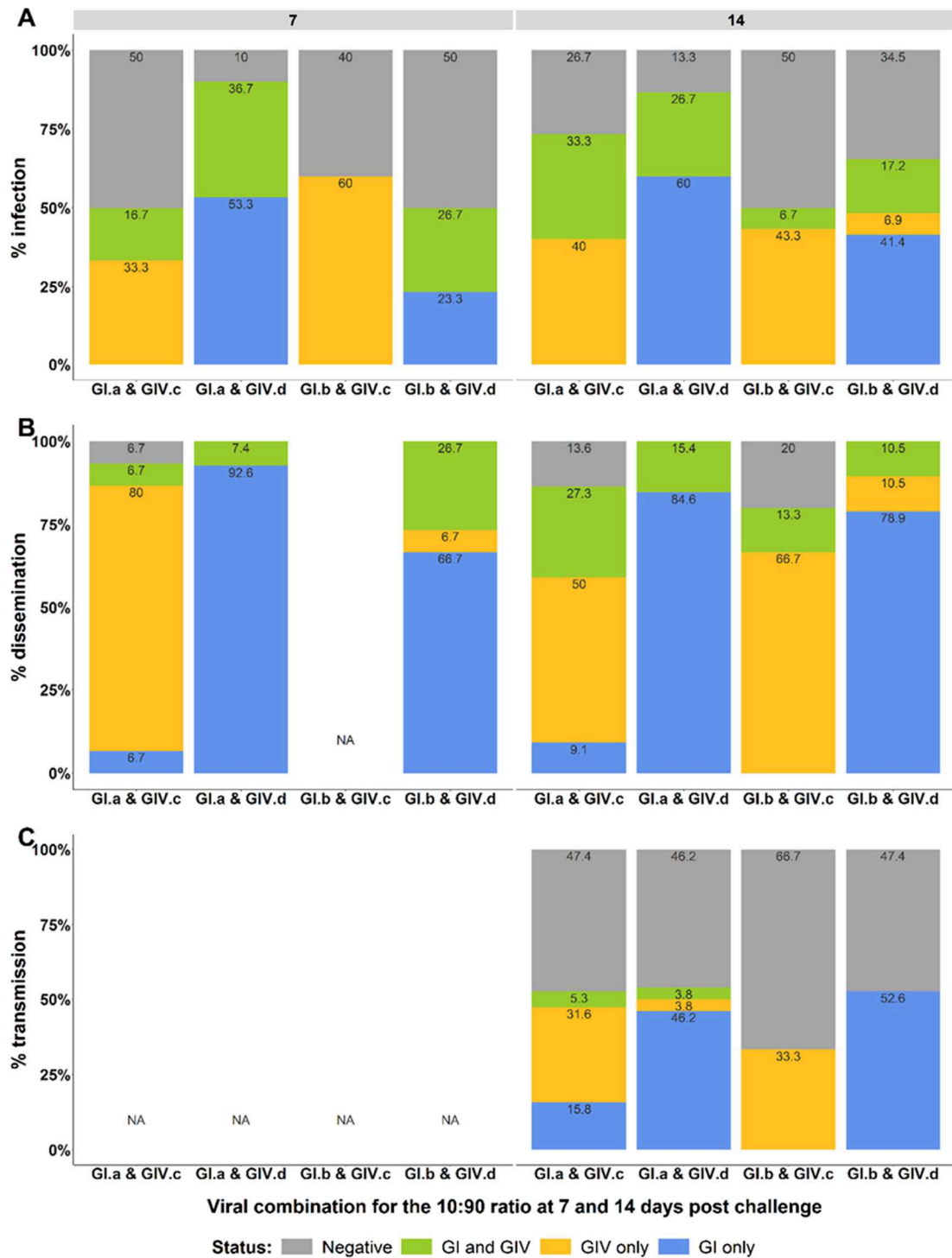
296

297 **Figure 2: Infection, dissemination and transmission rates of New Caledonian *Ae. aegypti***
 298 **mosquitoes obtained with the 50:50 infectious ratio.** *Ae. aegypti* F2 populations from
 299 Noumea were infected with a mixture of DENV-1 genotype I (GI.a or GI.b) and genotype IV
 300 (GIV.c or GIV.d) at 50:50 ratio. Infection rates (A), dissemination rates (B) and transmission
 301 rates (C) are represented. Status GI/GIV, GI or GIV corresponds to the detection by RT-qPCR
 302 of both targets, only GI or only GIV respectively in each mosquito compartment (body, head
 303 and saliva). No amplification for both targets was detected for negative status.

304

305 With the 10:90 infectious ratio in favor of DENV-1 GIV, results were more heterogeneous.
306 Infection rates ranged from 50% to 90% irrespective of the day pc. A significant predominance
307 of DENV-1 GIV infection compared to DENV-1 GI was observed for the two viral
308 combinations containing the GIV.c isolate regardless of the day pc (p -values = 0.004, < 0.001
309 and = 0.001, = 0.001 for GI.a & GIV.c and GI.b & GIV.c at 7 and 14 days pc, respectively).
310 Furthermore, no DENV-1 GI only infection was detected in these two viral combinations at 7
311 and 14 pc. Conversely, the two viral combinations containing the GIV.d isolate showed a
312 significant higher infection with DENV-1 GI irrespective of the GI isolate and the day post
313 challenge (p -values = <0.001, = 0.02 and < 0.001, =0.001 for GI.a & GIV.d and GI.b & GIV.d
314 at 7 and 14 days post challenge respectively) (Figure 3A). Although DENV-1 GIV was in
315 excess in these two viral combinations, no DENV-1 GIV only infected mosquitoes were
316 observed, except at 14 days pc for GI.b & GIV.d. Dissemination rates ranged from 93.3% to
317 100% and 80% to 100% at 7 and 14 days pc, respectively. The same profile as for the infection
318 rates was observed for all viral combinations. Heads from the combination GI.b & GIV.c at 7
319 days pc was not analyzed as only DENV-1 GIV was detected in infected mosquitoes (bodies).
320 Interestingly, for the GI.a & GIV.c viral combination, some infected mosquito heads were only
321 positive for DENV-1 GI despite the significant predominance of DENV-1 GIV (Figure 3B).
322 Viral transmission was assessed at 14 days pc for the four viral combinations. Transmission
323 rates were close to 50%, except for GI.b & GIV.c, which was 33%. DENV-1 GI was
324 significantly better transmitted compared to DENV-1 GIV for only one out the four viral
325 combinations (p -value = 0.01 for GI.a & GIV.d). Transmission of DENV-1 GI, however, was
326 also detected in two other viral combinations although no significant difference was detected.
327 No DENV-1 GI transmission was observed for GI.b & GIV.c (Figure 3C).

328



329

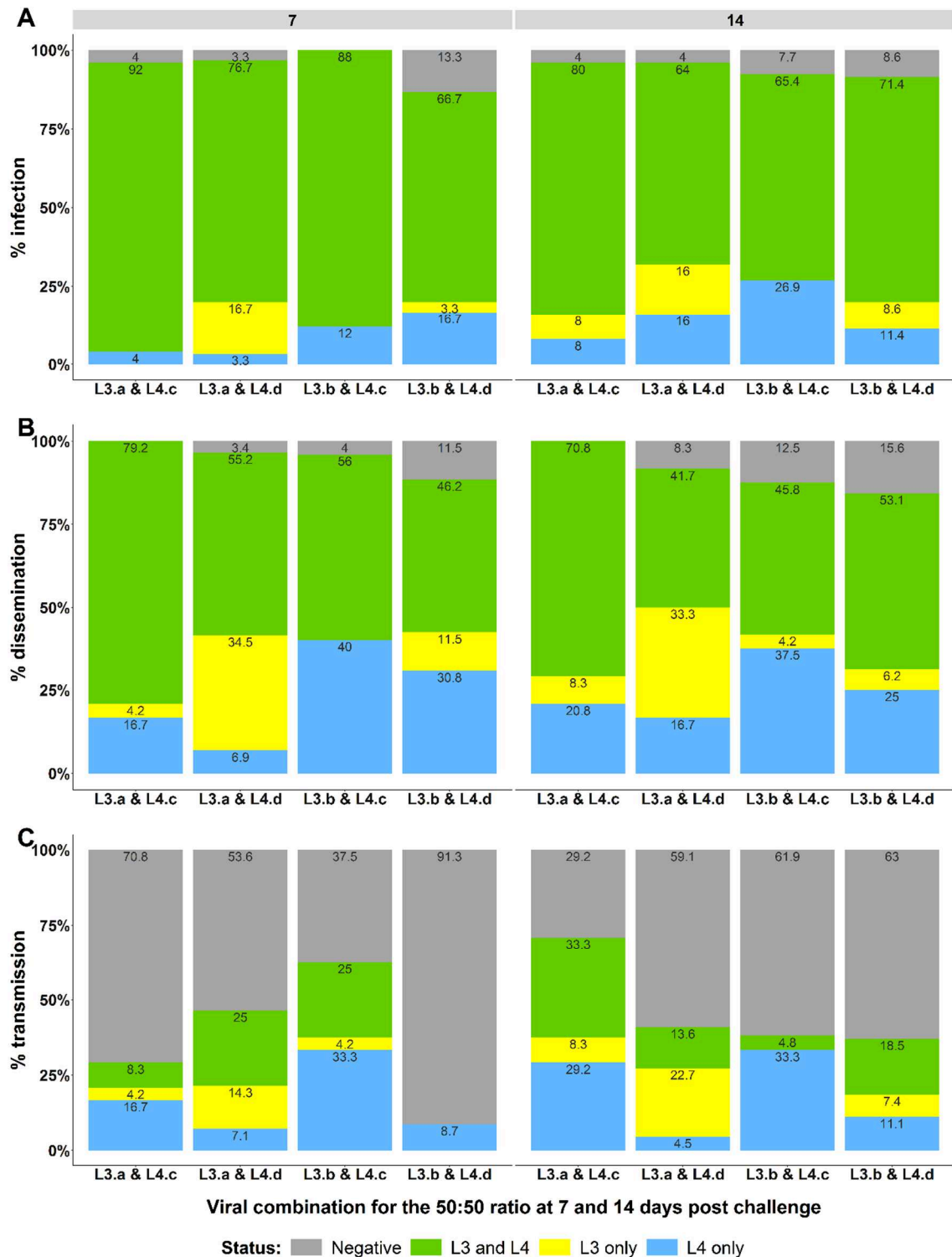
330 **Figure 3: Infection, dissemination and transmission rates of New Caledonian *Ae. aegypti***
 331 **mosquitoes obtained with the 10:90 infectious ratio.** *Ae. aegypti* F2 populations from
 332 Noumea were infected with a mixture of DENV-1 genotype I (GI.a or GI.b) and genotype IV
 333 (GIV.c or GIV.d) at 10:90 ratio. Infection rates (A) dissemination rates (B) and transmission
 334 rates (C) are represented. Status GI and GIV, GI or GIV corresponds to the detection by RT-
 335 qPCR of both targets, only GI or only GIV respectively in each mosquito compartment (body,
 336 head and saliva). No amplification for both targets was detected for negative status. NA: not
 337 analyzed.

338

339 DENV-1 genotype I lineages (L3 and L4) competition assays – Cambodian *Ae. aegypti*

340 mosquitoes were infected with a mixture of DENV-1 L3 (L3.a, L3.b) and L4 (L4.c, L4.d) at
341 50:50 ratio. All the four viral combinations showed an infection in mosquitoes from 7 days pc
342 whatever the initial ratio or viral combinations (Figures 4). DENV-1 was detected in mosquitoes
343 either as mono-infection of L3 or L4 or as co-infection with L3 and L4.

344 The infection rates were high (ranging from 86.7% to 100%) irrespective of the days pc.
345 Although DENV-1 L4 strains seemed to be mostly detected at higher percentage compared to
346 L3 in mosquitoes at 7 days pc and at 14 days pc, the difference was significant only for
347 combination L3.b & L4c at 14 days pc (p -value = 0.023) (Figure 4A). The dissemination profile
348 was similar to that of infection rate with a tendency to a greater dissemination of DENV-1 L4
349 in three out of the four viral combinations at 7 and 14 days pc. However, the percentage of
350 mosquitoes infected with L4 was significantly higher than that of L3 only for the combination
351 L3.b and L4.c (p -values = 0.004 and = 0.026 at 7 and 14 days pc, respectively) (Figure 4B).
352 Likewise, the transmission rate of DENV-1 L4 was significantly higher than that of L3 for the
353 combination L3.b and L4.c at 7 and 14 days pc (p -values = 0.045 and = 0.023, respectively)
354 (Figure 4C).



355

356 **Figure 4:** Infection, dissemination and transmission rates of Cambodian *Ae. aegypti*
 357 mosquitoes obtained with the 50:50 infectious ratio. *Ae. aegypti* F2 populations from Phnom
 358 Penh were infected with a mixture of DENV-1 lineage 3 (L3.a and L3.b) and lineage 4 (L4.c
 359 and L4.d) at 50:50 ratio. Infection rates (A), dissemination rates (B) and transmission rates (C)
 360 are represented. Status L3 and L4, L3 or L4 corresponds to the detection by RT-qPCR of both
 361 targets, only L3 or only L4 respectively in each mosquito compartment (body, head and saliva).
 362 No amplification for both targets was detected for negative status.

363 **Discussion**

364 A typical feature of DENV epidemiology is the fluctuation in dengue incidence and serotype
365 prevalence. In addition, rapid turnover of DENV genotypes and lineages is frequently observed
366 in DENV evolutionary dynamics. NC and Cambodia experienced such replacements [11, 24].
367 Detailed phylogenetic analyses performed on DENV-1 strains isolated in both countries
368 between 2005 and 2017 confirmed that NC experienced a genotype replacement in 2012.
369 Indeed, DENV-1 GI rapidly displaced DENV-1 GIV in 2012 during the cool season between
370 the two epidemic peaks [24]. All DENV-1 GI from NC belongs to lineage 5 along with
371 Cambodian strains isolated in 2014-2016. Our results also confirmed that Cambodia
372 experienced lineage replacements in 2002-2003 (L2 displaced L1) and 2005-2007 (L4
373 displaced L3) [11]. Whereas Cambodia has experienced frequent DENV lineage or genotype
374 replacements [11], the DENV-1 genotype replacement observed in 2012 is the first described
375 in NC [23].

376 To date, few studies examined the evolutionary mechanisms driving these DENV
377 genotype/lineage replacement events, and specifically focusing on the potential role of natural
378 selection. A previous study did not detect a significant difference in infection, dissemination
379 and transmission rates between DENV-1 GI or DENV-1 GIV in *Ae. aegypti* from NC orally
380 challenged by the two genotypes separately [33]. In competition assays, however, a fitness
381 advantage of DENV-4 on DENV-1 was shown in *Ae. aegypti* while no difference was observed
382 between the corresponding mono-infections, highlighting the value of assessing viral fitness in
383 mixed infection experiments [38]. More generally, competition assays are the gold standard in
384 viral fitness studies because they eliminate host-to-host variation that can reduce the power of
385 experiments with individual viral strain infections, and because the viral ratio can be assayed
386 with more accuracy than individual virus titers [39-41]. In this study, we experimentally tested
387 the hypothesis that genotype/lineage replacement events observed in NC and Cambodia were

388 associated with enhanced transmissibility of the replacing genotype/lineage relative to the
389 resident one. Our assessment relied on competition experiments in mosquitoes *in vivo* in which
390 we monitored the relative proportions of the competing DENV genotype/lineage to determine
391 their relative transmission fitness.

392 The results obtained in this study support the hypothesis that DENV-1 genotype or lineage
393 replacement observed in NC and Cambodia have been driven, at least in part, by viral fitness
394 differences in the vector. Indeed, a markedly higher transmission fitness was observed for
395 DENV-1 GI relative to GIV in NC. Provided at equal titer, three out of the four viral
396 combinations showed a competitive advantage for DENV-1 GI for the infection and
397 dissemination rates at 14 days pc. Moreover, all the four viral combinations showed a higher
398 fitness of DENV-1 GI at 14 days pc for the ultimate stage of vector competence, the
399 transmission rate. Interestingly, in mixed infection with 10-fold less amount of DENV-1 GI, a
400 higher transmission fitness of DENV-1 GI relative to GIV was also observed. This higher
401 transmission fitness could result from a better replication fitness from the invasive DENV
402 genotype at the early stage of mosquito infection. Although the difference is more subtle
403 between DENV-1 lineage L3 and L4, a slightly higher transmission fitness for DENV-1 L4
404 over L3 was observed in the same manner in Cambodia. Our results are in accordance with a
405 previous study showing that a DENV-1 clade replacement in Thailand was associated with
406 enhanced mosquito transmission [10]. Further, a previous study showed that the lineage
407 replacement of the DENV-2 Asian-American genotype in Nicaragua was associated with a
408 higher replicative index of the replacing NI-2B lineage over NI-1 lineage in *Ae. aegypti*
409 mosquitoes orally infected with both lineages as soon as three days post-infectious blood-meal
410 [20]. A difference in the production of subgenomic flaviviral RNA fragments (sfRNA), that
411 inhibit the interferon expression or disrupt the mosquito immunity, may explain the higher
412 transmission fitness. Indeed, DENV lineage replacements in Puerto-Rico and Nicaragua were

413 recently associated with increased production of sfRNAs by the invasive lineage in the human
414 host [42]. Likewise, another study focusing on DENV lineage replacement in Puerto-Rico
415 showed a link between higher epidemiological fitness and increased production of sfRNAs in
416 the vector [43]. Thus, this viral factor seems to play an important role in the epidemiological
417 fitness of DENV [44, 45], and also in the transmission of others arboviruses by their respective
418 vector, as observed for Zika virus or West Nile virus [46, 47].

419 Further studies are needed to complete our results and identify the mechanisms underlying the
420 observed fitness differences. Indeed, we demonstrated a better transmission fitness of the
421 invasive DENV-1 genotype I in the natural course of infection in the vector. All the results,
422 however, were expressed as RNA copies per mosquito, which do not directly reflect the
423 concentration of infectious viruses. DENV are known to produce a large amount of viral
424 defective genomes that could confound the results if their relative amount differed between
425 DENV genotypes/lineages. DENV epidemiologic fitness, defined as the capacity of a DENV
426 strain to become dominant in the field, relative to other DENV strains, depends on the
427 combination of replicative fitness and transmission fitness [48]. Our experimental design does
428 not allow us to investigate the replicative fitness strictly speaking as we did not measure the
429 capacity of the DENV used in this study to produce infectious progeny in the vector. Moreover,
430 in Cambodia, we cannot exclude the non-mutually exclusive alternative hypothesis that the
431 lineage replacement could also result from a stochastic event due to genetic drift [9, 49]. In a
432 same way, a purifying selection or vector genetic factors may also have contributed to
433 genotype/lineage replacement in both countries [31, 49, 50]. Furthermore, impact of population
434 herd-immunity were not assessed in this study although it may have partly conditioned this
435 genotype replacement observed in NC. Indeed recent analyses suggest that antigenic
436 heterogeneity may exist within each DENV serotype [18]. We can also hypothesize that the
437 human population of NC may be more susceptible to DENV-1 GI infection because of the

438 weaker protective immunity generated by DENV-1 GIV infection. Finally, selective forces
439 occurring in the human host may also be important drivers that shape the DENV epidemiologic
440 fitness. Indeed, higher transmission fitness of the invasive genotype observed within the vector
441 may not be preserved in the human host [51]. In NC, we can suppose, however, that the selection
442 of DENV-1 GI in the mosquito, in relation with the enhanced mosquito transmission potential,
443 had an impact on transmission with a higher probability of human-to-mosquito transmission as
444 described previously [13]. Indeed, a major outbreak occurred in 2013 following this genotype
445 replacement, and the circulation of DENV-1 GI was maintained until 2017 [23].

446 Although other selective and stochastic forces may also drive DENV evolution, our study
447 provides evidence that vector-driven selection may have contributed to the DENV-1
448 genotype/lineage replacement that occurred in NC and to a smaller extent, in Cambodia. To our
449 knowledge, few studies have assessed the transmission fitness of epidemiologically relevant
450 DENV strains by their native vector. We experimentally demonstrated the higher
451 transmissibility of the invading DENV strain using competition experiments that included
452 analyzes of mosquito saliva, which is the ultimate step of DENV transmission from the
453 mosquito to the human host. At the beginning of the vaccine era, our work highlights the needs
454 for a better understanding of the evolutionary mechanisms driving DENV genotype/lineage
455 replacements. These data are crucial as they may impact vaccine strategies by the complexity
456 of their antigenic properties.

457

458 **Acknowledgements**

459 This work was funded by the incentive grant, Inter-Pasteurian Concerted Actions (ACIP-06-
460 2016). LL and FA were supported by the European Union's Horizon 2020 research and
461 innovation programme under ZikaPLAN grant agreement no. 734584 and the French

462 Government's Investissement d'Avenir program Laboratoire d'Excellence Integrative Biology
463 of Emerging Infectious Diseases (grant ANR-10-LABX-62-IBEID). We gratefully thank the
464 center for translational science for its support in the deal with ethical procedures. We thank
465 Laurent Wantiez and Katie Anders for their helpful discussion on statistical approaches. We
466 also thank Louis Cognet for his contribution to samples handling.

467

468 **References**

- 469 1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global distribution
470 and burden of dengue. *Nature*. 2013;496(7446):504-7. Epub 2013/04/09.
- 471 2. WHO. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*.
472 Geneva: © World Health Organization.; 2009.
- 473 3. Holmes EC, Burch SS. The causes and consequences of genetic variation in dengue virus. *Trends*
474 *Microbiol*. 2000;8(2):74-7. Epub 2000/02/09.
- 475 4. Guzman MG, Halstead SB, Artsob H, Buchy P, Farrar J, Gubler DJ, et al. Dengue: a continuing
476 global threat. *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(12 Suppl):S7-16. Epub 2010/11/17.
- 477 5. Weaver SC, Vasilakis N. Molecular evolution of dengue viruses: contributions of phylogenetics
478 to understanding the history and epidemiology of the preeminent arboviral disease. *Infect Genet Evol*.
479 2009;9(4):523-40. Epub 2009/05/23.
- 480 6. Holmes EC, Twiddy SS. The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect*
481 *Genet Evol*. 2003;3(1):19-28. Epub 2003/06/12.
- 482 7. Zhang C, Mammen MP, Jr., Chinnawirotpisan P, Klungthong C, Rodpradit P, Monkongdee P, et
483 al. Clade replacements in dengue virus serotypes 1 and 3 are associated with changing serotype
484 prevalence. *J Virol*. 2005;79(24):15123-30. Epub 2005/11/25.
- 485 8. Bennett SN, Holmes EC, Chirivella M, Rodriguez DM, Beltran M, Vorndam V, et al. Selection-
486 driven evolution of emergent dengue virus. *Mol Biol Evol*. 2003;20(10):1650-8. Epub 2003/07/02.
- 487 9. Myat Thu H, Lowry K, Jiang L, Hlaing T, Holmes EC, Askov J. Lineage extinction and
488 replacement in dengue type 1 virus populations are due to stochastic events rather than to natural
489 selection. *Virology*. 2005;336(2):163-72. Epub 2005/05/17.
- 490 10. Lambrechts L, Fansiri T, Pongsiri A, Thaisomboonsuk B, Klungthong C, Richardson JH, et al.
491 Dengue-1 virus clade replacement in Thailand associated with enhanced mosquito transmission. *J*
492 *Virol*. 2012;86(3):1853-61. Epub 2011/12/02.
- 493 11. Duong V, Simmons C, Gavotte L, Viari A, Ong S, Chantha N, et al. Genetic diversity and lineage
494 dynamic of dengue virus serotype 1 (DENV-1) in Cambodia. *Infect Genet Evol*. 2013;15:59-68. Epub
495 2011/07/16.
- 496 12. Rico-Hesse R, Harrison LM, Salas RA, Tovar D, Nisalak A, Ramos C, et al. Origins of dengue type
497 2 viruses associated with increased pathogenicity in the Americas. *Virology*. 1997;230(2):244-51. Epub
498 1997/04/14.
- 499 13. Vu TT, Holmes EC, Duong V, Nguyen TQ, Tran TH, Quail M, et al. Emergence of the Asian 1
500 genotype of dengue virus serotype 2 in viet nam: in vivo fitness advantage and lineage replacement in
501 South-East Asia. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(7):e757. Epub 2010/07/24.
- 502 14. Messer WB, Gubler DJ, Harris E, Sivananthan K, de Silva AM. Emergence and global spread of
503 a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerg Infect Dis*. 2003;9(7):800-9. Epub 2003/08/06.

- 504 15. Wittke V, Robb TE, Thu HM, Nisalak A, Nimmannitya S, Kalayanrooj S, et al. Extinction and rapid
505 emergence of strains of dengue 3 virus during an interepidemic period. *Virology*. 2002;301(1):148-56.
506 Epub 2002/10/03.
- 507 16. Rico-Hesse R. Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*. 2003;59:315-41.
508 Epub 2003/12/31.
- 509 17. Gubler DJ, Clark GG. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health
510 problem. *Emerg Infect Dis*. 1995;1(2):55-7. Epub 1995/04/01.
- 511 18. Katzelnick LC, Fonville JM, Gromowski GD, Bustos Arriaga J, Green A, James SL, et al. Dengue
512 viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*. 2015;349(6254):1338-43. Epub
513 2015/09/19.
- 514 19. Forshey BM, Reiner RC, Olkowski S, Morrison AC, Espinoza A, Long KC, et al. Incomplete
515 Protection against Dengue Virus Type 2 Re-infection in Peru. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10(2):e0004398.
516 Epub 2016/02/06.
- 517 20. Quiner CA, Parameswaran P, Ciota AT, Ehrbar DJ, Dodson BL, Schlesinger S, et al. Increased
518 replicative fitness of a dengue virus 2 clade in native mosquitoes: potential contribution to a clade
519 replacement event in Nicaragua. *J Virol*. 2014;88(22):13125-34. Epub 2014/09/05.
- 520 21. Hanley KA, Nelson JT, Schirtzinger EE, Whitehead SS, Hanson CT. Superior infectivity for
521 mosquito vectors contributes to competitive displacement among strains of dengue virus. *BMC Ecol*.
522 2008;8:1. Epub 2008/02/14.
- 523 22. Anderson JR, Rico-Hesse R. *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting
524 genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*. 2006;75(5):886-92. Epub 2006/11/25.
- 525 23. Inizan C, Tarantola A, O'Connor O, Mangeas M, Pocquet N, Forfait C, et al. Dengue in New
526 Caledonia: Knowledge and Gaps. *Trop Med Infect Dis*. 2019;4(2). Epub 2019/06/23.
- 527 24. Dupont-Rouzeyrol M, Aubry M, O'Connor O, Roche C, Gourinat AC, Guigon A, et al.
528 Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001-
529 2013. *Virol J*. 2014;11:61. Epub 2014/04/02.
- 530 25. Simon O, Billot S, Guyon D, Daures M, Descloux E, Gourinat AC, et al. Early Guillain-Barré
531 Syndrome associated with acute dengue fever. *J Clin Virol*. 2016;77:29-31. Epub 2016/02/20.
- 532 26. Inizan C, O'Connor O, Worwor G, Cabemaiwai T, Grignon JC, Girault D, et al. Molecular
533 Characterization of Dengue Type 2 Outbreak in Pacific Islands Countries and Territories, 2017-2020.
534 *Viruses*. 2020;12(10). Epub 2020/10/01.
- 535 27. Huy R, Buchy P, Conan A, Ngan C, Ong S, Ali R, et al. National dengue surveillance in Cambodia
536 1980-2008: epidemiological and virological trends and the impact of vector control. *Bull World Health
537 Organ*. 2010;88(9):650-7. Epub 2010/09/25.
- 538 28. ASEAN e-Health Bulletin. The ASEAN dengue day: sustaining the united fight against dengue.
539 2017; Special edition for ASEAN Dengue Day 2017:[Available from:
540 [https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/06-e-Health-Bulletin-11th-Issue_ASEAN-
541 Website.pdf](https://reliefweb.int/sites/reliefweb.int/files/resources/06-e-Health-Bulletin-11th-Issue_ASEAN-Website.pdf).
- 542 29. Cousien A, Lédien J, Souv K, Leang R, Huy R, Fontenille D, et al. Predicting Dengue Outbreaks
543 in Cambodia. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(12):2281-3. Epub 2019/11/20.
- 544 30. Descloux E, Cao-Lormeau VM, Roche C, De Lamballerie X. Dengue 1 diversity and
545 microevolution, French Polynesia 2001-2006: connection with epidemiology and clinics. *PLoS Negl
546 Trop Dis*. 2009;3(8):e493. Epub 2009/08/05.
- 547 31. Klungthong C, Zhang C, Mammen MP, Jr., Ubol S, Holmes EC. The molecular epidemiology of
548 dengue virus serotype 4 in Bangkok, Thailand. *Virology*. 2004;329(1):168-79. Epub 2004/10/13.
- 549 32. Lourenço J, Recker M. Viral and epidemiological determinants of the invasion dynamics of
550 novel dengue genotypes. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(11):e894. Epub 2010/12/03.
- 551 33. O'Connor O, Calvez E, Inizan C, Pocquet N, Richard V, Dupont-Rouzeyrol M. Vector competence
552 of *Aedes aegypti* from New Caledonia for the four recent circulating dengue virus serotypes. *PLoS Negl
553 Trop Dis*. 2020;14(5):e0008303. Epub 2020/05/15.

554 34. Fontaine A, Lequime S, Moltini-Conclois I, Jiolle D, Leparç-Goffart I, Reiner RC, Jr., et al.
555 Epidemiological significance of dengue virus genetic variation in mosquito infection dynamics. *PLoS*
556 *Pathog.* 2018;14(7):e1007187. Epub 2018/07/14.

557 35. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment,
558 interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform.* 2019;20(4):1160-6. Epub 2017/10/03.

559 36. Nguyen LT, Schmidt HA, von Haeseler A, Minh BQ. IQ-TREE: a fast and effective stochastic
560 algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. *Mol Biol Evol.* 2015;32(1):268-74. Epub
561 2014/11/06.

562 37. R Foundation for Statistical Computing V, Austria. R Core Team. R: A language and environment
563 for statistical computing. 2016.

564 38. Vazeille M, Gaborit P, Mousson L, Girod R, Failloux AB. Competitive advantage of a dengue 4
565 virus when co-infecting the mosquito *Aedes aegypti* with a dengue 1 virus. *BMC Infect Dis.*
566 2016;16:318. Epub 2016/07/09.

567 39. Liu J, Liu Y, Shan C, Nunes BT, Yun R, Haller SL, et al. Role of mutational reversions and fitness
568 restoration in Zika virus spread to the Americas. *Nat Commun.* 2021;12(1):595. Epub 2021/01/28.

569 40. Grubaugh ND, Weger-Lucarelli J, Murrieta RA, Fauver JR, Garcia-Luna SM, Prasad AN, et al.
570 Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative
571 Fitness during Host Switching. *Cell Host Microbe.* 2016;19(4):481-92. Epub 2016/04/07.

572 41. Bergren NA, Haller S, Rossi SL, Seymour RL, Huang J, Miller AL, et al. "Submergence" of Western
573 equine encephalitis virus: Evidence of positive selection argues against genetic drift and fitness
574 reductions. *PLoS Pathog.* 2020;16(2):e1008102. Epub 2020/02/07.

575 42. Manokaran G, Finol E, Wang C, Gunaratne J, Bahl J, Ong EZ, et al. Dengue subgenomic RNA
576 binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science.*
577 2015;350(6257):217-21. Epub 2015/07/04.

578 43. Pompon J, Manuel M, Ng GK, Wong B, Shan C, Manokaran G, et al. Dengue subgenomic
579 flaviviral RNA disrupts immunity in mosquito salivary glands to increase virus transmission. *PLoS*
580 *Pathog.* 2017;13(7):e1006535. Epub 2017/07/29.

581 44. Finol E, Ooi EE. Evolution of Subgenomic RNA Shapes Dengue Virus Adaptation and
582 Epidemiological Fitness. *iScience.* 2019;16:94-105. Epub 2019/06/04.

583 45. Syenina A, Vijaykrishna D, Gan ES, Tan HC, Choy MM, Siriphanitchakorn T, et al. Positive
584 epistasis between viral polymerase and the 3' untranslated region of its genome reveals the
585 epidemiologic fitness of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(20):11038-47. Epub
586 2020/05/06.

587 46. Göertz GP, van Bree JWM, Hiralal A, Fernhout BM, Steffens C, Boeren S, et al. Subgenomic
588 flavivirus RNA binds the mosquito DEAD/H-box helicase ME31B and determines Zika virus transmission
589 by *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019;116(38):19136-44. Epub 2019/09/07.

590 47. Göertz GP, Fros JJ, Miesen P, Vogels CBF, van der Bent ML, Geertsema C, et al. Noncoding
591 Subgenomic Flavivirus RNA Is Processed by the Mosquito RNA Interference Machinery and Determines
592 West Nile Virus Transmission by *Culex pipiens* Mosquitoes. *J Virol.* 2016;90(22):10145-59. Epub
593 2016/10/30.

594 48. Wargo AR, Kurath G. Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. *Curr Opin*
595 *Virol.* 2012;2(5):538-45. Epub 2012/09/19.

596 49. Lequime S, Fontaine A, Ar Gouilh M, Moltini-Conclois I, Lambrechts L. Genetic Drift, Purifying
597 Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. *PLoS*
598 *Genet.* 2016;12(6):e1006111. Epub 2016/06/16.

599 50. Goncalvez AP, Escalante AA, Pujol FH, Ludert JE, Tovar D, Salas RA, et al. Diversity and evolution
600 of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology.* 2002;303(1):110-9. Epub 2002/12/17.

601 51. Vasilakis N, Deardorff ER, Kenney JL, Rossi SL, Hanley KA, Weaver SC. Mosquitoes put the brake
602 on arbovirus evolution: experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito
603 than vertebrate cells. *PLoS Pathog.* 2009;5(6):e1000467. Epub 2009/06/09.

604

605 **Supplementary Table 1:** GenBank accession number of all Dengue virus 1 used in the
606 alignment.

Number	Name of sequence	ID Genbank	Province	Country	Year
1	D1_AF514885_ARG_2000	AF514885		Argentina	2000
2	D1_AF311956_BRA_1997	AF311956		Brazil	1997
3	D1_MW265664_MDL_KHM_2016	MW265664	Mondulhiri	Cambodia	2016
4	D1_MW265665_TKM_KHM_2016	MW265665	Tbaung Khmom	Cambodia	2016
5	D1_MW265666_KCH_KHM_2016	MW265666	Kampong Cham	Cambodia	2016
6	D1_MW265667_SRP_KHM_2016	MW265667	Seam Reap	Cambodia	2016
7	D1_FJ639669_BTBT_KHM_2000	FJ639669	Battambang	Cambodia	2000
8	D1_FJ639670_PHP_KHM_2001	FJ639670	Phnom Penh	Cambodia	2001
9	D1_FJ639673_KCH_KHM_2001	FJ639673	Kampong Cham	Cambodia	2001
10	D1_FJ639674_KCH_KHM_2002	FJ639674	Kampong Cham	Cambodia	2002
11	D1_FJ639675_TAK_KHM_2003	FJ639675	Takeo	Cambodia	2003
12	D1_FJ639676_PHP_KHM_2003	FJ639676	Phnom Penh	Cambodia	2003
13	D1_FJ639677_KCH_KHM_2003	FJ639677	Kampong Cham	Cambodia	2003
14	D1_FJ639679_KCH_KHM_2003	FJ639679	Kampong Cham	Cambodia	2003
15	D1_FJ639682_PHP_KHM_2004	FJ639682	Phnom Penh	Cambodia	2004
16	D1_FJ639684_KSP_KHM_2005	FJ639684	Kampong Speu	Cambodia	2005
17	D1_FJ639685_BTBT_KHM_2005	FJ639685	Battambang	Cambodia	2005
18	D1_FJ639687_KCH_KHM_2006	FJ639687	Kampong Cham	Cambodia	2006
19	D1_FJ639688_KCH_KHM_2007	FJ639688	Kampong Cham	Cambodia	2007
20	D1_FJ639691_BTBT_KHM_2007	FJ639691	Battambang	Cambodia	2007
21	D1_FJ639693_KSP_KHM_2007	FJ639693	Kampong Speu	Cambodia	2007
22	D1_FJ639695_KCH_KHM_2007	FJ639695	Kampong Cham	Cambodia	2007
23	D1_GQ868618_KSP_KHM_2003	GQ868618	Kampong Speu	Cambodia	2003
24	D1_GQ868619_SRP_KHM_2003	GQ868619	Seam Reap	Cambodia	2003
25	D1_GQ868633_PHP_KHM_2008	GQ868633	Phnom Penh	Cambodia	2008
26	D1_GQ868635_KAN_KHM_2008	GQ868635	Kandal	Cambodia	2008
27	D1_GQ868637_TAK_KHM_2000	GQ868637	Takeo	Cambodia	2000
28	D1_GU131888_KCH_KHM_2006	GU131888	Kampong Cham	Cambodia	2006
29	D1_GU131893_KCH_KHM_2007	GU131893	Kampong Cham	Cambodia	2007

30	D1_GU131895_TAK_KHM_2009	GU131895	Takeo	Cambodia	2009
31	D1_GU131923_KCH_KHM_2005	GU131923	Kampong Cham	Cambodia	2005
32	D1_HM181942_KCH_KHM_2006	HM181942	Kampong Cham	Cambodia	2006
33	D1_HM181944_KCH_KHM_2007	HM181944	Kampong Cham	Cambodia	2007
34	D1_HM631852_KCH_KHM_2006	HM631852	Kampong Cham	Cambodia	2006
35	D1_MW265668_BTBT_KHM_2011	MW265668	Battambang	Cambodia	2011
36	D1_MW265669_PVG_KHM_2011	MW265669	Prey Veng	Cambodia	2011
37	D1_MW265670_PHP_KHM_2012	MW265670	Phnom Penh	Cambodia	2012
38	D1_MW265671_BTBT_KHM_2012	MW265671	Battambang	Cambodia	2012
39	D1_MW265672_PHP_KHM_2013	MW265672	Phnom Penh	Cambodia	2013
40	D1_MW265673_PHP_KHM_2014	MW265673	Phnom Penh	Cambodia	2014
41	D1_MW265674_TAK_KHM_2014	MW265674	Takeo	Cambodia	2014
42	D1_MW265675_KSP_KHM_2014	MW265675	Kampong Speu	Cambodia	2014
43	D1_MW265676_PHP_KHM_2014	MW265676	Phnom Penh	Cambodia	2014
44	D1_MW265677_BTBT_KHM_2015	MW265677	Battambang	Cambodia	2015
45	D1_MW265678_KCH_KHM_2015	MW265678	Kampong Cham	Cambodia	2015
46	D1_MW265679_KCH_KHM_2015	MW265679	Kampong Cham	Cambodia	2015
47	D1_DQ672557_PYF_2001	DQ672557		French Polynesia	2001
48	D1_AB074761_IDN_1988	AB074761		Indonesia	1988
49	D1_KC762651_IDN_2007	KC762651		Indonesia	2007
50	D1_AB204803_JPN_2004	AB204803		Japan	2004
51	D1_EF457905_MYS_1972	EF457905		Malaysia	1972
52	D1_GU131970_MEX_2007	GU131970		Mexico	2007
53	D1_MW265682_NCL_2009	MW265682	Nouméa	New Caledonia	2009
54	D1_MW265683_NCL_2009	MW265683	Nouméa	New Caledonia	2009
55	D1_MW265684_NCL_2009	MW265684	Nouméa	New Caledonia	2009
56	D1_MW265685_NCL_2009	MW265685	Mont_Dore	New Caledonia	2009
57	D1_MW265686_NCL_2010	MW265686	Houailou	New Caledonia	2010
58	D1_MW265687_NCL_2012	MW265687	Nouméa	New Caledonia	2012
59	D1_MW265688_NCL_2012	MW265688	Ponérihouen	New Caledonia	2012
60	D1_MW265689_NCL_2012	MW265689	Ouegoa	New Caledonia	2012

61	D1_MW265690_NCL_2012	MW265690	Mont_Dore	New Caledonia	2012
62	D1_MW265691_NCL_2012	MW265691	Nouméa	New Caledonia	2012
63	D1_MW265692_NCL_2012	MW265692	Nouméa	New Caledonia	2012
64	D1_MW265693_NCL_2012	MW265693	Maré	New Caledonia	2012
65	D1_MW265694_NCL_2012	MW265694	Dumbéa	New Caledonia	2012
66	D1_MW265695_NCL_2012	MW265695	Nouméa	New Caledonia	2012
67	D1_MW265696_NCL_2013	MW265696	Nouméa	New Caledonia	2013
68	D1_MW265697_NCL_2013	MW265697	Nouméa	New Caledonia	2013
69	D1_MW265698_NCL_2013	MW265698	Ile des Pins	New Caledonia	2013
70	D1_MW265699_NCL_2013	MW265699	Dumbéa	New Caledonia	2013
71	D1_MW265700_NCL_2014	MW265700	Mont_Dore	New Caledonia	2014
72	D1_MW265701_NCL_2014	MW265701	Nouméa	New Caledonia	2014
73	D1_MW265702_NCL_2014	MW265702	Nouméa	New Caledonia	2014
74	D1_MW265703_NCL_2014	MW265703	Nouméa	New Caledonia	2014
75	D1_MW265704_NCL_2014	MW265704	Nouméa	New Caledonia	2014
76	D1_MW265705_NCL_2014	MW265705	Koné	New Caledonia	2014
77	D1_MW265706_NCL_2014	MW265706	Hienghène	New Caledonia	2014
78	D1_MW265707_NCL_2014	MW265707	Nouméa	New Caledonia	2014
79	D1_MW265708_NCL_2014	MW265708	Nouméa	New Caledonia	2014
80	D1_MW265709_NCL_2016	MW265709	Nouméa	New Caledonia	2016
81	D1_MW265710_NCL_2016	MW265710	Mont_Dore	New Caledonia	2016
82	D1_MW265711_NCL_2016	MW265711	Koné	New Caledonia	2016
83	D1_MW265712_NCL_2017	MW265712	Nouméa	New Caledonia	2017
84	D1_MW265713_NCL_2017	MW265713	Nouméa	New Caledonia	2017
85	D1_MW265714_NCL_2017	MW265714	Nouméa	New Caledonia	2017
86	D1_JF937635_NIC_2009	JF937635		Nicaragua	2009
87	D1_DQ285560_REU_2004	DQ285560		Reunion	2004
88	D1_AF180817_THA_1964	AF180817		Thailand	1964
89	D1_DQ672564_USA_2001	DQ672564		United States	2001
90	D1_U88535_WestPac_1974	U88535		Western Pacific	1974

607

608 **Supplementary Table 2:** Primers and probes used for real-time quantitative RT-PCR assays
609 for the detection of DENV-1 genotypes I and IV and DENV-1, genotype I, lineages 3 and 4.
610 Primers were shared between systems and only the probes differed. Efficacy of the RT-PCR
611 and specificity of the probes were tested against the different lineages and genotypes used in
612 this study.

Oligonucleotide	Sequence (5'→3')	ORF position (KDH0030A)
DENV_NC_F	GGCATGCTAATAGCATGTTATG	4142-4162
DENV_NC_R	CTTCATGGTTCCATCATCTTG	4270-4290
DENV_NC_GI	FAM-CAGCCGACCTATCATTA-BHQ1	4178-4194
DENV_NC_GIV	FAM-CGGCCGATTATCACTG-BHQ1	4178-4194
DENV_CAM_F	TGGAACCGTTCTAGTGC	1791-1807
DENV_CAM_R	GTTCTGCCTCAATGTTGAC	1933-1951
DENV_CAM_L3	FAM-ACTCAGAATGGAAGACTGATAACAGC-BHQ1	1876-1901
DENV_CAM_L4	HEX-ACCCAGAATGGGAGATTGATAACAGC-BHQ2	1876-1901

613

CHAPITRE III : ETUDE DE L'IMPACT DE *WOLBACHIA* SUR LA FITNESS VIRALE DU DENV CHEZ LE VECTEUR *Ae. AEGYPTI*

3.1 CONTEXTE ET DEMARCHE EXPERIMENTALE

Au cours de ces dernières années, la circulation de la dengue s'est intensifiée en Nouvelle-Calédonie, avec des épidémies de plus en plus récurrentes et des cas détectés tous les ans. La gestion de ces épidémies représente un coût non négligeable pour le pays. En l'absence de traitement et de vaccin, le seul moyen de lutte contre la dengue est la lutte anti-vectorielle. En Nouvelle-Calédonie, une seule espèce est connue et expérimentalement démontrée comme vectrice de la dengue, *Ae. aegypti* (O'Connor et al., 2020). La stratégie de lutte actuelle repose essentiellement sur l'élimination mécanique des gîtes larvaires et le traitement par des insecticides. Cependant, cette stratégie atteint ses limites avec une importante augmentation de la résistance du vecteur à la deltaméthrine, principal insecticide utilisé au cours de ces cinq dernières années (Figure 17) (Pocquet et al., 2018).

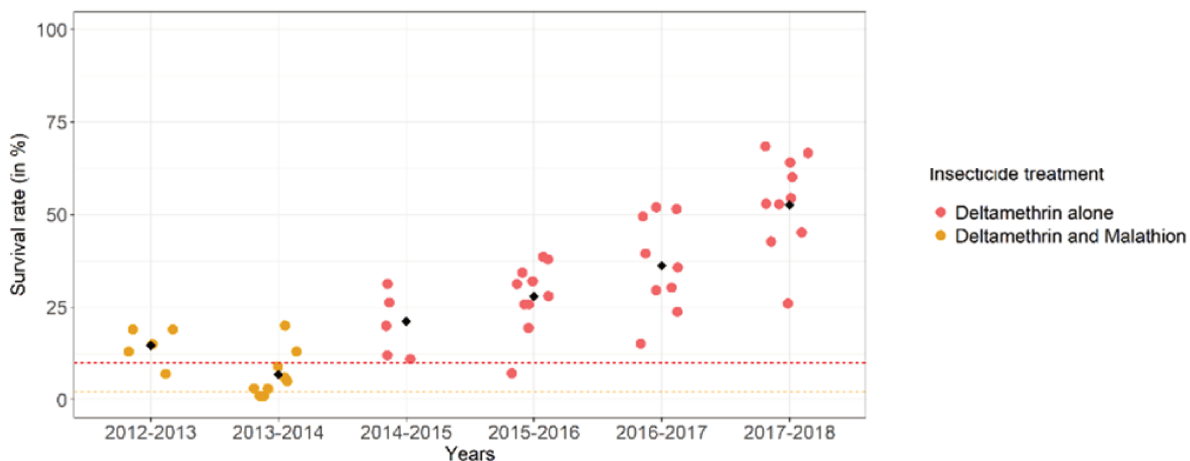


Figure 17. Evolution de la résistance d'*Ae. aegypti* à la deltaméthrine sur la ville de Nouméa entre 2012 et 2018.

Source : (Pocquet et al., 2018)

Une nouvelle stratégie de lutte, basée sur le lâcher dans l'environnement d'*Ae. aegypti* porteurs de la bactérie *Wolbachia* (*wMel*), a été déployée sur la ville de Nouméa, Nouvelle-Calédonie. En effet, des études ont démontré que les femelles *Ae. aegypti* infectées par *wMel*

étaient capables de réduire la réplication et la transmission du DENV, ainsi que d'autres arbovirus (Aliota et al., 2016a; Aliota et al., 2016b; Carrington et al., 2018; Dutra et al., 2016; Walker et al., 2011). L'efficacité de cette stratégie sur le terrain a notamment été démontrée à Cairns et Townsville en Australie et à Yogyakarta en Indonésie (Indriani et al., 2020; Ryan et al., 2019). Ainsi, en partenariat avec le World Mosquito Program (WMP), une souche calédonienne d'*Ae. aegypti* infecté par wMel (NC-wMel) a été générée par l'Institut Pasteur de la Nouvelle-Calédonie. Cependant, avant de pouvoir lâcher la souche NC-wMel sur le terrain, une évaluation globale du coût de la présence de la bactérie sur certains traits d'histoire de vie du moustique (fertilité, fécondité, taux de gorgement, susceptibilité aux insecticides) devait être réalisée, ainsi qu'une vérification des mécanismes de transmission maternelle de la bactérie *Wolbachia* et du phénomène d'incompatibilité cytoplasmique. De plus, la transmission virale de la dengue étant régie par les interactions G x G, elles-mêmes sous l'influence de l'environnement, il était nécessaire de vérifier sa capacité à réduire la transmission du DENV, CHIKV et ZIKV. Cette troisième partie de mes travaux de thèse avait ainsi pour objectif d'évaluer plus précisément l'impact de la bactérie *Wolbachia* introduite dans le vecteur calédonien sur la fitness répllicative et la fitness de transmission du DENV.

Pour mesurer la fitness de transmission du DENV chez la souche calédonienne NC-wMel, un isolat viral du DENV-2 génotype Cosmopolitain ayant circulé en 2017 en Nouvelle-Calédonie (Genbank MW585365) a été sélectionné. Des femelles d'une population calédonienne sauvage d'*Ae. aegypti* non porteuse de la bactérie *Wolbachia* (NC-WT) et des femelles de la population NC-wMel ont été artificiellement infectées par voie orale avec l'isolat du DENV-2 à un titre viral final de 1×10^7 FFU/mL. Les femelles pleinement gorgées ont été conservées à 28°C et 80% d'humidité sous un cycle jour/nuit de 12h : 12h avec un accès illimité à une solution sucrée à 10%. A 7 et 14 jours post-repas infectieux, une trentaine d'individus a été sacrifiée après la récolte des salives par une salivation forcée. Les corps et les salives de chaque individu ont été individuellement analysés par immunofluorescence après inoculation sur cellules C6/36 afin de déterminer la présence de particules virales infectantes et de les quantifier le cas échéant. Le taux d'infection correspond au nombre de corps infectés par le DENV par rapport à l'ensemble des moustiques analysés. L'efficacité de transmission correspond au nombre de salives dans lesquelles des particules virales du DENV ont été détectées par rapport à l'ensemble des moustiques analysés.

Pour déterminer la fitness répliquative du DENV au sein de la souche de moustiques NC-wMel, un isolat viral des quatre sérotypes de DENV utilisés comme virus de référence par le WMP a été utilisé : DENV-1 génotype I (Genbank FJ461335), DENV-2 génotype Cosmopolitain (Genbank EU482672), DENV-3 génotype II (Genbank KT452792) et DENV-4 génotype I (Genbank KT452802). Des femelles des populations NC-WT et NC-wMel, ainsi que des femelles des populations de référence du World Mosquito Program (AUS-Tet, *Ae. aegypti* australien dont la bactérie *Wolbachia* a été éliminée par traitement à la tétracycline, et AUS-wMel, *Ae. aegypti* australien porteur de la bactérie *Wolbachia*) ont été artificiellement infectées par injection intra-thoracique avec l'un des quatre isolats viraux (titre viral final avoisinant 1×10^5 TCID50/mL). Les femelles ont ensuite été conservées à 26°C et 65% d'humidité sous un cycle jour/nuit de 12h :12h avec un accès illimité à une solution sucrée à 10% pendant 7 jours. Au septième jour d'incubation, les moustiques entiers ont été analysés par RT-PCR en temps réel afin de déterminer le nombre de moustiques infectés par le DENV et de quantifier, le cas échéant, le nombre de copies d'ARN viral présentes (Fraser et al., 2017; Ritchie et al., 2013).

Pour ce travail j'ai réalisé les infections expérimentales nécessaires à la mesure de la fitness de transmission virale chez les populations d'*Ae. aegypti* NC-WT et NC-wMel, avec l'aide du personnel de l'unité et d'une stagiaire en Master 2. Par ce travail collaboratif avec l'Université de Monash (Melbourne, Australie), j'ai également bénéficié d'un transfert de compétence portant sur les aspects de l'injection intrathoracique des moustiques. J'ai enfin participé à la rédaction du manuscrit correspondant (publication 3), et, dans ce cadre, ma contribution a plus précisément consisté en l'écriture de l'ensemble des parties concernant les infections expérimentales de moustiques.

3.2 RESULTATS ET CONCLUSIONS

Les résultats de cette étude seront prochainement soumis dans le journal « PLOS Neglected Tropical Diseases » : **Towards the end of dengue outbreak in New Caledonia : assessment of the local *Aedes aegypti* wMel strain.**

Les résultats concernant l'étude de la fitness de transmission du DENV-2 ont mis en évidence que les moustiques NC-wMel étaient significativement moins susceptibles à l'infection par le DENV-2 que les moustiques sauvages NC-WT, avec des taux d'infection

inférieurs à 40% et supérieurs à 90% respectivement (quel que soit le jour d'analyse post-repas infectieux). Des particules virales du DENV-2 ont été détectées dans les salives de moustiques NC-WT (avec une efficacité de transmission inférieure à 20%). A contrario, aucune salive n'a été détectée positive pour le DENV-2 chez les moustiques NC-wMel, marquant une absence de transmission du virus par le vecteur dans nos conditions.

Les résultats concernant l'étude de la fitness répliquative du DENV au sein du vecteur ont montré que les moustiques porteurs de la bactérie *Wolbachia*, NC-wMel et AUS-wMel, étaient significativement moins infectés par le DENV (tous sérotypes confondus) par rapport aux moustiques indemnes de *Wolbachia*, NC-WT et AUS-Tet, respectivement. Chez les moustiques NC-wMel et AUS-wMel, les taux d'infection n'excédaient pas 33%, excepté pour DENV-3 où le taux d'infection atteignait 55% et 51% respectivement. En termes de quantité de copies d'ARN viral détectées, la charge virale était elle aussi significativement plus faible chez les moustiques NC-wMel et AUS-wMel, quel que soit le sérotype incriminé, comparée aux moustiques NC-WT et AUS-Tet. Une réduction d'environ un log de la charge virale a été observée chez les moustiques porteurs de la bactérie *Wolbachia*.

Cette étude confirme que la présence de la bactérie *Wolbachia* chez le vecteur a un impact sur la fitness répliquative du DENV, ainsi que sur sa fitness de transmission. En effet, l'importance de l'environnement intra-hôte, associé ici à la bactérie intracellulaire *Wolbachia*, a pu être explorée dans cette interaction G x G au sein d'un environnement contrôlé. Les résultats démontrent une réduction de la susceptibilité des moustiques NC-wMel à l'infection par le DENV-2. En parallèle de cette réduction de fitness de transmission du DENV-2 lors de sa transmission au vecteur, une réduction de la fitness répliquative du DENV-2, ainsi que des autres sérotypes de DENV, est observée. Ainsi, la bactérie *Wolbachia* impacte fortement la fitness de transmission du DENV chez le vecteur calédonien dès l'étape d'infection de l'épithélium digestif du moustiques. Bien que certains moustiques aient présenté une infection virale à la suite de la prise du repas sanguin infectieux, aucune transmission virale n'a été observée. On peut donc en conclure, qu'en plus d'impacter la transmission du DENV lors de son passage chez le vecteur, la bactérie impacterait également le virus lors de sa transmission à l'hôte humain. Toutefois, l'évaluation de la compétence vectorielle d'une population de moustiques au laboratoire ne donne qu'une approximation de ce qui se passe dans la nature. En effet, de nombreux paramètres influençant la transmission virale, comme

par exemple la capacité vectorielle ou encore des facteurs de l'hôte humain, ne sont pas pris en compte. Une récente étude a notamment mis en évidence que des *Ae. aegypti* porteurs de la bactérie *Wolbachia*, nourris directement sur des personnes virémiques pour le DENV, développaient une infection virale avec, dans quelques cas, une détection de virus infectieux dans la salive de ces moustiques (Carrington et al., 2018). De plus, une étude a montré que, à un niveau équivalent de virémie, les personnes présentant une forme asymptomatique de la dengue possèderaient un meilleur potentiel de transmission du virus au vecteur, comparé aux personnes symptomatiques (Duong et al., 2015). Ces études soulignent l'importance d'approfondir les recherches sur les facteurs influençant la transmission virale en prenant en compte des paramètres proche du terrain.

3.3 PUBLICATION 3

1 **Title**

2 **Towards the end of dengue outbreak in New Caledonia: assessment of the local *Aedes***
3 ***aegypti* wMel strain.**

4

5 **Short title**

6 New Caledonia *Aedes aegypti* wMel strain

7

8 **Authors**

9 Nicolas Pocquet ¹, Olivia O'Connor ², Heather A. Flores ³, Jordan Tutagata ¹, Morgane Pol ¹,
10 David J. Hooker ³, Catherine Inizan ², Sylvie Russet ⁴, Johanna M. Duyvestyn ³, Etiene C.
11 Pacidônio ³, Dominique Girault ², Marine Minier ², Daniela da Silva Gonçalves ³, Cameron P.
12 Simmons ^{3,5,6}, Myrielle Dupont-Rouzeyrol ^{2,*}, Nadège Rossi ^{4,*}

13

14 1. URE Medical Entomology, Institut Pasteur of New Caledonia, Noumea, New Caledonia

15 2. URE Dengue and Arboviruses, Institut Pasteur of New Caledonia, Noumea, New Caledonia

16 3. World Mosquito Program, Institute of Vector-Borne Disease, Monash University,
17 Melbourne, Victoria, Australia

18 4. World Mosquito Program, Institut Pasteur of New Caledonia, Noumea, New Caledonia

19 5. Oxford University Clinical Research Unit, Ho Chi Minh City, Vietnam

20 6. Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Oxford, United Kingdom

21

22 Corresponding author: Nicolas Pocquet npocquet@pasteur.nc

23

24 * These authors equally contributed to this work.

25

26

27 **Abstract (250-300 words)**

28 **Background:** Biological control programs involving *Wolbachia*-infected *Aedes aegypti* are
29 currently deployed in different epidemiological settings. New Caledonia (NC) is an ideal
30 place for the implementation and evaluation of such strategy as the only proven vector for
31 dengue is *Ae. aegypti*, dengue virus (DENV) outbreaks are frequent with increased frequency
32 and severity. We present here the constitution and the results of the NC-*wMel* *Ae. aegypti*
33 strain regarding vector competence and fitness determinants allowing the implementation of
34 the *Wolbachia* strategy in Noumea, NC.

35 **Methods/Principal findings:** The NC *Wolbachia* strain (NC-*wMel*) was obtained by
36 backcrossing Australian AUS-*wMel* females with NC-WT males. Blocking of DENV,
37 chikungunya (CHIKV) and Zika (ZIKV) viruses were evaluated via mosquito oral feeding
38 experiments and intrathoracic DENV challenge. Significant reduction infection rates were
39 observed for NC-*wMel* *Ae. aegypti* compared to WT *Ae. aegypti*. Maternal transmission,
40 cytoplasmic incompatibility, fertility, blood feeding rate, fecundity, wing length and
41 insecticide resistance were assessed. *Ae. aegypti* NC-*wMel* showed complete cytoplasmic
42 incompatibility and maternal transmission. No significant fitness impact was observed in *Ae.*
43 *aegypti* NC-*wMel* compared to NC-WT *Ae. aegypti* and AUS-*wMel* *Ae. aegypti* except for
44 fertility and fecundity.

45 **Conclusions/significance:** Our results demonstrated that the NC-*wMel* *Ae. aegypti* strain is a
46 strong inhibitor of DENV, CHIKV and ZIKV infection, and prevent transmission of
47 infectious viral particles in mosquito saliva. Furthermore, our NC-*wMel* *Ae. aegypti* strain
48 induces reproductive cytoplasmic incompatibility with minimal apparent fitness costs and
49 high maternal transmission, supporting field-releases in Noumea, NC.

50

51

52 **Author summary (150-200 words)**

53 Dengue represents a risk for almost half of the world's population, especially throughout the
54 tropics. In New-Caledonia, dengue outbreaks have become more frequent in the past decade
55 along with the recent circulation of chikungunya and Zika viruses. The opportunity to use the
56 biocontrol method involving the release of *Wolbachia* infected *Ae. aegypti* mosquitoes has
57 been investigate as an alternative solution to the traditional control methods which are
58 becoming insufficient.

59 A local strain of *Ae. aegypti* carrying *Wolbachia* (NC-wMel) has been generated and tested to
60 evaluate its pathogen blocking capacity for the four types of dengue virus as well as
61 chikungunya and Zika viruses. The fitness of NC-wMel strain has also been assessed to
62 estimate its ability to compete with the wild-type strain in the field.

63 Noumea city, which gathers a third of the population of New Caledonia, has been chosen as
64 the pilot site to implement the method. As *Ae. aegypti* is the only proven vector in New
65 Caledonia, we expect a significant impact on dengue outbreaks occurring in Noumea as soon
66 as NC-wMel population will be established.

67

68 **Introduction**

69 With an estimated 390 million infected people per year, dengue still represents a major public
70 health problem throughout the tropics [1]. Dengue infection is a re-emerging disease caused by
71 dengue virus (DENV) belonging to the genus *Flavivirus*. DENV is transmitted to humans by
72 the bite of infected mosquitoes from the genus *Aedes*. DENVs are divided in 4 serotypes
73 (DENV-1 to -4), and infection with one serotype is thought to provide life-long protection from
74 reinfection with the same serotype but does not prevent secondary infection by another
75 serotype. The spectrum of dengue clinical presentations is broad, ranging from asymptomatic
76 to severe, sometimes fatal [1].

77 New Caledonia (NC), a French island territory located in the subtropical Pacific region with a
78 population of approximately 280,000, is highly concerned by dengue outbreaks. In the past
79 decade, DENV circulation has increased in NC, causing recurrent outbreaks with cases detected
80 every year along with chikungunya virus (CHIKV) and Zika virus (ZIKV) circulation [2].
81 During the three last major DENV outbreaks in 2008-2009, 2012-2013 and 2016-2018, the NC
82 Health Authorities reported 9,589, 11,240 and 7,266 DENV cases, respectively. To date in NC,
83 the only to date proven vector of DENV is *Aedes aegypti* and until recently, the only means of
84 fighting against dengue were only based on regular public prevention campaigns and vector
85 control, through breeding site destruction and insecticide spraying. Although these campaigns
86 have decreased the number of breeding sites and mosquitoes [2], this decrease was not sufficient
87 to avoid dengue circulation. Furthermore, insecticide (deltamethrin) spraying has also showed
88 its limit, as resistances to deltamethrin has evolved in all populations of *Ae. aegypti* from
89 Noumea [3], rendering this method less efficient.

90 Given these observations, new vector control strategies were needed, and for this purpose the
91 World Mosquito Program has been identified as a promising strategy. This innovative method
92 is based on the release of *Wolbachia*-infected *Ae. aegypti* mosquitoes in the environment.

93 *Wolbachia* is a Gram-negative bacterium mostly present in arthropods with more than 40-65%
94 of insect species harbouring *Wolbachia* [4,5]. Mainly transmitted vertically, this bacterium can
95 manipulate the host reproduction in order to maximize its maternal transmission through the
96 eggs. In order to favour females, *Wolbachia* can induce parthenogenesis, feminization, male-
97 killing, and cytoplasmic incompatibility (CI) [6]. CI is the most common manipulation and
98 occurs when *Wolbachia*-infected males mate with uninfected females resulting in the lethality
99 of offspring. *Wolbachia*-infected females can rescue the lethality providing them a reproductive
100 advantage over uninfected females. *Wolbachia* can also alter responses to infections to reduce
101 arbovirus transmission. As an example, *Wolbachia* in *Ae. aegypti* limits infection with dengue,
102 chikungunya, or Zika viruses [7–11]. Combining their ability to invade the host population by
103 inducing CI and to interfere negatively with the transmission of disease pathogens, *Wolbachia*-
104 based control methods have been deployed to prevent the transmission of mosquito-borne
105 diseases. The goal is to establish *Wolbachia* in wild mosquito vector populations and so
106 interrupting local virus transmission from mosquito to humans as *Ae. aegypti* carrying
107 *Wolbachia* have a lower transmission potential for arboviruses [7,8].

108 This method is interesting for NC for the following reasons: (i) the targeted mosquito species
109 is *Ae. aegypti*, which is the only known DENV vector in NC to date [12], (ii) the method has
110 already shown its efficiency elsewhere [13,14], (iii) the implementation of this method is
111 considered to be safe for humans, animals and the environment [15] and (iv) this method is self-
112 sustaining through the cytoplasmic incompatibility and maternal transmission phenotypes
113 which promotes the maintenance of *Wolbachia* in mosquito populations [16].

114 As highlight by [17], before being released, the *Wolbachia*-transinfected *Ae. aegypti* strain has
115 to be tested to ensure its strong protection against virus replication, to demonstrate high levels
116 of Maternal Transmission (MT) of *Wolbachia* as well as CI. It is also necessary to assess the
117 fitness cost of the bacteria on mosquitoes which could disadvantage the introgression of

118 *Ae. aegypti* that carry *Wolbachia*. Here we present the results obtained from the *Wolbachia*-
119 transinfected *Ae. aegypti* Noumea strain regarding its capacity to reduce the transmission risk
120 of ZIKV, CHIKV and the four serotypes of DENV. MT of *Wolbachia* as well as CI and fitness
121 through fertility, fecundity and wing size have been assessed. We also measured insecticide
122 resistance as insecticide spraying strategy will continue until *Wolbachia* has been established
123 in the mosquito population.

124

125 **Methods**

126 **Mosquito rearing**

127 All strains were reared and maintained in a controlled laboratory environment, at $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$
128 and $80\% \pm 10\%$ relative humidity, with a 12:12 light: dark photoperiod. A 10% sucrose solution
129 was provided to adults. Females were blood-fed with human blood twice a week (every 3 or
130 4 days) with artificial membrane feeding systems (Hemotek®, United Kingdom). The eggs-
131 cups, with wet filter paper, were changed at each blood feeding and kept in a humid atmosphere
132 for 48 h to allow embryos to fully develop before being dried. Hatching solution was prepared
133 24 h ahead of time, with 1 L of pre-boiled water and 0.2 g of tetramin (Tetra, Melle, Germany).
134 Synchronous hatching was induced by placing eggs in the hatching solution for 24 h, at room
135 temperature. Then, larvae were allocated in trays to obtain a density of 100 larvae for 1.5 L of
136 tap water. Larvae were fed *ad libitum* with a mix of 10% of yeast and 90% of Protinova™
137 (defatted dry powder made of *Hermetia illucens* larvae, supplied by Innova Feed).

138

139 **Mosquito strains**

140 The origin, status of *Wolbachia* infection and use of each strain are summarized in Table 1. The
141 New Caledonia wild type strain (NC-WT) was established from larvae collected twice in the

142 field at the same location, in Noumea, New Caledonia, in June and November 2018. This strain
143 was maintained under laboratory conditions for a maximum of two generations.

144 The Australian *wMel* strain previously described [7,18] named AUS-*wMel* in this article was
145 used for backcrossing and as a control for vector competence and fitness determinants assays.

146 The New Caledonia *Wolbachia* strain (NC-*wMel*) was obtained by backcrossing AUS-*wMel*
147 females with NC-WT males. These six backcrosses were made in order to obtain a strain
148 infected with *wMel* that was genetically similar to New Caledonia WT mosquitoes. Briefly, the
149 first backcross was made between 250 NC-WT males and 250 AUS-*wMel* females. Then, the
150 5 following backcrosses were made between 250 NC-WT males and 250 female progeny from
151 the previous cross. In order to ensure virginity, pupae were sexed and sorted according to size
152 and only virgin adults were used. *Wolbachia* frequency was checked at each generation of
153 backcross on 160 females of 3-5 days old by quantitative PCR (qPCR) to ensure the quality of
154 the strain. When the 6 backcrosses were completed, the NC-*wMel* strain was maintained in our
155 laboratory.

156 The first generation of NC-*wMel* strain after the completion of backcrossing (G0) was used for
157 fitness assays. The NC-*wMel* from generation G0 and NC-WT were used for the infected blood
158 meal experiments. NC-*wMel* mosquitoes from generations G2-G5 and NC-WT mosquitoes
159 were used for intrathoracic injection experiments and the results were compared to those
160 obtained for AUS-*wMel* and a tetracycline-treated version of this line (AUS-Tet) cured of
161 *Wolbachia* as described previously [17].

162 Finally, the Bora strain, an *Ae. aegypti* laboratory strain, has been used as an insecticide-
163 sensitive control for deltamethrin resistance tests [19].

164

165 **Table 1: Origin, status of *Wolbachia* infection and use of *Aedes aegypti* strains.**

Strain	Origin	Year of collection/creation	<i>Wolbachia</i> infection status	Type of experiment	Reference
NC-WT	Noumea, New Caledonia	2018	No	BC, AIBF, II, FC, IR	This study
NC-wMel	Noumea, New Caledonia	2018	Yes	AIBF, II, FC, IR	This study
AUS-wMel	Townsville, Australia	2011*	Yes	BC, AIBF, II, FC	[7]
AUS-Tet	Townsville, Australia	2016	No	II	[17]
Bora	Bora-Bora, French Polynesia	The 90s	No	IR	[19]

166 BC: Backcrossing; AIBF: Artificial Infectious Blood Feeding; II: Intrathoracic Injection; FC: Fitness Check; IR:
 167 Insecticide Resistance.

168 * The original line generated in 2011 has been outcrossed to Australian WT populations over time.
 169

170 ***Wolbachia* detection by qPCR**

171 DNA was isolated from mosquitoes as previously described [20] and added to the PCR reaction.
 172 PCR confirmation of mosquito tissue samples for *Wolbachia* infection status was performed
 173 using a duplex PCR targeting the *Wolbachia*-specific *wsp* gene and *Ae. aegypti*
 174 housekeeping *RpS17* gene [21]. For each sample, qPCR was performed using a LightCycler
 175 480 II Instrument (Roche) using LightCycler 480 Probe Master (Roche).

176

177 **Viruses and cells**

178 DENV isolates and one representative strain of CHIKV and ZIKV were used in this study.
 179 Asian isolates of DENV-1 to 4 were obtained from the World Reference Center for Emerging
 180 Viruses and Arboviruses (WRCEVA) and from the Oxford University Clinical Research Unit,
 181 Vietnam. New Caledonian isolates of DENV-2 (this study), CHIKV [22] and ZIKV [23] were
 182 viral strains isolated from human sera [12] and representative of recent arboviruses circulation
 183 in New Caledonia. Virus genotype and origin are listed in Table 2.

184 For mosquito artificial infectious blood feeding experiments, viruses were amplified on VERO
185 E6 cells. Supernatants were harvested 3, 5 and 7 days after infection for CHIKV, ZIKV and
186 DENV respectively. Virus titers were determined by TCID₅₀ for CHIKV and ZIKV on VERO
187 E6 cells, and by immune-fluorescent focus assay for DENV on *Aedes albopictus* C6/36 cells
188 using the anti-dengue virus complex antibody, clone D3-2H2-9-21 (Millipore), and Alexa Fluor
189 488 goat anti-mouse IgG (Invitrogen, ThermoFisher Scientific). VERO E6 cells were grown at
190 37 °C with 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco, ThermoFisher)
191 supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco, ThermoFisher).
192 C6/36 cells were maintained at 28 °C in Leibovitz medium (Sigma-Aldrich) supplemented with
193 5% FBS and 10% tryptose phosphate broth (Gibco, ThermoFisher).

194 For mosquito intrathoracic injection experiments, viral stock production of DENV were
195 obtained by infection of C6/36 cells at MOI 0.1 and harvest of supernatant 7 days later. DENV
196 concentrations were then determined by TCID₅₀ using monoclonal antibody 4G2 (provided by
197 Roy Hall), followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibodies, and TMB
198 substrate. C6/36 cells were maintained at 28 °C with 5% CO₂ in RPMI medium (Gibco,
199 ThermoFisher) supplemented with 10% FBS (Gibco, ThermoFisher), 1% GlutaMAX (Gibco,
200 ThermoFisher) and 2% HEPES (Gibco, ThermoFisher).

201

202 **Table 2: List of virus isolates, their origins and infecting dose used in this study**

Strain	Genotype	Isolated	GenBank Acc. #	Obtained from	Used in	Titer used for mosquitoes infected experiments
DENV-1	Genotype I	Vietnam 2008	FJ461335	WRCEVA	II	1.2 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
DENV-2	Cosmopolitan	Vietnam 2006	EU482672	WRCEVA	II	3.4 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
DENV-3	Genotype II	Myanmar 2008	KT452792	WRCEVA	II	4.5 x 10 ⁴ TCID ₅₀ /mL
DENV-4	Genotype I	Cambodia 2011	KT452802	WRCEVA	II	8.0 x 10 ⁵ TCID ₅₀ /mL
DENV-2	Cosmopolitan	New Caledonia 2017	MW585365	This study	AIBF	1.0 x 10 ⁷ FFU/mL
ZIKV	Asian	New Caledonia 2014	SRR5309452	[23]	AIBF	5.0 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL
CHIKV	Asian	New Caledonia 2011	HE806461	[22]	AIBF	2.0 x 10 ⁶ TCID ₅₀ /mL

203 WRCEVA: World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses; AIBF: Artificial Infectious Blood
 204 Feeding; II: Intrathoracic Injection.

205

206 **Vector competence**

207 **Artificial infectious blood meal** – Five to seven day-old nulliparous females of NC-
 208 WT and NC-*w*Mel strains were allowed to feed for twenty minutes with an infectious blood
 209 meal, as previously described [12], containing either CHIKV, ZIKV or DENV-2 diluted to the
 210 concentrations listed in Table 2. Fully engorged females were then transferred into cardboard
 211 containers and maintained with 10% sucrose solution at 28 °C ± 1 °C, 80% relative humidity
 212 under a 12 h:12 h light:dark cycle. At 3 (only for CHIKV), 7 and 14 days post-challenge, a
 213 maximum of 30 mosquitoes of each *Ae. aegypti* population were randomly selected. Their
 214 saliva, head and body were collected and treated as previously described [12]. At the end, 45 µL
 215 of DMEM (for CHIKV and ZIKV) or Leibovitz medium (for DENV) were added to the
 216 collected saliva. All the samples were stored at -80 °C. The detection of viral particles in each
 217 homogenate was performed by virus titration as previously described [12,24]. The infection
 218 rate corresponds to the proportion of mosquitoes with infected body among all tested ones. The

219 proportion of mosquitoes with viral particles detected in saliva among all tested ones represents
220 the transmission efficiency.

221 **Intrathoracic injection experiments** – For viral injections, 7-8 days old AUS-wMel,
222 AUS-Tet, NC-wMel and NC-WT *Ae. aegypti* were intrathoracically injected as previously
223 described [20] with 69 nL of viruses diluted in RPMI to the concentrations listed in Table 2
224 using a microinjector (Nanoject III, Drummond Scientific) with pulled-glass capillary needles.
225 Injected mosquitoes were then incubated for 7 days (10 mosquitoes/cup) at 26 °C with 65%
226 humidity and a 12 h:12 h light:dark cycle before collecting whole mosquitoes and testing them
227 individually for infection status. To quantify viral genomic copies, total RNA was extracted
228 from mosquitoes using RNeasy 96 QIAcube HT kits (QIAGEN). DENV genome copies were
229 quantified using pan-DENV primers that bind the DENV 3'UTR [17,25] and LightCycler
230 Multiplex RNA Virus Master (Roche) one-step qRT-PCR mix.

231

232 **Fitness determinants**

233 For fitness assays, crosses consisting of a group of 50 virgin males and 50 virgin females were
234 performed with strains varying according to each test. Each cross was replicated 3 times. When
235 adults were between 5 and 7 days old, the cages were blood-fed with human blood. The number
236 of living females and blood-fed females were counted immediately after the blood meal. Then,
237 3 days after the blood meal, one egg cup with wet filter paper was placed per cage and females
238 were allowed to oviposit during 3 days. Eggs were kept in a humid atmosphere for 48 h to allow
239 embryos to fully develop before being dried. One week after eggs production, filter papers were
240 split to obtain 5 batches of around 200 eggs. A picture of each batch was taken and the number
241 of eggs counted using the Mesurim ProTM software (version3.4.4.0; copyright Jean-François
242 Madre 1995-2013).

243 **Maternal transmission (MT)** – To quantify the success of MT of *Wolbachia*, MT
244 crosses were set up between WT males and *Wolbachia*-infected females (crosses of NC-WT
245 males x NC-*wMel* females, compared to crosses of NC-WT males x AUS-*wMel* females). One
246 week after egg production, eggs were submerged in hatching solution, separately for the 3
247 replicates of each cross. Larvae were reared to 4-6 day old adults, and 160 females of each
248 replicate were sampled and screened by qPCR to detect *Wolbachia*.

249 **Cytoplasmic Incompatibility (CI)** – To investigate the level of *Wolbachia*-induced CI,
250 CI crosses were set up between *Wolbachia*-infected males and WT females (crosses of NC-
251 *wMel* males x NC-WT females, compared to crosses of AUS-*wMel* males x NC-WT females).
252 One week after the eggs were produced, 5 egg batches from each cage were submerged
253 individually in hatching solution and larvae counted the following day (1st instar). CI was
254 estimated by dividing the number of hatched larvae by the number of counted eggs for each
255 batch of eggs.

256 **Fertility** – Fertility crosses were set up between males and females of the same strains
257 (NC-WT males x NC-WT females; NC-*wMel* males x NC-*wMel* females and AUS-*wMel* males
258 x AUS-*wMel* females). The same protocol as for the CI experiments was applied to the 5
259 batches of eggs from each cage. Fertility was determined by dividing the number of 1st instar
260 larvae by the number of eggs counted for each batch.

261 **Fecundity** – Fecundity was assessed for all cages of all crosses (MT, CI and Fertility
262 crosses), regardless of the strain of males. For each female strain, fecundity was estimated by
263 the median number of eggs laid per blood-fed female per cage.

264 **Blood feeding rates** – Blood feeding rates were estimated for each female strain of all
265 crosses (MT, CI and Fertility crosses). At the end of the blood feeding, feeding rates were
266 determined by dividing the number of females with a blood-filled abdomen by the total number
267 of females alive for each strain.

268 **Wing length measurement** – Wing size was measured from 30 to 40 specimens of each
269 sex and strain. The wing was removed and placed between slide and slip cover on a white
270 surface. A picture was taken with a camera (Leica DMC2900) plugged into a stereomicroscope
271 (Leica M205C). The measurement was made through the LAS X software of Leica (V3.0.4).
272 Wing length was calculated as the distance from the wing base to the wing tip.

273 **Insecticide resistance** – The insecticide susceptibility tests were made with standard
274 WHO test tubes [26]. This device allows exposing sets of 25 adult females (2–5 days old) to a
275 filter paper impregnated with insecticide. Different doses of deltamethrin were tested for the
276 resistant strains: 0% (control), 0.02%, 0.05%, 0.1%, 0.4% and 0.9%. For the sensitive strain,
277 doses of 0%, 0.0004%, 0.001%, 0.003%, 0.005% and 0.01% were used. For each strain and
278 each dose tested, 4 exposure tubes containing around 25 females (2-5 days old) were used.
279 Females were exposed for 1 h. After exposure, 10% sugar solution was provided to females and
280 mortality was recorded at 24 h.

281

282 **Statistical analysis**

283 Statistical analysis and graphics were performed using R software (R Core Team (2017). R: A
284 language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing,
285 Vienna, Austria). Comparisons of proportions were made using Fisher's exact tests. For
286 continuous data, the normality was assessed by group using a Shapiro-Wilk normality test.
287 ANOVA was used to compare means across multiple groups. If any differences were found,
288 groups were compared 2 by 2 using a Student's t-Test. Non-parametric Kruskal-Wallis test was
289 carried out to compare medians across multiple groups. Comparisons between 2 medians were
290 made using Wilcoxon test. If multiple tests were performed, the p-values were adjusted using
291 the Holm method. The statistical significance threshold for these tests was set at 0.05.

292 The analyses of dose-mortality responses were performed using the R script BioRssay 6.2 [27–
293 30] as previously described [31]. Briefly, this script computes the Lethal Doses of insecticide
294 killing 50% of the tested strains (LD₅₀) and the associated confidence intervals. The comparison
295 of strains was made by calculating the Resistance Ratios 50, or RR₅₀ (=LD₅₀ of tested strain/
296 LD₅₀ of the sensible strain) and their 95% confidence intervals (CI₉₅). A RR₅₀ in which the
297 confidence interval does not include 1 was considered statistically significant.

298

299 **Ethics statement**

300 Human blood for mosquito rearing and artificial blood feeding experiments were obtained from
301 Blood donor Center, New Caledonia Hospital, upon consent of patients. Ethical approval was
302 granted by the Consultative Ethics Committee of New Caledonia 16.03.2017. Ethical approval
303 for the collection of mosquitoes from Noumea was granted by authorities from the South
304 Province of New Caledonia (ordinance No. 1415-2019/ARR/DENV). At Monash University,
305 mosquito colonies were blood fed on the arms of adult, human volunteers in accordance with
306 Monash University Human Research Ethics permit number CF11/0766-2011000387. Written
307 informed consent was provided by all volunteers prior to commencement.

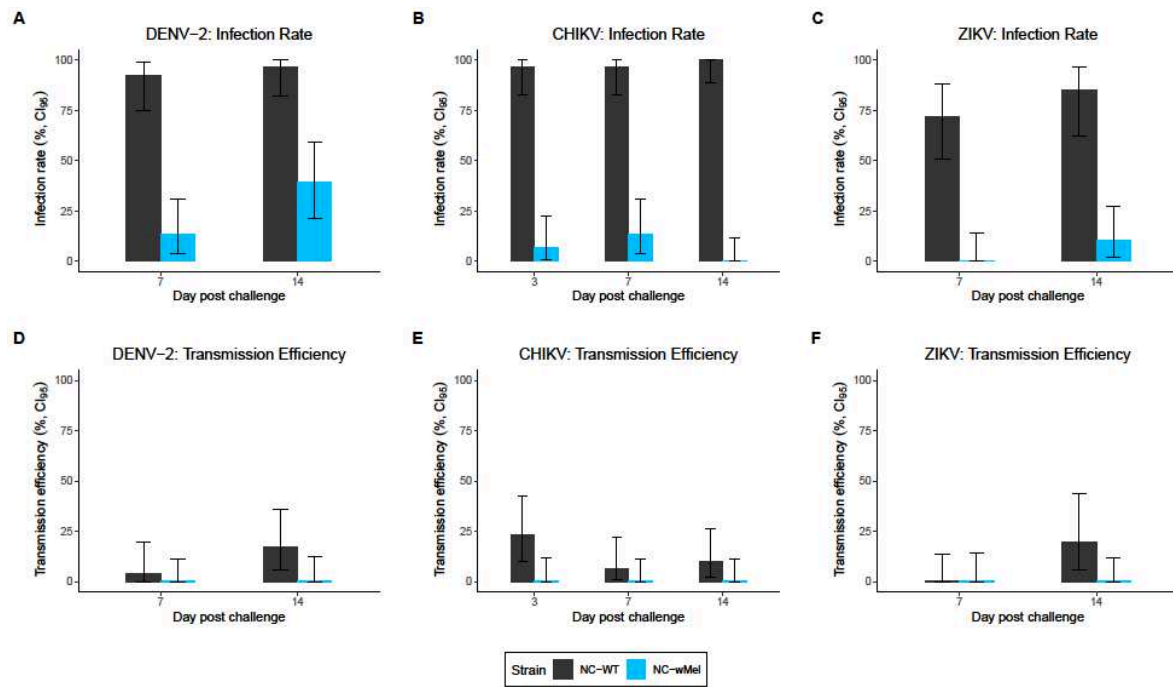
308

309 **Results**

310 **Vector competence**

311 **Oral challenge with infectious blood meals** – NC-WT and NC-wMel *Ae. aegypti* were
312 orally challenged with DENV-2, CHIKV or ZIKV. Pairwise comparisons of infection rates
313 showed that NC-wMel mosquitoes were significantly less susceptible to DENV-2, CHIKV and
314 ZIKV compared to NC-WT *Ae. aegypti* regardless of the day post infection (Fisher's exact test,
315 *p*-values < 0.001; Figure 1A-C; Sup. Table 1). Infection rates of NC-WT mosquitoes reached
316 more than 90% independent of the day of infection, except for ZIKV ranging from 72% to 85%.

317 For NC-wMel mosquitoes, infection rates ranged from 13% to 39%, 0% to 13% and 0% to 10%
 318 for DENV-2, CHIKV and ZIKV respectively. No infection was detected for CHIKV-infected
 319 NC-wMel *Ae. aegypti* at 14 days post infection and for ZIKV-infected NC-wMel *Ae. aegypti* at
 320 7 days post-infection.
 321



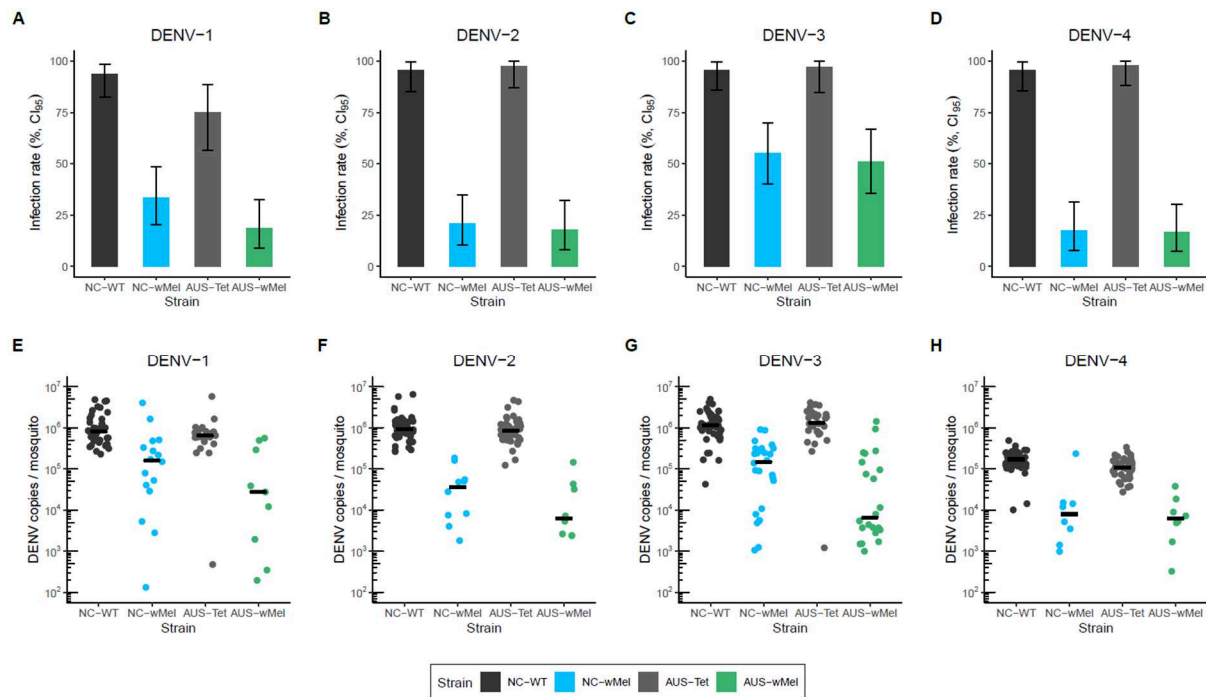
322
 323 **Figure 1. Comparison of NC-WT and NC-wMel *Aedes aegypti* strains orally challenged**
 324 **with DENV-2, CHIKV or ZIKV.** (A, B, C) Infection rates and (D, E, F) transmission
 325 efficiencies obtained for DENV-2, CHIKV and ZIKV respectively at different days post-
 326 challenge. Errors bars indicate Confidence Interval at 95%. Numbers of mosquitoes tested for
 327 each virus-strain combination are shown in Sup Table 1. Statistically significant differences are
 328 mentioned in Sup Table 1.
 329

330 Viral particles were detected in saliva of NC-WT mosquitoes for the three viruses tested
 331 irrespective of the day post infection, except for ZIKV-infected mosquitoes at 7 days post-
 332 infection (Figure 1D-E; Sup. Table 1). Overall, transmission efficiencies did not exceed 20%
 333 for NC-WT mosquitoes. No transmission was observed for NC-wMel *Ae. aegypti* regardless of
 334 the viruses tested and the incubation time. Significant differences were observed in pairwise
 335 comparisons of transmission efficiencies between NC-WT and NC-wMel mosquitoes for

336 CHIKV at 3 days and for ZIKV and 14 days (Fisher's exact test, p -values = 0.01 for CHIKV
337 and 0.02 for ZIKV).

338 **Intrathoracic injections with DENV** – NC-WT, NC-*w*Mel, AUS-Tet and AUS-*w*Mel
339 *Ae. aegypti* were injected with all four DENV serotypes. Pairwise comparisons of infection
340 rates showed that NC-*w*Mel and AUS-*w*Mel *Ae. aegypti* were significantly less susceptible to
341 DENV regardless of the serotype compared to NC-WT and AUS-Tet respectively (Fisher's
342 exact test, p -values < 0.001; Figure 2A-D; Sup. Table 2). The infection rates of NC-WT and
343 AUS-Tet mosquitoes were above 96% for all four DENV serotypes, except for AUS-Tet
344 mosquitoes injected with DENV-1 that was 75%. For NC-*w*Mel and AUS-*w*Mel mosquitoes
345 injected with DENV-1, DENV-2 and DENV-4, infection rates ranged from 17% to 33%. While
346 for DENV-3 injected mosquitoes, infection rates were higher, with 55% and 51% for NC-*w*Mel
347 and AUS-*w*Mel *Ae. aegypti* respectively.

348



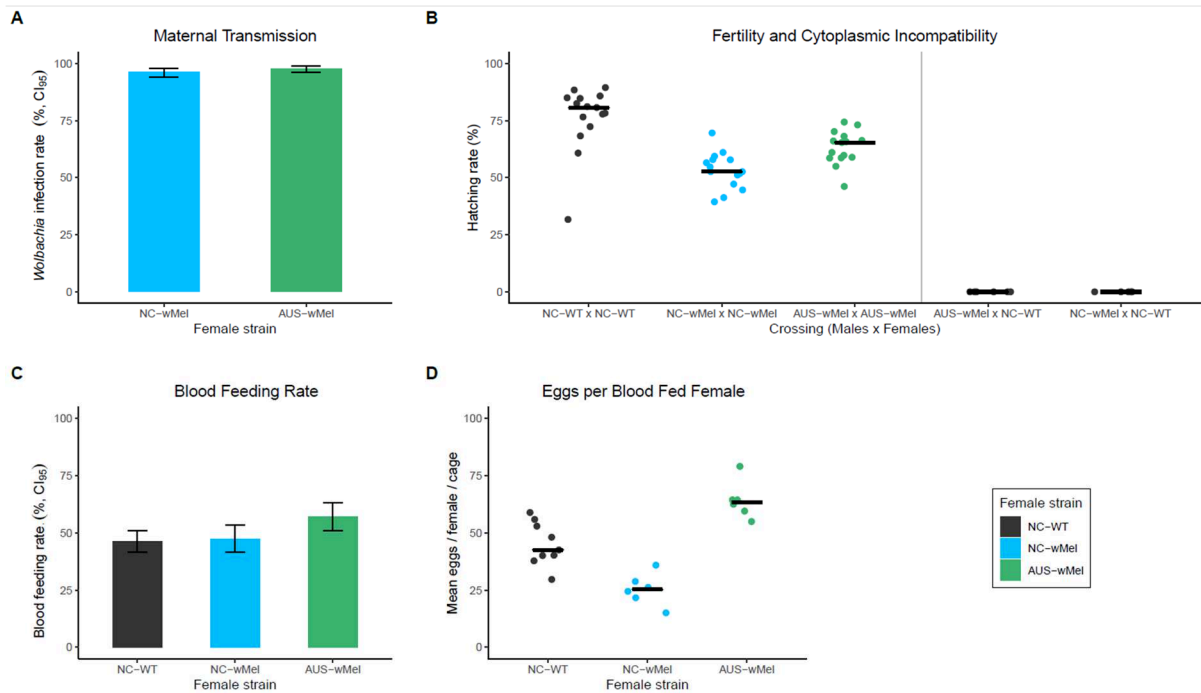
350

351 **Figure 2.** NC-WT, NC-wMel, AUS-Tet and AUS-wMel *Aedes aegypti* strains
 352 **intrathoracically injected with the four DENV serotypes.** (A, B, C, D) Infection rates
 353 obtained for DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4 respectively at 7 days post-injection.
 354 Errors bars indicate Confidence Interval at 95%. (E, F, G, H) Viral titers obtained from
 355 infected mosquitoes at 7 days post-injection, for DENV-1, DENV-2, DENV-3 and DENV-4
 356 respectively. Median was shown for each mosquito strain. Numbers of mosquitoes tested for
 357 each virus-strain combination are shown in Sup Table 2. Statistically significant differences are
 358 also mentioned in Sup Table 2.
 359

360 DENV viral loads in NC-wMel and AUS-wMel infected mosquitoes were also
 361 significantly lower compared to those obtained in NC-WT and AUS-Tet respectively regardless
 362 of the serotype (Wilcoxon test, p -values < 0.001 ; Figure 2E-H; Sup. Table 2). The medians of
 363 viral titers for NC-WT and AUS-Tet ranged from 1.08×10^5 to 1.30×10^6 DENV
 364 copies/mosquito, whereas DENV viral loads for NC-wMel and AUS-wMel ranged from
 365 6.23×10^3 to 1.61×10^5 DENV copies/mosquito.
 366

367 **Fitness determinants**

368 **Maternal transmission** – MT is one of the key factors for the introgression of
369 *Wolbachia* in field mosquito populations. The MT rate measured for the NC-*w*Mel strain was
370 high with 96% of offspring infected (CI₉₅: 94–98), compare to 98% (CI₉₅: 96–99) for the AUS-
371 *w*Mel strain (Figure 3A). No significant difference was observed between these two strains
372 (Fisher test, *p*-value = 0.25).
373



374

375 **Figure 3. Comparison of fitness determinants for NC-wMel, AUS-wMel and NC-WT**
 376 **strains.** These parameters were estimated through different crosses between males and
 377 females belonging to the NC-wMel (blue), AUS-wMel (green) or NC-WT strains (grey).
 378 Each cross involved 50 females and 50 males and was replicated 3 times. **(A) Maternal**
 379 **transmission** corresponds to the *Wolbachia* infection rate of females born of NC-wMel
 380 offspring (4-6 days old) per replicate and per cross were screened by qPCR. **(B) Fertility**
 382 **and Cytoplasmic Incompatibility.** Hatching rates for different crosses between NC-
 383 wMel, AUS-wMel and NC-WT. Fertility crosses were set up between males and females
 384 of the same strain. Cytoplasmic Incompatibility crosses were between NC-wMel males x
 385 NC-WT females, and AUS-wMel males x NC-WT females. Eggs obtained for each cross
 386 were split in 5 batches and submerged individually. Each dot represents that hatch rate,
 387 calculated as the number of 1st instar larvae for each batch divided by the number of eggs
 388 initially recorded. **(C) Blood feeding rate.** For all crosses, involving 21 cages of 50
 389 females (6 cages for AUS-wMel, 6 cages for NC-wMel and 9 cages for NC-WT), the blood
 390 feeding rate is calculated as the number of females with the blood-filled abdomens divided
 391 by the total number of females alive. **(D) Eggs per blood fed female.** Each dot indicates
 392 the mean number of eggs per blood-fed female and per cage. On graphs (A) and (C) errors
 393 bars indicate Confidence Interval at 95%. On graphs (B) and (D) the black bars indicate
 394 the median.

395

396 **Cytoplasmic Incompatibility and Fertility** – CI is the second factor favouring the
 397 introgression of *Wolbachia* in field populations. For eggs obtained from the cross of NC-wMel
 398 males and NC-WT females, no larvae were observed (n batches = 15; total number of eggs =

399 4174). The same result was observed for AUS-*w*Mel males crossed with NC-WT females (n
400 batches = 15; total number of eggs = 2048) (Figure 3B).

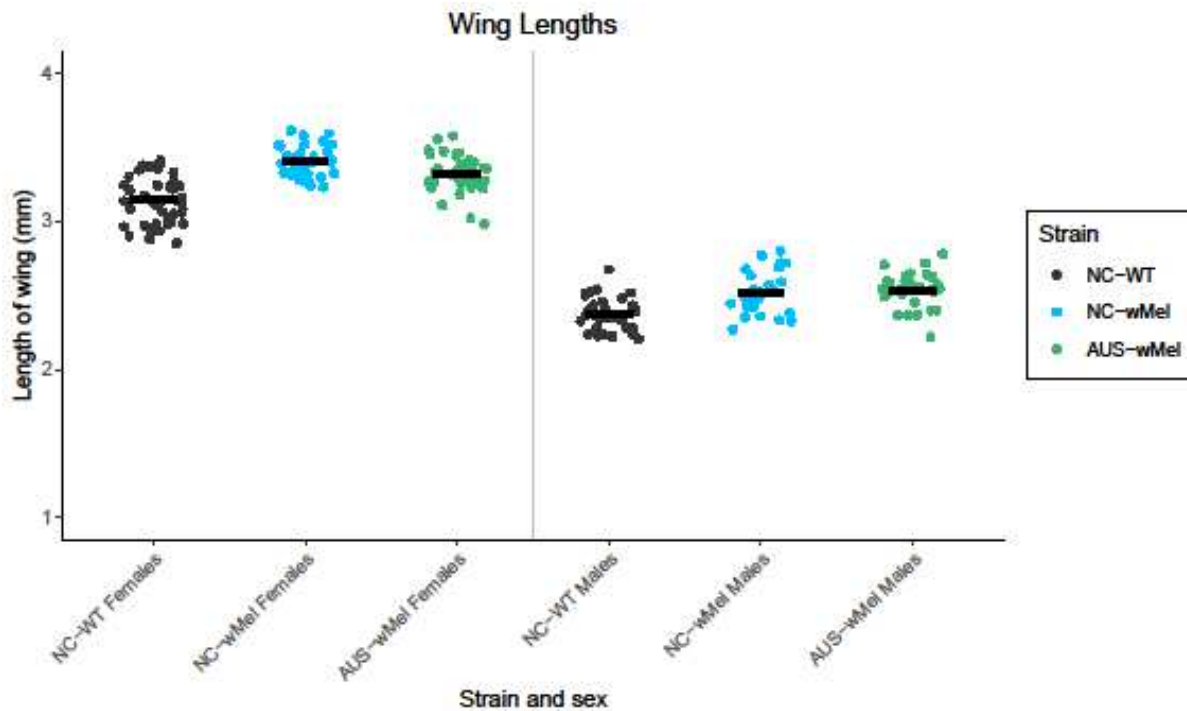
401 In contrast, fertility crosses (males crossed with females of the same strains) produced
402 viable eggs, with median hatch rates of 53%, 65% and 81% for NC-*w*Mel, AUS-*w*Mel and NC-
403 WT respectively (Figure 3B), with significant differences between crosses (Kruskal-Wallis
404 Test, p -value < 0.001). The median hatch rate of strain NC-*w*Mel was lower than that of AUS-
405 *w*Mel (Wilcoxon Test, p -value = 0.002), itself lower than NC-WT (Wilcoxon Test, p -value <
406 0.001).

407 **Blood feeding rate and Fecundity** – Significant differences in blood feeding rates were
408 observed between the different strains (Fisher test, p -value = 0.01). The blood-feeding rate of
409 the AUS-*w*Mel strain (57%; CI₉₅: 51–63) was slightly higher than that both the NC-WT (46%;
410 CI₉₅: 42–51) and NC-*w*Mel (48%; CI₉₅: 42–54) strains (Fisher's tests, p -value < 0.04). However,
411 no difference was observed between the two NC strains (Fisher test, p -value = 0.76) (Figure
412 3C).

413 Regarding fecundity, the median number of eggs laid per blood-fed female per cage was
414 significantly different for all strains (Kruskal-Wallis Test, p -value = 0.0003). The AUS-*w*Mel
415 strain had the highest fecundity with median of 63 eggs laid per female, while NC-WT and NC-
416 *w*Mel females laid approximately 43 and 25 eggs per females respectively (Wilcoxon Tests, p -
417 values < 0.003) (Figure 3D).

418 **Wing length** – The mean wing lengths were significantly impacted by strain and sex of
419 the mosquitoes (ANOVA; p -values < 0.001). For females, all wing length means were
420 significantly different (Student's t -Tests; p -values < 0.009), with wings length of NC-WT
421 specimens shorter (mean = 3.15 mm) when compared to *Wolbachia*-infected strains (means =
422 3.4 and 3.32 mm for NC-*w*Mel and AUS-*w*Mel respectively) (Figure 4). The same trend was
423 observed for males, with lower average wing lengths for the NC-WT strain (2.37 mm)

424 compared to both *Wolbachia*-infected strains (2.52 and 2.54 mm for NC-*w*Mel and AUS-*w*Mel
 425 respectively; Student's t-Tests; p -values < 0.001). No significant difference was found between
 426 the mean wing lengths of males of the two strains carrying *Wolbachia* (Student t-Test; p -
 427 value = 0.53).
 428

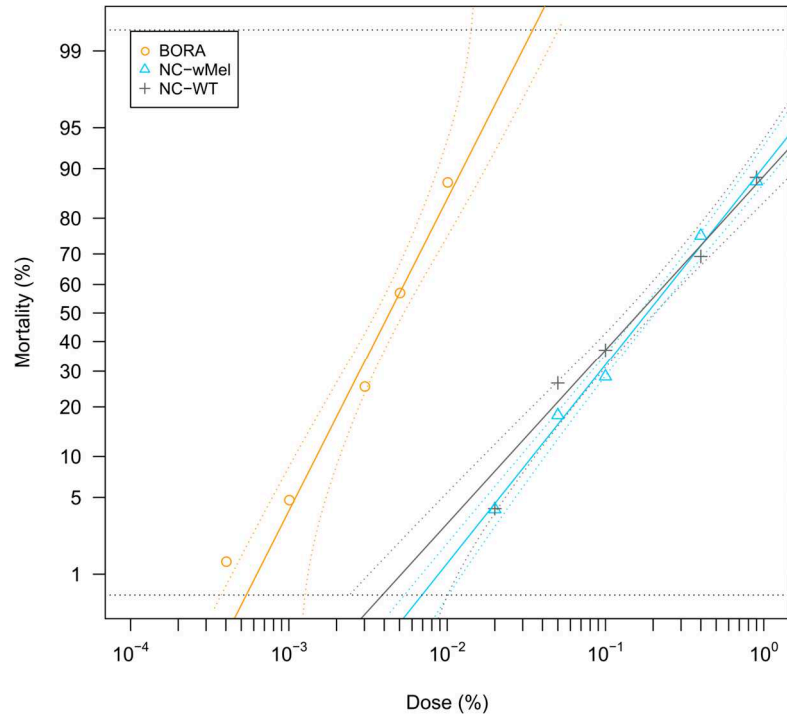


429
 430 **Figure 4. Mean wing lengths for males and females of NC-*w*Mel, AUS-*w*Mel and NC-
 431 WT strains.** Wing lengths were calculated as the distance from the wing base to the wing
 432 tip, on 30 to 40 specimens of each sex and strain.
 433

434 **Insecticide resistance** – The LD₅₀ was calculated for each strain, based on the mortality
 435 obtained for the 6 doses tested. The LD₅₀ was for Bora 0.0043% of deltamethrin (CI₉₅: 0.0033
 436 – 0.0058%), while the LD₅₀ for NC-WT and NC-*w*Mel strains raised to 0.16% (CI₉₅: 0.11 –
 437 0.24%) and 0.19% (CI₉₅: 0.15 – 0.22%), respectively. The RR₅₀ did not differ significantly (CI
 438 overlap) between NC-WT and NC-*w*Mel strains, with a RR₅₀ of 37.89 (CI₉₅: 25.36 – 56.62) and
 439 42.50 (CI₉₅: 26.34 – 68.58) for NC-WT and NC-*w*Mel respectively (Figure 5). These results

440 together shown that there is a similar response between NC-WT and NC-wMel regarding
441 deltamethrin resistance.

442



443

444 **Figure 5. Dose-mortality to deltamethrin for NC-wMel, NC-WT and BORA**
445 **(susceptible reference) strains.** For each strain and each dose tested, 100 females (2-5 days
446 old) were exposed for 1 h, and mortality was recorded at 24 h. Dotted lines indicate the
447 Confidence Interval at 95%.

448

449 **Discussion**

450 Biological control programs involving *Wolbachia*-infected *Ae. aegypti* must be sufficiently
451 robust to limit arbovirus transmission in different epidemiological settings. NC is an ideal
452 epidemiological context for the implementation and evaluation of such a strategy as the only
453 proven vector for dengue is *Ae. aegypti*, DENV outbreaks are frequent and both
454 epidemiological and entomological networks are deployed [2]. We present here the results of
455 the NC-wMel *Ae. aegypti* strain regarding vector competence and fitness determinants allowing
456 the implementation of the *Wolbachia* strategy in Noumea, NC.

457 As expected, NC-*wMel Ae. aegypti* orally challenged with DENV, ZIKV or CHIKV were
458 significantly less susceptible to infection than WT mosquitoes. In our study no NC-*wMel*
459 *Ae. aegypti* were able to transmit the arboviruses tested. These data were in accordance with
460 previous studies on pathogen blocking in *wMel*-infected mosquitoes, which indicate strong
461 pathogen blocking occurs against a range of viruses [9,10,32,33]. In an intrathoracic virus
462 challenge model where high infection rates can be achieved more quickly, NC-*wMel* strains
463 demonstrated significantly reduced infection rates and viral loads against all DENV tested. To
464 our knowledge, this study is the first to assess the *Wolbachia*-blocking in a newly generated
465 *wMel* strain using both oral feeding with epidemiological relevant viruses and IT with reference
466 viruses. Although, IT can give more standardized results as a global evaluation, oral feeding
467 has the advantage to be more representative of the life-cycle of the virus in the vector with
468 barriers crossing. With significant results with both techniques, the findings presented here
469 indicate the blocking provided in this new NC *wMel*-infected *Ae. aegypti* strain is robust and
470 promising.

471 Even if strong virus blocking is essential for the success of this strategy, its effectiveness
472 depends on an almost complete introgression of *Wolbachia* in *Ae. aegypti* field populations via
473 MT and CI. MT of *Wolbachia* by the new NC-*wMel* strain of *Ae. aegypti* was important and
474 comparable to other strains used in field deployment [7,17,34]. CI occurs when *Wolbachia*-
475 infected males mate with uninfected females, leading to death of embryos from uninfected eggs,
476 which promotes the spread of *Wolbachia* and its maintenance in mosquito populations [35].
477 The *Ae. aegypti* NC-*wMel* showed complete CI. These good results from CI and MT should
478 therefore allow *Wolbachia* introgression and maintenance in the field, as shown in other trials,
479 with high and stable frequency [36].

480 Transinfection of *Ae. aegypti* by *Wolbachia* is costly to mosquito fitness. These costs vary
481 depending on the *Wolbachia* strain [17,35,37] and in some extent can negatively impact the

482 introgression and long-term stability as observed with the *wMelPop* strain whose high costs do
483 not allow the maintenance of this *Wolbachia* strain on the field [38]. Among the various fitness
484 parameters that we studied using the NC-*wMel* strain, several were indeed impacted by
485 *Wolbachia* infection, in particular the fecundity and fertility of females. Females of the NC-
486 *wMel* strain laid significantly fewer eggs than NC-WT females and the egg hatch rate was
487 reduced compared to NC-WT eggs. It would be interesting in the future to increase the time for
488 embryogenesis for NC *wMel* strain in order to improve the hatching rate, as previously
489 described [39]. The relatively low fertility and fecundity of the NC-*wMel* strain may be due to
490 the cumulative fitness costs of *Wolbachia* and insecticides resistance. In fact, this phenomenon
491 has already been observed in Brazil where a highly resistant strain resulted in a fecundity and
492 hatch rates, close to those we observed in this study [40]. These levels of *Wolbachia* cost on the
493 fertility and fecundity of *Ae. aegypti* has already been observed in Australian and Brazilian
494 strains, without impact the establishment of *wMel* in field populations [36,40].

495 Other fitness parameters were evaluated. No significant impact of *Wolbachia* on the blood
496 feeding rate of NC-*wMel* females was observed compared to NC-WT females. Likewise, no
497 reduction in wing size was observed in mosquitoes infected with *wMel*. In contrast, a slight, but
498 significant, increase in the size of the wings of males and females of *wMel*-infected strains (NC
499 and AUS) was observed. This is consistent with previous work by [37] who observed a similar
500 increase in the size of infected adults, potentially due to a longer duration of larval development
501 and a positive impact of *Wolbachia*.

502 The last fitness component that can negatively impact the establishment of *Wolbachia* in the
503 field is high difference of insecticide resistance levels. If insecticide treatments are applied, a
504 susceptible mosquito strain will be disadvantaged against resistant WT mosquitoes. This
505 phenomenon was observed in Brazil, where the first *Wolbachia*-infected *Ae. aegypti* strain
506 released exhibited much lower resistance levels than the field populations. As a result

507 *Wolbachia* did not establish in this first trial, necessitating the creation of a new strain [40]. To
508 avoid this problem, the NC-WT strain was generated by backcrossing with a field strain
509 resistant to deltamethrin, the only insecticide currently used in Noumea. The level of resistance
510 to deltamethrin was similar between NC-*wMel* strain and WT field mosquitoes, which should
511 allow *Wolbachia* establishment in Noumea, even in case of insecticide treatments.

512 Launching of *Wolbachia*-infected mosquitoes in NC, also needs public acceptance, ethical and
513 regulatory agreements. While no standard regulatory process exists for such a method [41], all
514 local relevant sanitary and environmental authorities were consulted for approval before release
515 of the NC-*wMel* *Ae. aegypti* strain. This approval was based on careful reviewing of the safety
516 and the security assessment of the method [42], recommendation of field releases at the pilot
517 scale by WHO [43] as well as the proven success in other sites in terms of *Wolbachia*
518 establishment and epidemiological impact [13,36,44]. The population support was also a
519 prerequisite to ensure a good acceptance of the releases [45]. After fulfilling all of these
520 conditions, first releases of *wMel*-infected mosquitoes in Noumea were authorized.

521 Such an operational program needs to be carefully monitored to assess the evolution of *wMel*
522 *Ae. aegypti* strain in the environment. Abiotic and biotic factors could impact the strategy,
523 particularly the viral adaptative evolution and specific environmental conditions that impact the
524 stability of *Wolbachia* [46]. The long-term evolution of DENV is effectively expected. This
525 could reduce complete blocking by *Wolbachia* but partial DENV blocking should persist
526 indefinitely [47] still reducing the risk of dengue outbreaks. Concerning environmental
527 conditions, a heat stress could have a negative impact on *Wolbachia* density. However, it should
528 be transitional [48] given the temperature recorded in Noumea (25 °C in average in dry season)
529 [49].

530 Despite the different factors which could weaken the strategy, results now available from the
531 field showed that the method is stable after several months [21] to several years [50]. As *Ae.*

532 *aegypti* is the only proven vector for dengue in New Caledonia, we expect a high efficiency of
533 the method on the reduction of dengue cases in Noumea as recently shown in Yogyakarta,
534 Indonesia [14].

535

536 **Acknowledgments**

537 We are grateful to Direction des Affaires Sanitaires et Sociales de la Nouvelle-Calédonie, the
538 Mairie de Nouméa, the Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie and the University of Monash
539 for their contribution to the realization of this project in Noumea, New Caledonia. DENV
540 isolates were obtained from the World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses
541 (WRCEVA). Roy Hall kindly provided the 4G2 antibody used in TCID50 experiments. We
542 would like to thank Jaana Wenham and Mason Mason for technical assistance. We would like
543 to thank Sosiasi Kilama and Sophie Hagen for technical support.

544

545 **Fundings**

546 This work was supported by the Institut Pasteur de Nouvelle-Calédonie, the New Caledonia
547 government, the Mairie de Nouméa, the University of Monash and the Fonds de coopération
548 économique, sociale et culturelle pour le Pacifique.

549

550 **Authors contributions**

551 Conceptualization: NP, MDR, CS

552 Formal Analysis: OOC, NP, HF

553 Funding Acquisition: CS

554 Investigation: OOC, JT, MP, CI, SR, DG, DH, JD, EP, DSG

555 Project Administration: NR

556 Supervision: MDR NP

557 Visualization: NP
558 Writing – Original Draft: OOC, NP, MDR, NR, HF, MP
559 Writing – Review & Editing: All

560

561 **Bibliography**

- 562 1. Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, et al. The global
563 distribution and burden of dengue. *Nature*. 2013;496: 504–507. doi:10.1038/nature12060
- 564 2. Inizan C, Tarantola A, O’Connor O, Mangeas M, Pocquet N, Forfait C, et al. Dengue in
565 New Caledonia: Knowledge and Gaps. *TropicalMed*. 2019;4: 95.
566 doi:10.3390/tropicalmed4020095
- 567 3. Pocquet N, Pol M, Sarengat V, Cattel J, Faucon F. Fifteen years monitoring and managing
568 *Aedes aegypti* resistance to deltamethrin in Noumea, New Caledonia. Poster presented at:
569 Institut Pasteur International Symposium : Combatting resistance : microbes and vectors;
570 2018 Nov 15; Institut Pasteur, Paris.
- 571 4. Hilgenboecker K, Hammerstein P, Schlattmann P, Telschow A, Werren JH. How many
572 species are infected with *Wolbachia*? – a statistical analysis of current data: *Wolbachia*
573 infection rates. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;281: 215–220. doi:10.1111/j.1574-
574 6968.2008.01110.x
- 575 5. Zug R, Hammerstein P. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data
576 Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. Cordaux R, editor.
577 *PLoS ONE*. 2012;7: e38544. doi:10.1371/journal.pone.0038544
- 578 6. Bonneau M, Landmann F, Labbé P, Justy F, Weill M, Sicard M. The cellular phenotype
579 of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens* in the light of *cidB* diversity. McGraw
580 EA, editor. *PLoS Pathog*. 2018;14: e1007364. doi:10.1371/journal.ppat.1007364
- 581 7. Walker T, Johnson PH, Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Frentiu FD, McMeniman CJ, et
582 al. The wMel *Wolbachia* strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti*
583 populations. *Nature*. 2011;476: 450–453. doi:10.1038/nature10355
- 584 8. Carrington LB, Tran BCN, Le NTH, Luong TTH, Nguyen TT, Nguyen PT, et al. Field-
585 and clinically derived estimates of *Wolbachia* -mediated blocking of dengue virus
586 transmission potential in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2018;115:
587 361–366. doi:10.1073/pnas.1715788115
- 588 9. Aliota MT, Walker EC, Uribe Yepes A, Dario Velez I, Christensen BM, Osorio JE. The
589 wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes*
590 *aegypti*. Armstrong PM, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2016;10: e0004677.
591 doi:10.1371/journal.pntd.0004677

- 592 10. Aliota MT, Peinado SA, Velez ID, Osorio JE. The wMel strain of Wolbachia Reduces
593 Transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Sci Rep*. 2016;6: 28792.
594 doi:10.1038/srep28792
- 595 11. Dutra HLC, Rocha MN, Dias FBS, Mansur SB, Caragata EP, Moreira LA. Wolbachia
596 Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes.
597 *Cell Host & Microbe*. 2016;19: 771–774. doi:10.1016/j.chom.2016.04.021
- 598 12. O'Connor O, Calvez E, Inizan C, Pocquet N, Richard V, Dupont-Rouzeyrol M. Vector
599 competence of *Aedes aegypti* from New Caledonia for the four recent circulating dengue
600 virus serotypes. Gubler DJ, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020;14: e0008303.
601 doi:10.1371/journal.pntd.0008303
- 602 13. Ryan PA, Turley AP, Wilson G, Hurst TP, Retzki K, Brown-Kenyon J, et al.
603 Establishment of wMel Wolbachia in *Aedes aegypti* mosquitoes and reduction of local
604 dengue transmission in Cairns and surrounding locations in northern Queensland,
605 Australia. *Gates Open Res*. 2020;3: 1547. doi:10.12688/gatesopenres.13061.2
- 606 14. Indriani C, Tantowijoyo W, Rancès E, Andari B, Prabowo E, Yusdi D, et al. Reduced
607 dengue incidence following deployments of Wolbachia-infected *Aedes aegypti* in
608 Yogyakarta, Indonesia: a quasi-experimental trial using controlled interrupted time series
609 analysis. *Gates Open Res*. 2020;4: 50. doi:10.12688/gatesopenres.13122.1
- 610 15. Murray JV, Jansen CC, De Barro P. Risk Associated with the Release of Wolbachia-
611 Infected *Aedes aegypti* Mosquitoes into the Environment in an Effort to Control Dengue.
612 *Front Public Health*. 2016;4. doi:10.3389/fpubh.2016.00043
- 613 16. O'Neill SL. The Use of Wolbachia by the World Mosquito Program to Interrupt
614 Transmission of *Aedes aegypti* Transmitted Viruses. In: Hilgenfeld R, Vasudevan SG,
615 editors. *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. Singapore:
616 Springer Singapore; 2018. pp. 355–360. doi:10.1007/978-981-10-8727-1_24
- 617 17. Fraser JE, De Bruyne JT, Iturbe-Ormaetxe I, Stepnell J, Burns RL, Flores HA, et al.
618 Novel Wolbachia-transinfected *Aedes aegypti* mosquitoes possess diverse fitness and
619 vector competence phenotypes. Dillman A, editor. *PLoS Pathog*. 2017;13: e1006751.
620 doi:10.1371/journal.ppat.1006751
- 621 18. Ye YH, Carrasco AM, Frentiu FD, Chenoweth SF, Beebe NW, van den Hurk AF, et al.
622 Wolbachia Reduces the Transmission Potential of Dengue-Infected *Aedes aegypti*.
623 Rasgon JL, editor. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9: e0003894.
624 doi:10.1371/journal.pntd.0003894
- 625 19. Brengues C, Hawkes NJ, Chandre F, Mccarroll L, Duchon S, Guillet P, et al. Pyrethroid
626 and DDT cross-resistance in *Aedes aegypti* is correlated with novel mutations in the
627 voltage-gated sodium channel gene. *Med Vet Entomol*. 2003;17: 87–94.
628 doi:10.1046/j.1365-2915.2003.00412.x
- 629 20. Flores HA, Taneja de Bruyne J, O'Donnell TB, Tuyet Nhu V, Thi Giang N, Thi Xuan
630 Trang H, et al. Multiple Wolbachia strains provide comparative levels of protection
631 against dengue virus infection in *Aedes aegypti*. Jiggins FM, editor. *PLoS Pathog*.
632 2020;16: e1008433. doi:10.1371/journal.ppat.1008433

- 633 21. Frentiu FD, Zakir T, Walker T, Popovici J, Pyke AT, van den Hurk A, et al. Limited
634 Dengue Virus Replication in Field-Collected *Aedes aegypti* Mosquitoes Infected with
635 Wolbachia. Turell MJ, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8: e2688.
636 doi:10.1371/journal.pntd.0002688
- 637 22. Dupont-Rouzeyrol M, Caro V, Guillaumot L, Vazeille M, D’Ortenzio E, Thiberge J-M, et
638 al. Chikungunya Virus and the Mosquito Vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South
639 Pacific Region). Vector-Borne and Zoonotic Diseases. 2012;12: 1036–1041.
640 doi:10.1089/vbz.2011.0937
- 641 23. Dupont-Rouzeyrol M, Diancourt L, Calvez E, Vandebogaert M, O’Connor O, Teissier
642 A, et al. Zika virus evolution on the edges of the Pacific ocean. Emerging Microbes &
643 Infections. 2017;6: 1–3. doi:10.1038/emi.2017.102
- 644 24. Calvez E, O’Connor O, Pol M, Rousset D, Faye O, Richard V, et al. Differential
645 transmission of Asian and African Zika virus lineages by *Aedes aegypti* from New
646 Caledonia. Emerging Microbes & Infections. 2018;7: 1–10. doi:10.1038/s41426-018-
647 0166-2
- 648 25. Ritchie SA, Pyke AT, Hall-Mendelin S, Day A, Mores CN, Christofferson RC, et al. An
649 Explosive Epidemic of DENV-3 in Cairns, Australia. Vasilakis N, editor. PLoS ONE.
650 2013;8: e68137. doi:10.1371/journal.pone.0068137
- 651 26. World Health Organization. Test procedures for insecticide resistance monitoring in
652 malaria vector mosquitoes. World Health Organization; 2016.
- 653 27. Milesi P, Pocquet N, Labbé P. BioRssay: a R script for bioassay analyses. Available:
654 [http://www.isem.univ-montp2.fr/recherche/equipes/genomique-](http://www.isem.univ-montp2.fr/recherche/equipes/genomique-deladaptation/personnel/labbe-pierrick/)
655 [deladaptation/personnel/labbe-pierrick/](http://www.isem.univ-montp2.fr/recherche/equipes/genomique-deladaptation/personnel/labbe-pierrick/)
- 656 28. Johnson RM, Dahlgren L, Siegfried BD, Ellis MD. Acaricide, Fungicide and Drug
657 Interactions in Honey Bees (*Apis mellifera*). Raine NE, editor. PLoS ONE. 2013;8:
658 e54092. doi:10.1371/journal.pone.0054092
- 659 29. Finney D John. Probit Analysis. Journal of Pharmaceutical Sciences. 1971;60: 1432.
660 doi:10.1002/jps.2600600940
- 661 30. Abbott WS. A Method of Computing the Effectiveness of an Insecticide. Journal of
662 Economic Entomology. 1925;18: 265–267. doi:10.1093/jee/18.2.265a
- 663 31. Pocquet N, Darriet F, Zumbo B, Milesi P, Thiria J, Bernard V, et al. Insecticide resistance
664 in disease vectors from Mayotte: an opportunity for integrated vector management.
665 Parasit Vectors. 2014;7: 299. doi:10.1186/1756-3305-7-299
- 666 32. Joubert DA, O’Neill SL. Comparison of Stable and Transient Wolbachia Infection
667 Models in *Aedes aegypti* to Block Dengue and West Nile Viruses. Small PLC, editor.
668 PLoS Negl Trop Dis. 2017;11: e0005275. doi:10.1371/journal.pntd.0005275
- 669 33. Hussain M, Lu G, Torres S, Edmonds JH, Kay BH, Khromykh AA, et al. Effect of
670 Wolbachia on Replication of West Nile Virus in a Mosquito Cell Line and Adult
671 Mosquitoes. Journal of Virology. 2013;87: 851–858. doi:10.1128/JVI.01837-12

- 672 34. Joubert DA, Walker T, Carrington LB, De Bruyne JT, Kien DHT, Hoang NLT, et al.
673 Establishment of a Wolbachia Superinfection in *Aedes aegypti* Mosquitoes as a Potential
674 Approach for Future Resistance Management. Schneider DS, editor. PLoS Pathog.
675 2016;12: e1005434. doi:10.1371/journal.ppat.1005434
- 676 35. Axford JK, Callahan AG, Hoffmann AA, Yeap HL, Ross PA. Fitness of wAlbB
677 Wolbachia Infection in *Aedes aegypti*: Parameter Estimates in an Outcrossed Background
678 and Potential for Population Invasion. The American Journal of Tropical Medicine and
679 Hygiene. 2016;94: 507–516. doi:10.4269/ajtmh.15-0608
- 680 36. Hoffmann AA, Iturbe-Ormaetxe I, Callahan AG, Phillips BL, Billington K, Axford JK, et
681 al. Stability of the wMel Wolbachia Infection following Invasion into *Aedes aegypti*
682 Populations. Rasgon JL, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2014;8: e3115.
683 doi:10.1371/journal.pntd.0003115
- 684 37. Ross PA, Endersby NM, Yeap HL, Hoffmann AA. Larval Competition Extends
685 Developmental Time and Decreases Adult Size of wMelPop Wolbachia-Infected *Aedes*
686 *aegypti*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 2014;91: 198–205.
687 doi:10.4269/ajtmh.13-0576
- 688 38. Nguyen TH, Nguyen HL, Nguyen TY, Vu SN, Tran ND, Le TN, et al. Field evaluation of
689 the establishment potential of wMelPop Wolbachia in Australia and Vietnam for dengue
690 control. Parasites Vectors. 2015;8: 563. doi:10.1186/s13071-015-1174-x
- 691 39. Farnesi LC, Belinato TA, Gesto JSM, Martins AJ, Bruno RV, Moreira LA. Embryonic
692 development and egg viability of wMel-infected *Aedes aegypti*. Parasites Vectors.
693 2019;12: 211. doi:10.1186/s13071-019-3474-z
- 694 40. Garcia G de A, Sylvestre G, Aguiar R, da Costa GB, Martins AJ, Lima JBP, et al.
695 Matching the genetics of released and local *Aedes aegypti* populations is critical to assure
696 Wolbachia invasion. Kittayapong P, editor. PLoS Negl Trop Dis. 2019;13: e0007023.
697 doi:10.1371/journal.pntd.0007023
- 698 41. De Barro PJ, Murphy B, Jansen CC, Murray J. The proposed release of the yellow fever
699 mosquito, *Aedes aegypti* containing a naturally occurring strain of Wolbachia pipientis, a
700 question of regulatory responsibility. J Verbr Lebensm. 2011;6: 33–40.
701 doi:10.1007/s00003-011-0671-x
- 702 42. Murray JV, Jansen CC, De Barro P. Risk Associated with the Release of Wolbachia-
703 Infected *Aedes aegypti* Mosquitoes into the Environment in an Effort to Control Dengue.
704 Front Public Health. 2016;4. doi:10.3389/fpubh.2016.00043
- 705 43. World Health Organization. Promising new tools to fight *Aedes* mosquitoes. Bull World
706 Health Organ. 2016;94: 562–563. doi:10.2471/BLT.16.020816
- 707 44. Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J, Iturbe-Ormaetxe I, Johnson PH, Muzzi F, et
708 al. Successful establishment of Wolbachia in *Aedes* populations to suppress dengue
709 transmission. Nature. 2011;476: 454–457. doi:10.1038/nature10356
- 710 45. O'Neill SL, Ryan PA, Turley AP, Wilson G, Retzki K, Iturbe-Ormaetxe I, et al. Scaled
711 deployment of Wolbachia to protect the community from dengue and other *Aedes*
712 transmitted arboviruses. Gates Open Res. 2019;2: 36. doi:10.12688/gatesopenres.12844.3

- 713 46. Yen P-S, Failloux A-B. A Review: Wolbachia-Based Population Replacement for
714 Mosquito Control Shares Common Points with Genetically Modified Control
715 Approaches. *Pathogens*. 2020;9: 404. doi:10.3390/pathogens9050404
- 716 47. Bull JJ, Turelli M. Wolbachia versus dengue. *Evolution, Medicine, and Public Health*.
717 2013;2013: 197–207. doi:10.1093/emph/eot018
- 718 48. Foo IJ-H, Hoffmann AA, Ross PA. Cross-Generational Effects of Heat Stress on Fitness
719 and Wolbachia Density in *Aedes aegypti* Mosquitoes. *TropicalMed*. 2019;4: 13.
720 doi:10.3390/tropicalmed4010013
- 721 49. Maitrepierre L. Les types de temps et les cyclones, les éléments du climat. In: Bonvallot J,
722 Gay J-C, Habert E, editors. *Atlas de la Nouvelle-Calédonie*. Marseille, France: IRD - Le
723 congrès de la Nouvelle-Calédonie; 2012. pp. 15–22.
- 724 50. Huang B, Yang Q, Hoffmann AA, Ritchie SA, van den Hurk AF, Warrilow D. Wolbachia
725 Genome Stability and mtDNA Variants in *Aedes aegypti* Field Populations Eight Years
726 after Release. *iScience*. 2020;23: 101572. doi:10.1016/j.isci.2020.101572

727

728 **Supplementary Table 1:** Infection and transmission efficiencies obtained for DENV-2,
 729 CHIKV, and ZIKV, according to the mosquito strain at different days post-challenge.

Virus	Days post-challenge	Mosquito strain	Number of individuals	% of infection	<i>p</i> -value* for infection	% of transmission	<i>p</i> -value* for transmission
DENV-2	7	NC-WT	26	92 (24/26)	2.36E-09	4 (1/26)	4.64E-01
		NC-wMel	30	13 (4/30)		0 (0/30)	
	14	NC-WT	29	97 (28/29)	2.16E-06	17 (5/29)	5.18E-02
		NC-wMel	28	39 (11/28)		0 (0/28)	
CHIKV	3	NC-WT	30	97 (29/30)	2.29E-13	23 (7/30)	1.05E-02
		NC-wMel	29	7 (2/29)		0 (0/29)	
	7	NC-WT	30	97 (29/30)	1.88E-11	7 (2/30)	4.92E-01
		NC-wMel	30	13 (4/30)		0 (0/30)	
	14	NC-WT	30	100 (30/30)	1.69E-17	10 (3/30)	2.37E-01
		NC-wMel	30	0 (0/30)		0 (0/30)	
ZIKV	7	NC-WT	25	72 (18/25)	5.33E-08	0 (0/25)	1
		NC-wMel	24	0 (0/24)		0 (0/24)	
	14	NC-WT	20	85 (17/20)	1.50E-07	20 (4/20)	2.29E-02
		NC-wMel	29	10 (3/29)		0 (0/29)	

730 *: Value obtained when data of the two mosquito strains were statistically compared
 731 Infection (number of infected bodies / number of mosquitoes tested)
 732 Transmission (number of infected saliva / number of mosquitoes tested)
 733

734 **Supplementary Table 2:** Infection rates and medians of viral titers obtained for the four DENV
 735 serotypes, according to the mosquito strain at 14 days post-challenge.

DENV	Mosquito strain	Number of individuals	% of infection	<i>p</i> -value* for infection	Median	Interquartile range	<i>p</i> -value* for median
DENV-1	NC-WT	47	94 (44/47)	4.26E-10	808000	792750	9.68E-06
	NC-wMel	48	33 (16/48)		160500	330975	
	AUS-Tet	32	75 (24/32)	6.64E-07	648000	253750	9.35E-05
	AUS-wMel	48	19 (9/48)		27500	289060	
DENV-2	NC-WT	46	96 (44/46)	1.24E-14	928000	857750	8.36E-11
	NC-wMel	48	21 (10/48)		38000	46102	
	AUS-Tet	41	98 (40/41)	2.58E-15	840500	703750	1.16E-05
	AUS-wMel	45	18 (8/45)		6275	32235	
DENV-3	NC-WT	48	96 (46/48)	2.48E-06	1165000	1181000	1.40E-09
	NC-wMel	47	55 (26/47)		149500	283425	
	AUS-Tet	34	97 (33/34)	6.00E-06	1300000	1232000	6.54E-08
	AUS-wMel	43	51 (22/43)		6680	129877	
DENV-4	NC-WT	47	96 (45/47)	9.02E-16	172000	106000	4.59E-04
	NC-wMel	46	17 (8/46)		8600	11547	
	AUS-Tet	45	98 (44/45)	6.13E-17	108000	78600	1.14E-05
	AUS-wMel	48	17 (8/48)		6230	7258	

736 *: Value obtained when data of the two mosquito strains were statistically compared
 737 Infection (number of infected bodies / number of mosquitoes tested)
 738 Medians and interquartile ranges were expressed in DENV copies per mosquito
 739

PARTIE III : DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES



CHAPITRE I : DISCUSSION GENERALE

Le profil épidémiologique de la dengue en Nouvelle-Calédonie est en évolution ces quinze dernières années avec notamment un remplacement de génotype du DENV-1 décrit pour la première fois en 2012, ainsi qu'une co-circulation de plusieurs sérotypes de DENV, dont l'issue n'a pas conduit au remplacement de sérotype classiquement attendu. En 2018, la Nouvelle-Calédonie a rejoint le World Mosquito Program afin de lutter contre la dengue, problème de santé publique important sur le territoire, par la mise en place de la stratégie *Wolbachia*. Dans ce contexte, ce travail de thèse s'est intéressé à la caractérisation des facteurs virologiques et environnementaux influençant la transmission du DENV chez son vecteur, *Ae. aegypti*. Ce travail a permis de mettre en évidence (i) le rôle du vecteur dans la sélection des souches de DENV, et (ii) l'impact négatif induit par la bactérie *Wolbachia* sur la transmission du DENV.

1.1 ROLE DU VECTEUR DANS LA SELECTION DES SOUCHES DE DENV CIRCULANTES

L'évaluation de la compétence vectorielle du vecteur local *Ae. aegypti* pour les quatre sérotypes de DENV (publication 1) a mis en évidence l'importance de la barrière physiologique que représente l'épithélium intestinal chez le vecteur (Franz et al., 2015). En effet, malgré un titre infectieux élevé dans le repas sanguin, les taux d'infection des moustiques n'excédaient pas 60%. Toutefois, au regard des taux de dissémination proches de 100%, lorsqu'un moustique est infecté, le virus dissémine à priori facilement vers les autres organes internes. Dans ce contexte, il semblerait donc qu'une barrière se situe à l'entrée du virus dans les cellules de l'épithélium digestif, et non pas au niveau de l'échappement du virus vers l'hémocœle (Figure 18). Les mécanismes sous-jacents à cette barrière physiologique pourraient être liés à la liaison des virus avec les protéines membranaires permettant leur fixation et leur internalisation dans l'épithélium digestif. Plusieurs protéines ou glycoprotéines ont été identifiées comme des potentiels récepteurs cellulaires, et l'existence d'une certaine spécificité de ceux-ci envers les arbovirus aurait été observée (Franz et al., 2015). Une autre explication pourrait être le système immunitaire inné du moustique, qui inhiberait potentiellement la réplication des virus dans les cellules épithéliales, comme cela a pu être

observé pour le DENV-2 suite à l'amorçage de la voie RNAi (Franz et al., 2006; Franz et al., 2014). La seconde barrière physiologique présente chez le vecteur, les glandes salivaires, aurait également un impact sur la transmission virale (Franz et al., 2015). Nos conditions expérimentales ne nous ont toutefois pas permis d'évaluer plus précisément par quels mécanismes celle-ci influençait le cycle de transmission du virus chez le vecteur.

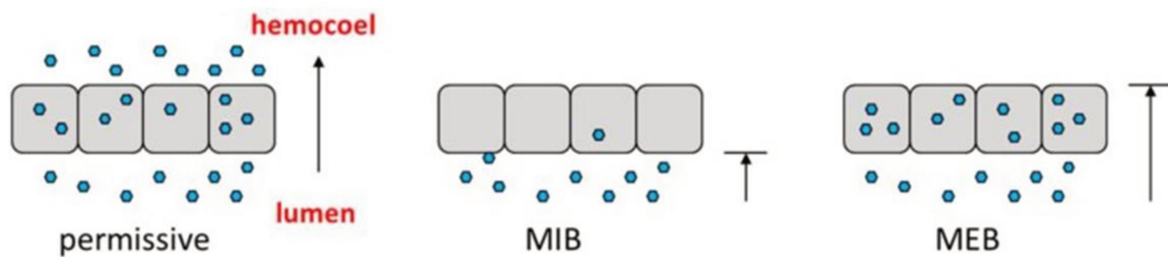


Figure 18. Représentation schématique de la perméabilité des cellules de l'épithélium digestif et des deux types de barrières existantes : la barrière à l'infection des cellules (« Midgut Infection Barrier », MIB) et la barrière à l'échappement des cellules (« Midgut Escape Barrier », MEB).

Source : Adapté de (Franz et al., 2015)

Face au profil épidémiologique de la dengue observé en Nouvelle-Calédonie ces dernières années, on aurait pu s'attendre à une différence de fitness de transmission entre les différents sérotypes/génotypes de DENV au sein d'*Ae. aegypti*, comme cela a pu être démontré sur l'île Santiago au Cap Vert (da Moura et al., 2015). En effet, la circulation prolongée du DENV-1 malgré une co-circulation avec du DENV-3 et du DENV-2 en 2014 et 2017 respectivement, pourrait s'expliquer par une meilleure fitness de transmission de ce sérotype. De plus, le remplacement de génotype au sein du DENV-1 observé pour la première fois à notre connaissance en Nouvelle-Calédonie en 2012, démontra une fitness épidémiologique du DENV en faveur du DENV-1 génotype I. Les travaux menés dans la publication 1 n'ont pas montré de différence pour les trois indices de compétence vectorielle mesurés, bien que les titres viraux observés à hauteur de chacun de ceux-ci variaient considérablement. Ces interrogations ont, en partie, pu être levées grâce au travail réalisé dans la publication 2 mettant en œuvre des expériences de compétition virale chez le vecteur. En effet, cette seconde étude a clairement mis en avant une différence de fitness de transmission chez *Ae. aegypti* entre le génotype I et le génotype IV du DENV-1. Cette différence de fitness est

observée dès l'étape d'infection du moustique, et elle se maintient jusqu'à l'étape ultime de la compétence vectorielle, qui est la transmission du virus via la salive. Cette différence de fitness de transmission pourrait s'expliquer par i) une affinité plus grande du génotype I pour les protéines membranaires des cellules épithéliales de l'intestin, ii) une différence de fitness répliquative entre les deux génotypes, ou iii) une compétition des virus pour les ressources disponibles. De plus, ces trois hypothèses pourraient également ne pas être mutuellement exclusives.

Ces travaux de caractérisation des facteurs viraux influençant la transmission virale démontrent la complexité de celle-ci chez le vecteur. Ils soulèvent notamment l'importance et la pertinence de la réalisation des tests de compétition pour étudier la fitness virale, dans le but de mieux appréhender l'émergence virale dans un contexte de co-circulation des arbovirus. Face au profil épidémiologique observé en Nouvelle-Calédonie, il serait intéressant de réaliser ces expériences de compétition pour comprendre l'absence de remplacement du DENV-1 génotype I par le DENV-3 en 2014 et 2017 (malgré la présence d'une population en grande partie immunitairement naïve pour ce sérotype, la dernière épidémie notifiée en Nouvelle-Calédonie datant de 1995-1996) Au cours de ce travail, nous avons également souligné que cette sélection virale au sein du moustique pourrait jouer un rôle dans un contexte épidémiologique différent comme le Cambodge, pays hyper-endémique pour la dengue, en participant à la dynamique évolutive à court terme du DENV. A cet effet, il serait intéressant d'élargir ces travaux à d'autres pays qui auraient observé des dynamiques évolutives similaires. Ces recherches devraient également être complétées par des études similaires chez l'hôte vertébré, une meilleure fitness de transmission virale observée chez un hôte pouvant ne pas être conservée chez l'autre hôte. Ces travaux nous permettraient très probablement d'approfondir nos connaissances sur les mécanismes à l'origine de l'émergence virale dans un environnement particulier.

1.2 IMPACT DE LA BACTERIE *WOLBACHIA* SUR LA TRANSMISSION VIRALE

Naturellement absente chez *Ae. aegypti*, plusieurs études ont mis en évidence que l'introduction de la bactérie *Wolbachia* chez cette espèce de moustique représentait une

alternative innovante dans les programmes de lutte contre les arboviroses, en limitant la réplication virale au sein du vecteur (Carrington et al., 2018; Dutra et al., 2016; Moreira et al., 2009; Walker et al., 2011; Ye et al., 2015). L'évaluation de la compétence vectorielle d'une population calédonienne d'*Ae. aegypti*, porteuse de la bactérie *Wolbachia* (publication 3), a mis en évidence une importante réduction de la fitness de transmission du DENV chez celle-ci. Ce travail a montré que la présence de bactérie intracellulaire impactait la fitness virale dès l'infection de l'épithélium intestinal avec des taux d'infection significativement plus faibles. Les travaux menés dans la publication 1 ont montré le rôle crucial que jouait cette barrière anatomique chez les populations natives d'*Ae. aegypti* en Nouvelle-Calédonie. Par ce travail, il est montré que la présence de la bactérie renforcerait encore davantage l'action de cette barrière. A ce jour, les mécanismes d'action précis de la bactérie *Wolbachia* sont encore méconnus. Toutefois, il se pourrait que cette dernière agisse sur le système immunitaire inné du moustique, le rendant plus prompt à répondre à l'infection virale (Terradas & McGraw, 2017; Ye et al., 2013).

Le travail mené dans la publication 3 s'est également intéressé à la capacité répliquative du DENV dans l'hémocoèle, en s'affranchissant du passage de la barrière de l'intestin. La modification environnementale induite par la présence de la bactérie *Wolbachia* altère également la réplication du DENV, avec en moyenne une réduction du nombre de copies d'ARN viral par moustique équivalente à un log. Les mécanismes sous-jacents responsables de cette altération sont également peu connus. La bactérie *Wolbachia* et le DENV étant deux organismes intracellulaires stricts, une compétition pour les ressources disponibles chez le vecteur, comme par exemple les acides aminés, les lipides et l'espace intracellulaire, pourrait expliquer cette altération de la fitness répliquative du DENV (Caragata et al., 2013; Caragata et al., 2014; Gillespie et al., 2010; Terradas & McGraw, 2017; White et al., 2017). En effet, il a été montré qu'une infection par le DENV-2 chez *Ae. aegypti* induisait des perturbations au niveau des profils lipidiques de l'intestin du moustique au cours de l'infection virale, avec notamment une augmentation de la teneur en lipides (Chotiwan et al., 2018). Des études ont également montré qu'une supplémentation en lipides lors d'une infection virale diminuerait le blocage induit par la bactérie *Wolbachia* (Caragata et al., 2013; Schultz et al., 2018), mettant en avant la compétition lipidique comme un mécanisme d'action de cette bactérie. Toutefois, une étude récente suggère que la bactérie *Wolbachia* induirait une action antagoniste indirecte,

plutôt qu'une compétition directe, contre le DENV au niveau lipidique, par la suppression des modulations lipidiques provirales nécessaires à la réplication du virus (Koh et al., 2020). Cette nouvelle méthode de lutte étant prometteuse, il serait intéressant de poursuivre les recherches sur les mécanismes d'actions responsable du blocage viral, afin de mieux comprendre la dynamique de cette interaction tripartite Vecteur-Arbovirus-*Wolbachia*.

CHAPITRE II : PERSPECTIVES

Ce travail de thèse a permis de mettre en évidence l'importance et la complexité des interactions virus/vecteur dans l'émergence d'une arbovirose, ainsi que l'influence d'une modification de l'environnement pourrait avoir sur celles-ci. L'hypothèse de la reine rouge, proposée par Leigh Van Valen en biologie évolutive, repose sur le fait qu'une évolution permanente d'une espèce est nécessaire pour maintenir son aptitude face aux évolutions des espèces avec lesquelles elle co-évolue. Comme souligné à plusieurs reprises au cours de ce manuscrit, les arbovirus, dont le DENV, ont démontré leur aptitude à s'adapter à un mode de transmission complexe mettant en jeu des hôtes très différents, ainsi que leur capacité à faire face à d'importantes pressions de sélection. Cependant, les facteurs à l'origine de l'évolution du DENV et de son adaptation aux changements environnementaux sont encore mal compris. Le déploiement de la stratégie *Wolbachia* en Nouvelle-Calédonie modifiera très certainement l'environnement proche du DENV (ainsi que des autres arbovirus), ce qui impactera très probablement sa fitness de transmission chez le vecteur. A ce jour, nous ne connaissons pas encore l'impact que pourrait avoir cette stratégie sur l'évolution du DENV.

En effet, une étude a montré que l'ampleur du blocage induit par la bactérie *Wolbachia* différerait selon qu'on l'étudiait chez des *Ae. aegypti*, porteurs de la bactérie, issus du terrain ou du laboratoire (Carrington et al., 2018), soulignant par là même l'influence des conditions expérimentales employées dans ce type d'étude. En conséquence, il est possible que l'établissement d'une population d'*Ae aegypti*, porteurs de la bactérie *Wolbachia*, entraînera une réduction substantielle de la transmission du DENV dans la zone géographique ciblée, mais cela pourrait ne pas être suffisant pour contrôler totalement les épidémies de dengue. De ce fait, des travaux futurs devraient s'orienter vers l'étude de l'évolution du DENV sous la pression exercée par *Wolbachia*, avec comme hypothèse de départ que le DENV arriverait à s'adapter à cette contrainte répliquative pour poursuivre sa répllication et sa transmission.

La Nouvelle-Calédonie serait un site expérimental idéal pour mener ce type d'étude car :

- (i) *Ae. aegypti* est le principal vecteur du DENV, CHIKV et ZIKV (*Aedes albopictus* n'étant pas présent);
- (ii) l'île a été relativement préservée des autres maladies tropicales;
- (iii) un réseau efficace de surveillance des arbovirus et des indices entomologiques est en place depuis des décennies;
- (iv) la dengue est actuellement en train d'y évoluer vers un mode endémo-

épidémique; et enfin car (v) la Nouvelle-Calédonie a rejoint le World Mosquito Program. Avec un déploiement de la stratégie sur la capitale Nouméa, deux contextes épidémiologiques spécifiques existeront dans ce milieu insulaire, avec d'un côté une partie de la population couverte par la stratégie *Wolbachia* et, de de l'autre, l'absence de cette contrainte évolutive environnementale. D'un point de vue pratique, l'efficacité de la stratégie de *Wolbachia* pourra ainsi être raisonnablement évaluée en Nouvelle-Calédonie à partir de données issues du terrain, comme i) le suivi de l'apparition des foyers de cas de dengue le cas échéant et leur diffusion selon la zone de couverture ou non par la stratégie, ou encore ii) le suivi temporel du maintien de la bactérie dans les populations d'*Ae. aegypti* présentes dans la capitale Nouméa. En parallèle, des recherches pourront également être menées autour de l'impact de la température (et de ses fluctuations) sur l'évolution des interactions virus-vecteur en présence de la bactérie *Wolbachia*, puisque celle-ci aurait un impact à la fois sur la bactérie et sur la capacité du vecteur à transmettre le virus. En effet, il a été montré que la température pouvait induire un stress larvaire, pouvant conduire à une réduction de la densité de *Wolbachia* chez les moustiques adultes (Ulrich et al., 2016), à une réduction de l'incompatibilité cytoplasmique et également de la transmission maternelle de la bactérie (Ross & Hoffmann, 2018; Ross et al., 2019; Ross et al., 2017). D'autre part, des études de compétence vectorielle concernant le DENV ont mis en évidence que la température influençait la transmission virale chez *Ae. aegypti* (Carrington et al., 2013a; Carrington et al., 2013b; Lambrechts et al., 2011). Il serait donc intéressant d'étudier l'évolution de la transmission virale chez le vecteur infecté par wMel sous l'influence de la température.

Les mécanismes menant à une épidémie d'arbovirose sont complexes et multifactoriels. Il paraît primordial d'intégrer, dans les recherches sur ces pathogènes, l'ensemble des acteurs et leurs interactions, ainsi que toutes les échelles auxquelles ils peuvent être étudiés. Lié à un volet plus fondamental, ces recherches devraient au final prendre en compte l'environnement local et régional de ces maladies afin de pouvoir proposer des connaissances et des réponses les plus adaptées au contexte local.

BIBLIOGRAPHIE

- Aliota, M. T., Peinado, S. A., Velez, I. D., & Osorio, J. E. (2016a). The wMel strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Zika virus by *Aedes aegypti*. *Sci Rep*, *6*, 28792. doi: 10.1038/srep28792
- Aliota, M. T., Walker, E. C., Uribe Yepes, A., Velez, I. D., Christensen, B. M., & Osorio, J. E. (2016b). The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of Chikungunya Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(4), e0004677. doi: 10.1371/journal.pntd.0004677
- Alphey, L., Benedict, M., Bellini, R., Clark, G. G., Dame, D. A., Service, M. W., & Dobson, S. L. (2010). Sterile-insect methods for control of mosquito-borne diseases: an analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *10*(3), 295-311. doi: 10.1089/vbz.2009.0014
- Alphey, L., McKemey, A., Nimmo, D., Neira Oviedo, M., Lacroix, R., Matzen, K., & Beech, C. (2013). Genetic control of *Aedes* mosquitoes. *Pathog Glob Health*, *107*(4), 170-179. doi: 10.1179/2047773213y.0000000095
- Anderson, J. R., & Rico-Hesse, R. (2006). *Aedes aegypti* vectorial capacity is determined by the infecting genotype of dengue virus. *Am J Trop Med Hyg*, *75*(5), 886-892.
- Armstrong, P. M., Ehrlich, H. Y., Magalhaes, T., Miller, M. R., Conway, P. J., Bransfield, A., Misencik, M. J., Gloria-Soria, A., Warren, J. L., Andreadis, T. G., Shepard, J. J., Foy, B. D., Pitzer, V. E., & Brackney, D. E. (2020). Successive blood meals enhance virus dissemination within mosquitoes and increase transmission potential. *Nat Microbiol*, *5*(2), 239-247. doi: 10.1038/s41564-019-0619-y
- Armstrong, P. M., & Rico-Hesse, R. (2001). Differential susceptibility of *Aedes aegypti* to infection by the American and Southeast Asian genotypes of dengue type 2 virus. *Vector Borne Zoonotic Dis*, *1*(2), 159-168. doi: 10.1089/153036601316977769
- Aubry, F., Dabo, S., Manet, C., Filipović, I., Rose, N. H., Miot, E. F., Martynow, D., Baidaliuk, A., Merklings, S. H., Dickson, L. B., Crist, A. B., Anyango, V. O., Romero-Vivas, C. M.,

- Vega-Rúa, A., Dusfour, I., Jiolle, D., Paupy, C., Mayanja, M. N., Lutwama, J. J., Kohl, A., Duong, V., Ponlawat, A., Sylla, M., Akorli, J., Otoo, S., Lutomiah, J., Sang, R., Mutebi, J. P., Cao-Lormeau, V. M., Jarman, R. G., Diagne, C. T., Faye, O., Sall, A. A., McBride, C. S., Montagnetelli, X., Rašić, G., & Lambrechts, L. (2020). Enhanced Zika virus susceptibility of globally invasive *Aedes aegypti* populations. *Science*, *370*(6519), 991-996. doi: 10.1126/science.abd3663
- Aubry, M., Roche, C., Dupont-Rouzeyrol, M., Aaskov, J., Viallon, J., Marfel, M., Lalita, P., Elbourne-Duituturaga, S., Chanteau, S., Musso, D., Pavlin, B. I., Harrison, D., Kool, J. L., & Cao-Lormeau, V. M. (2012). Use of serum and blood samples on filter paper to improve the surveillance of Dengue in Pacific Island Countries. *J Clin Virol*, *55*(1), 23-29. doi: 10.1016/j.jcv.2012.05.010
- Aubry, M., Teissier, A., Roche, C., Richard, V., Yan, A. S., Zisou, K., Rouault, E., Maria, V., Lastère, S., Cao-Lormeau, V. M., & Musso, D. (2015). Chikungunya outbreak, French Polynesia, 2014. *Emerg Infect Dis*, *21*(4), 724-726. doi: 10.3201/eid2104.141741
- Beatty, M. E., Letson, G. W., & Margolis, H. S. (2009). Estimating the Global Burden of Dengue. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, *81*((5 Suppl 1)), 231.
- Belkin, J. N. (1962). *The Mosquitoes of the South Pacific: (Diptera, Culicidae)*: University of California Press.
- Bell, S. M., Katzelnick, L., & Bedford, T. (2019). Dengue genetic divergence generates within-serotype antigenic variation, but serotypes dominate evolutionary dynamics. *Elife*, *8*. doi: 10.7554/eLife.42496
- Benedict, M. Q., & Robinson, A. S. (2003). The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol*, *19*(8), 349-355. doi: 10.1016/s1471-4922(03)00144-2
- Bennett, K. E., Flick, D., Fleming, K. H., Jochim, R., Beaty, B. J., & Black, W. C. t. (2005). Quantitative trait loci that control dengue-2 virus dissemination in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, *170*(1), 185-194. doi: 10.1534/genetics.104.035634

- Bennett, K. E., Olson, K. E., Muñoz Mde, L., Fernandez-Salas, I., Farfan-Ale, J. A., Higgs, S., Black, W. C. t., & Beaty, B. J. (2002). Variation in vector competence for dengue 2 virus among 24 collections of *Aedes aegypti* from Mexico and the United States. *Am J Trop Med Hyg*, *67*(1), 85-92. doi: 10.4269/ajtmh.2002.67.85
- Bhatt, P., Sabeena, S. P., Varma, M., & Arunkumar, G. (2020). Current Understanding of the Pathogenesis of Dengue Virus Infection. *Curr Microbiol*. doi: 10.1007/s00284-020-02284-w
- Bhatt, S., Gething, P. W., Brady, O. J., Messina, J. P., Farlow, A. W., Moyes, C. L., Drake, J. M., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Sankoh, O., Myers, M. F., George, D. B., Jaenisch, T., Wint, G. R., Simmons, C. P., Scott, T. W., Farrar, J. J., & Hay, S. I. (2013). The global distribution and burden of dengue. *Nature*, *496*(7446), 504-507. doi: 10.1038/nature12060
- Biswal, S., Borja-Tabora, C., Martinez Vargas, L., Velásquez, H., Theresa Alera, M., Sierra, V., Johana Rodriguez-Arenales, E., Yu, D., Wickramasinghe, V. P., Duarte Moreira, E., Jr., Fernando, A. D., Gunasekera, D., Kosalaraksa, P., Espinoza, F., López-Medina, E., Bravo, L., Tuboi, S., Hutagalung, Y., Garbes, P., Escudero, I., Rauscher, M., Bizjajeva, S., LeFevre, I., Borkowski, A., Saez-Llorens, X., & Wallace, D. (2020). Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in healthy children aged 4-16 years: a randomised, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*, *395*(10234), 1423-1433. doi: 10.1016/s0140-6736(20)30414-1
- Blair, C. D. (2011). Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiol*, *6*(3), 265-277. doi: 10.2217/fmb.11.11
- Blair, C. D., Adelman, Z. N., & Olson, K. E. (2000). Molecular strategies for interrupting arthropod-borne virus transmission by mosquitoes. *Clin Microbiol Rev*, *13*(4), 651-661. doi: 10.1128/cmr.13.4.651-661.2000
- Bollati, M., Alvarez, K., Assenberg, R., Baronti, C., Canard, B., Cook, S., Coutard, B., Decroly, E., de Lamballerie, X., Gould, E. A., Grard, G., Grimes, J. M., Hilgenfeld, R., Jansson, A. M., Malet, H., Mancini, E. J., Mastrangelo, E., Mattevi, A., Milani, M., Moureau, G.,

- Neyts, J., Owens, R. J., Ren, J., Selisko, B., Speroni, S., Steuber, H., Stuart, D. I., Unge, T., & Bolognesi, M. (2010). Structure and functionality in flavivirus NS-proteins: perspectives for drug design. *Antiviral Res*, *87*(2), 125-148. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.11.009
- Boonnak, K., Dambach, K. M., Donofrio, G. C., Tassaneetrithep, B., & Marovich, M. A. (2011). Cell type specificity and host genetic polymorphisms influence antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *J Virol*, *85*(4), 1671-1683. doi: 10.1128/jvi.00220-10
- Bosio, C. F., Fulton, R. E., Salasek, M. L., Beaty, B. J., & Black, W. C. t. (2000). Quantitative trait loci that control vector competence for dengue-2 virus in the mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics*, *156*(2), 687-698.
- Brackney, D. E., Pesko, K. N., Brown, I. K., Deardorff, E. R., Kawatachi, J., & Ebel, G. D. (2011). West Nile virus genetic diversity is maintained during transmission by *Culex pipiens quinquefasciatus* mosquitoes. *PLoS One*, *6*(9), e24466. doi: 10.1371/journal.pone.0024466
- Brady, O. J., Gething, P. W., Bhatt, S., Messina, J. P., Brownstein, J. S., Hoen, A. G., Moyes, C. L., Farlow, A. W., Scott, T. W., & Hay, S. I. (2012). Refining the global spatial limits of dengue virus transmission by evidence-based consensus. *PLoS Negl Trop Dis*, *6*(8), e1760. doi: 10.1371/journal.pntd.0001760
- Brownstein, J. S., Hett, E., & O'Neill, S. L. (2003). The potential of virulent *Wolbachia* to modulate disease transmission by insects. *J Invertebr Pathol*, *84*(1), 24-29. doi: 10.1016/s0022-2011(03)00082-x
- Calisher, C. H., Karabatsos, N., Dalrymple, J. M., Shope, R. E., Porterfield, J. S., Westaway, E. G., & Brandt, W. E. (1989). Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera. *J Gen Virol*, *70* (Pt 1), 37-43. doi: 10.1099/0022-1317-70-1-37
- Calvez, E., Guillaumot, L., Girault, D., Richard, V., O'Connor, O., Paoaafaite, T., Teurlai, M., Pocquet, N., Cao-Lormeau, V. M., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2017). Dengue-1 virus

- and vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) populations from New Caledonia. *Parasit Vectors*, *10*(1), 381. doi: 10.1186/s13071-017-2319-x
- Calvez, E., Guillaumot, L., Millet, L., Marie, J., Bossin, H., Rama, V., Faamoe, A., Kilama, S., Teurlai, M., Mathieu-Daudé, F., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2016). Genetic Diversity and Phylogeny of *Aedes aegypti*, the Main Arbovirus Vector in the Pacific. *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(1), e0004374. doi: 10.1371/journal.pntd.0004374
- Calvez, E., Mousson, L., Vazeille, M., O'Connor, O., Cao-Lormeau, V. M., Mathieu-Daudé, F., Pocquet, N., Failloux, A. B., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2018). Zika virus outbreak in the Pacific: Vector competence of regional vectors. *PLoS Negl Trop Dis*, *12*(7), e0006637. doi: 10.1371/journal.pntd.0006637
- Cao-Lormeau, V. M., & Musso, D. (2014). Emerging arboviruses in the Pacific. *Lancet*, *384*(9954), 1571-1572. doi: 10.1016/s0140-6736(14)61977-2
- Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Aubry, M., Teissier, A., Lastere, S., Daudens, E., Mallet, H. P., Musso, D., & Aaskov, J. (2011). Recent emergence of dengue virus serotype 4 in French Polynesia results from multiple introductions from other South Pacific Islands. *PLoS One*, *6*(12), e29555. doi: 10.1371/journal.pone.0029555
- Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Musso, D., Mallet, H. P., Dalipanda, T., Dofai, A., Nogareda, F., Nilles, E. J., & Aaskov, J. (2014a). Dengue virus type 3, South Pacific Islands, 2013. *Emerg Infect Dis*, *20*(6), 1034-1036. doi: 10.3201/eid2006.131413
- Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A. L., Mallet, H. P., Sall, A. A., & Musso, D. (2014b). Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*, *20*(6), 1085-1086. doi: 10.3201/eid2006.140138
- Capeding, M. R., Tran, N. H., Hadinegoro, S. R., Ismail, H. I., Chotpitayasunondh, T., Chua, M. N., Luong, C. Q., Rusmil, K., Wirawan, D. N., Nallusamy, R., Pitisuttithum, P., Thisyakorn, U., Yoon, I. K., van der Vliet, D., Langevin, E., Laot, T., Hutagalung, Y., Frago, C., Boaz, M., Wartel, T. A., Tornieporth, N. G., Saville, M., & Bouckennooghe, A. (2014). 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*, 384(9951), 1358-1365. doi: 10.1016/s0140-6736(14)61060-6
- Caragata, E. P., Rancès, E., Hedges, L. M., Gofton, A. W., Johnson, K. N., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2013). Dietary cholesterol modulates pathogen blocking by Wolbachia. *PLoS Pathog*, 9(6), e1003459. doi: 10.1371/journal.ppat.1003459
- Caragata, E. P., Rancès, E., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2014). Competition for amino acids between Wolbachia and the mosquito host, *Aedes aegypti*. *Microb Ecol*, 67(1), 205-218. doi: 10.1007/s00248-013-0339-4
- Carey, D. E. (1971). Chikungunya and dengue: a case of mistaken identity? *J Hist Med Allied Sci*, 26(3), 243-262. doi: 10.1093/jhmas/xxvi.3.243
- Carrington, L. B., Armijos, M. V., Lambrechts, L., & Scott, T. W. (2013a). Fluctuations at a low mean temperature accelerate dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(4), e2190. doi: 10.1371/journal.pntd.0002190
- Carrington, L. B., Seifert, S. N., Armijos, M. V., Lambrechts, L., & Scott, T. W. (2013b). Reduction of *Aedes aegypti* vector competence for dengue virus under large temperature fluctuations. *Am J Trop Med Hyg*, 88(4), 689-697. doi: 10.4269/ajtmh.12-0488
- Carrington, L. B., Tran, B. C. N., Le, N. T. H., Luong, T. T. H., Nguyen, T. T., Nguyen, P. T., Nguyen, C. V. V., Nguyen, H. T. C., Vu, T. T., Vo, L. T., Le, D. T., Vu, N. T., Nguyen, G. T., Luu, H. Q., Dang, A. D., Hurst, T. P., O'Neill, S. L., Tran, V. T., Kien, D. T. H., Nguyen, N. M., Wolbers, M., Wills, B., & Simmons, C. P. (2018). Field- and clinically derived estimates of Wolbachia-mediated blocking of dengue virus transmission potential in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(2), 361-366. doi: 10.1073/pnas.1715788115
- Carvalho, D. O., McKemey, A. R., Garziera, L., Lacroix, R., Donnelly, C. A., Alphey, L., Malavasi, A., & Capurro, M. L. (2015). Suppression of a Field Population of *Aedes aegypti* in Brazil by Sustained Release of Transgenic Male Mosquitoes. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(7), e0003864. doi: 10.1371/journal.pntd.0003864

- Chapman, E. G., Moon, S. L., Wilusz, J., & Kieft, J. S. (2014). RNA structures that resist degradation by Xrn1 produce a pathogenic Dengue virus RNA. *Elife*, *3*, e01892. doi: 10.7554/eLife.01892
- Chareonsirisuthigul, T., Kalayanaroj, S., & Ubol, S. (2007). Dengue virus (DENV) antibody-dependent enhancement of infection upregulates the production of anti-inflammatory cytokines, but suppresses anti-DENV free radical and pro-inflammatory cytokine production, in THP-1 cells. *J Gen Virol*, *88*(Pt 2), 365-375. doi: 10.1099/vir.0.82537-0
- Chen, W. J., Chen, S. L., & Fang, A. H. (1994). Phenotypic characteristics of dengue 2 virus persistently infected in a C6/36 clone of *Aedes albopictus* cells. *Intervirology*, *37*(1), 25-30. doi: 10.1159/000150352
- Chotiwan, N., Andre, B. G., Sanchez-Vargas, I., Islam, M. N., Grabowski, J. M., Hopf-Jannasch, A., Gough, E., Nakayasu, E., Blair, C. D., Belisle, J. T., Hill, C. A., Kuhn, R. J., & Perera, R. (2018). Dynamic remodeling of lipids coincides with dengue virus replication in the midgut of *Aedes aegypti* mosquitoes. *PLoS Pathog*, *14*(2), e1006853. doi: 10.1371/journal.ppat.1006853
- Chouin-Carneiro, T., & Dos Santos, F. (2017). Transmission of Major Arboviruses in Brazil: The Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* Vectors *Biological Control of Pest and Vector Insects*.
- Chouin-Carneiro, T., Vega-Rua, A., Vazeille, M., Yebakima, A., Girod, R., Goindin, D., Dupont-Rouzeyrol, M., Lourenço-de-Oliveira, R., & Failloux, A. B. (2016). Differential Susceptibilities of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. *PLoS Negl Trop Dis*, *10*(3), e0004543. doi: 10.1371/journal.pntd.0004543
- Chow, C. Y. (1967). *Aedes aegypti* in the Western Pacific Region. *Bull World Health Organ*, *36*(4), 544-546.
- Ciota, A. T., Ehrbar, D. J., Van Slyke, G. A., Payne, A. F., Willsey, G. G., Viscio, R. E., & Kramer, L. D. (2012a). Quantification of intrahost bottlenecks of West Nile virus in *Culex*

- pipiens mosquitoes using an artificial mutant swarm. *Infect Genet Evol*, 12(3), 557-564. doi: 10.1016/j.meegid.2012.01.022
- Ciota, A. T., Ehrbar, D. J., Van Slyke, G. A., Willsey, G. G., & Kramer, L. D. (2012b). Cooperative interactions in the West Nile virus mutant swarm. *BMC Evol Biol*, 12, 58. doi: 10.1186/1471-2148-12-58
- Ciota, A. T., & Kramer, L. D. (2010). Insights into arbovirus evolution and adaptation from experimental studies. *Viruses*, 2(12), 2594-2617. doi: 10.3390/v2122594
- Ciota, A. T., Ngo, K. A., Lovelace, A. O., Payne, A. F., Zhou, Y., Shi, P. Y., & Kramer, L. D. (2007). Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus. *J Gen Virol*, 88(Pt 3), 865-874. doi: 10.1099/vir.0.82606-0
- Clarke, B. D., Roby, J. A., Slonchak, A., & Khromykh, A. A. (2015). Functional non-coding RNAs derived from the flavivirus 3' untranslated region. *Virus Res*, 206, 53-61. doi: 10.1016/j.virusres.2015.01.026
- Coffey, L. L., Beeharry, Y., Bordería, A. V., Blanc, H., & Vignuzzi, M. (2011). Arbovirus high fidelity variant loses fitness in mosquitoes and mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(38), 16038-16043. doi: 10.1073/pnas.1111650108
- Coffey, L. L., Forrester, N., Tsetsarkin, K., Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2013). Factors shaping the adaptive landscape for arboviruses: implications for the emergence of disease. *Future Microbiol*, 8(2), 155-176. doi: 10.2217/fmb.12.139
- Combe, M., & Sanjuán, R. (2014). Variation in RNA virus mutation rates across host cells. *PLoS Pathog*, 10(1), e1003855. doi: 10.1371/journal.ppat.1003855
- Couret, J., Dotson, E., & Benedict, M. Q. (2014). Temperature, larval diet, and density effects on development rate and survival of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *PLoS One*, 9(2), e87468. doi: 10.1371/journal.pone.0087468
- Cruz-Oliveira, C., Freire, J. M., Conceição, T. M., Higa, L. M., Castanho, M. A., & Da Poian, A. T. (2015). Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiol Rev*, 39(2), 155-170. doi: 10.1093/femsre/fuu004

- da Moura, A. J., de Melo Santos, M. A., Oliveira, C. M., Guedes, D. R., de Carvalho-Leandro, D., da Cruz Brito, M. L., Rocha, H. D., Gómez, L. F., & Ayres, C. F. (2015). Vector competence of the *Aedes aegypti* population from Santiago Island, Cape Verde, to different serotypes of dengue virus. *Parasit Vectors*, *8*, 114. doi: 10.1186/s13071-015-0706-8
- DASS. (2020). La dengue, le chikungunya et le zika, from <https://dass.gouv.nc/votre-sante-maladies/la-dengue-le-chikungunya-et-le-zika>
- Daures, M., Champagnat, J., Grangeon, J. P., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2014). Etudes arboviroses ESANC. *La situation sanitaire de la Nouvelle-Calédonie en 2014*, DASS, 1.7.3. Retrieved from <https://dass.gouv.nc/votre-sante/documents-rapports-etudes>
- Dégallier, N., Hervé, J. P., Travassos da Rosa, A. P., & Sa, G. C. (1988). [Aedes aegypti (L.): importance of its bioecology in the transmission of dengue and other arboviruses. I]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, *81*(1), 97-110.
- Dejnirattisai, W., Jumnainsong, A., Onsirirakul, N., Fitton, P., Vasanawathana, S., Limpitikul, W., Puttikhunt, C., Edwards, C., Duangchinda, T., Supasa, S., Chawansuntati, K., Malasit, P., Mongkolsapaya, J., & Sreenton, G. (2010). Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. *Science*, *328*(5979), 745-748. doi: 10.1126/science.1185181
- Diallo, M., Ba, Y., Faye, O., Soumare, M. L., Dia, I., & Sall, A. A. (2008). Vector competence of *Aedes aegypti* populations from Senegal for sylvatic and epidemic dengue 2 virus isolated in West Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *102*(5), 493-498. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.02.010
- Domingo, E. (1992). Genetic variation and quasi-species. *Curr Opin Genet Dev*, *2*(1), 61-63. doi: 10.1016/s0959-437x(05)80323-5
- Domingo, E. (2010). Mechanisms of viral emergence. *Vet Res*, *41*(6), 38. doi: 10.1051/vetres/2010010

- Domingo, E., de Ávila, A. I., Gallego, I., Sheldon, J., & Perales, C. (2019). Viral fitness: history and relevance for viral pathogenesis and antiviral interventions. *Pathog Dis*, 77(2). doi: 10.1093/femspd/ftz021
- Domingo, E., & Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol*, 51, 151-178. doi: 10.1146/annurev.micro.51.1.151
- Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Pérez, A., García-Arriaza, J., & Arias, A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. *Curr Top Microbiol Immunol*, 299, 51-82. doi: 10.1007/3-540-26397-7_3
- Domingo, E., & Perales, C. (2018). Quasispecies and virus. *Eur Biophys J*, 47(4), 443-457. doi: 10.1007/s00249-018-1282-6
- Domingo, E., & Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genet*, 15(10), e1008271. doi: 10.1371/journal.pgen.1008271
- Domingo, E., Sheldon, J., & Perales, C. (2012). Viral quasispecies evolution. *Microbiol Mol Biol Rev*, 76(2), 159-216. doi: 10.1128/mnbr.05023-11
- Duong, V., Lambrechts, L., Paul, R. E., Ly, S., Lay, R. S., Long, K. C., Huy, R., Tarantola, A., Scott, T. W., Sakuntabhai, A., & Buchy, P. (2015). Asymptomatic humans transmit dengue virus to mosquitoes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112(47), 14688-14693. doi: 10.1073/pnas.1508114112
- Dupont-Rouzeyrol, M., Aubry, M., O'Connor, O., Roche, C., Gourinat, A. C., Guigon, A., Pyke, A., Grangeon, J. P., Nilles, E., Chanteau, S., Aaskov, J., & Cao-Lormeau, V. M. (2014). Epidemiological and molecular features of dengue virus type-1 in New Caledonia, South Pacific, 2001-2013. *Virology*, 11, 61. doi: 10.1186/1743-422x-11-61
- Dupont-Rouzeyrol, M., Caro, V., Guillaumot, L., Vazeille, M., D'Ortenzio, E., Thiberge, J. M., Baroux, N., Gourinat, A. C., Grandadam, M., & Failloux, A. B. (2012). Chikungunya virus and the mosquito vector *Aedes aegypti* in New Caledonia (South Pacific Region). *Vector Borne Zoonotic Dis*, 12(12), 1036-1041. doi: 10.1089/vbz.2011.0937

- Dupont-Rouzeyrol, M., O'Connor, O., Calvez, E., Daurès, M., John, M., Grangeon, J. P., & Gourinat, A. C. (2015). Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis*, *21*(2), 381-382. doi: 10.3201/eid2102.141553
- Dutra, H. L., Rocha, M. N., Dias, F. B., Mansur, S. B., Caragata, E. P., & Moreira, L. A. (2016). Wolbachia Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe*, *19*(6), 771-774. doi: 10.1016/j.chom.2016.04.021
- Duvallet, G., Fontenille, D., & Robert, V. (2017). Entomologie médicale et vétérinaire. In M. I. Éditions (Ed.): Marseille : IRD Éditions. doi: 10.4000/books.irdeditions.21923
- Elliott, S. A. (1980). *Aedes albopictus* in the Solomon and Santa Cruz Islands, South Pacific. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, *74*(6), 747-748. doi: 10.1016/0035-9203(80)90192-3
- Fansiri, T., Fontaine, A., Diancourt, L., Caro, V., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., Jarman, R. G., Ponlawat, A., & Lambrechts, L. (2013). Genetic mapping of specific interactions between *Aedes aegypti* mosquitoes and dengue viruses. *PLoS Genet*, *9*(8), e1003621. doi: 10.1371/journal.pgen.1003621
- Farnesi, L. C., Menna-Barreto, R. F., Martins, A. J., Valle, D., & Rezende, G. L. (2015). Physical features and chitin content of eggs from the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*: Connection with distinct levels of resistance to desiccation. *J Insect Physiol*, *83*, 43-52. doi: 10.1016/j.jinsphys.2015.10.006
- Fauran, P., Le Gonidec, G., & Rodhain, F. (1984). [Research on viral infections in South Pacific mosquitoes under natural conditions]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales*, *77*(5), 628-636.
- Fernandes, R. S., O'Connor, O., Bersot, M. I. L., Girault, D., Dokunengo, M. R., Pocquet, N., Dupont-Rouzeyrol, M., & Lourenço-de-Oliveira, R. (2020). Vector Competence of *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus* from Brazil and New Caledonia for Three Zika Virus Lineages. *Pathogens*, *9*(7). doi: 10.3390/pathogens9070575

- Finol, E., & Ooi, E. E. (2019). Evolution of Subgenomic RNA Shapes Dengue Virus Adaptation and Epidemiological Fitness. *iScience*, *16*, 94-105. doi: 10.1016/j.isci.2019.05.019
- Fontaine, A., Diouf, I., Bakkali, N., Missé, D., Pagès, F., Fusai, T., Rogier, C., & Almeras, L. (2011). Implication of haematophagous arthropod salivary proteins in host-vector interactions. *Parasit Vectors*, *4*, 187. doi: 10.1186/1756-3305-4-187
- Fontenille, D., Lagneau, C., Lecollinet, S., Lefait-Robin, R., Setbon, M., Tirel, B., & Yébakima, A. (2009). La lutte antivectorielle en France. In M. I. Éditions (Ed.): Marseille : IRD Éditions. doi: 10.4000/books.irdeditions.1214
- Forrester, N. L., Coffey, L. L., & Weaver, S. C. (2014). Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses*, *6*(10), 3991-4004. doi: 10.3390/v6103991
- Forrester, N. L., Guerbois, M., Seymour, R. L., Spratt, H., & Weaver, S. C. (2012). Vector-borne transmission imposes a severe bottleneck on an RNA virus population. *PLoS Pathog*, *8*(9), e1002897. doi: 10.1371/journal.ppat.1002897
- Franz, A. W., Kantor, A. M., Passarelli, A. L., & Clem, R. J. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses*, *7*(7), 3741-3767. doi: 10.3390/v7072795
- Franz, A. W., Sanchez-Vargas, I., Adelman, Z. N., Blair, C. D., Beaty, B. J., James, A. A., & Olson, K. E. (2006). Engineering RNA interference-based resistance to dengue virus type 2 in genetically modified *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(11), 4198-4203. doi: 10.1073/pnas.0600479103
- Franz, A. W., Sanchez-Vargas, I., Raban, R. R., Black, W. C. t., James, A. A., & Olson, K. E. (2014). Fitness impact and stability of a transgene conferring resistance to dengue-2 virus following introgression into a genetically diverse *Aedes aegypti* strain. *PLoS Negl Trop Dis*, *8*(5), e2833. doi: 10.1371/journal.pntd.0002833
- Fraser, J. E., De Bruyne, J. T., Iturbe-Ormaetxe, I., Stepnell, J., Burns, R. L., Flores, H. A., & O'Neill, S. L. (2017). Novel Wolbachia-transinfected *Aedes aegypti* mosquitoes

possess diverse fitness and vector competence phenotypes. *PLoS Pathog*, 13(12), e1006751. doi: 10.1371/journal.ppat.1006751

Garrett-Jones, C., & Grab, B. (1964). THE ASSESSMENT OF INSECTICIDAL IMPACT ON THE MALARIA MOSQUITO'S VECTORIAL CAPACITY, FROM DATA ON THE PROPORTION OF PAROUS FEMALES. *Bull World Health Organ*, 31(1), 71-86.

Gaye, A., Faye, O., Diagne, C. T., Diallo, D., Weaver, S. C., Sall, A. A., & Diallo, M. (2014). Oral susceptibility of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Senegal for dengue serotypes 1 and 3 viruses. *Trop Med Int Health*, 19(11), 1355-1359. doi: 10.1111/tmi.12373

GBD 2017 DALYs, & HALE Collaborators. (2018). Global, regional, and national disability-adjusted life-years (DALYs) for 359 diseases and injuries and healthy life expectancy (HALE) for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet*, 392(10159), 1859-1922. doi: 10.1016/s0140-6736(18)32335-3

Gillespie, L. K., Hoenen, A., Morgan, G., & Mackenzie, J. M. (2010). The endoplasmic reticulum provides the membrane platform for biogenesis of the flavivirus replication complex. *J Virol*, 84(20), 10438-10447. doi: 10.1128/jvi.00986-10

Gloria-Soria, A., Armstrong, P. M., Powell, J. R., & Turner, P. E. (2017). Infection rate of *Aedes aegypti* mosquitoes with dengue virus depends on the interaction between temperature and mosquito genotype. *Proc Biol Sci*, 284(1864). doi: 10.1098/rspb.2017.1506

Go, Y. Y., Balasuriya, U. B., & Lee, C. K. (2014). Zoonotic encephalitides caused by arboviruses: transmission and epidemiology of alphaviruses and flaviviruses. *Clin Exp Vaccine Res*, 3(1), 58-77. doi: 10.7774/cevr.2014.3.1.58

Goic, B., & Saleh, M. C. (2012). Living with the enemy: viral persistent infections from a friendly viewpoint. *Curr Opin Microbiol*, 15(4), 531-537. doi: 10.1016/j.mib.2012.06.002

- Goic, B., Stapleford, K. A., Frangeul, L., Doucet, A. J., Gausson, V., Blanc, H., Schemmel-Jofre, N., Cristofari, G., Lambrechts, L., Vignuzzi, M., & Saleh, M. C. (2016). Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection. *Nat Commun*, *7*, 12410. doi: 10.1038/ncomms12410
- Gomez-Machorro, C., Bennett, K. E., del Lourdes Munoz, M., & Black, W. C. t. (2004). Quantitative trait loci affecting dengue midgut infection barriers in an advanced intercross line of *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, *13*(6), 637-648. doi: 10.1111/j.0962-1075.2004.00522.x
- Goncalvez, A. P., Escalante, A. A., Pujol, F. H., Ludert, J. E., Tovar, D., Salas, R. A., & Liprandi, F. (2002). Diversity and evolution of the envelope gene of dengue virus type 1. *Virology*, *303*(1), 110-119. doi: 10.1006/viro.2002.1686
- Grange, L., Simon-Lorriere, E., Sakuntabhai, A., Gresh, L., Paul, R., & Harris, E. (2014). Epidemiological risk factors associated with high global frequency of inapparent dengue virus infections. *Front Immunol*, *5*, 280. doi: 10.3389/fimmu.2014.00280
- Gubler, D. J. (1997). Epidemic Dengue/Dengue Haemorrhagic Fever: a global public health problem in the 21st century. *Dengue Bulletin*, *21*, 1-19.
- Gubler, D. J. (1998). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin Microbiol Rev*, *11*(3), 480-496.
- Gubler, D. J. (2002). The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. *Arch Med Res*, *33*(4), 330-342. doi: 10.1016/s0188-4409(02)00378-8
- Gubler, D. J. (2004). The changing epidemiology of yellow fever and dengue, 1900 to 2003: full circle? *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*, *27*(5), 319-330. doi: 10.1016/j.cimid.2004.03.013
- Gubler, D. J., & Clark, G. G. (1995). Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis*, *1*(2), 55-57. doi: 10.3201/eid0102.952004
- Guillaumot, L. (2005). Arboviruses and their vectors in the Pacific--status report. *Pac Health Dialog*, *12*(2), 45-52.

- Guillaumot, L., Ofanoa, R., Swillen, L., Singh, N., Bossin, H. C., & Schaffner, F. (2012). Distribution of *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae) in southwestern Pacific countries, with a first report from the Kingdom of Tonga. *Parasit Vectors*, *5*, 247. doi: 10.1186/1756-3305-5-247
- Guzman, A., & Istúriz, R. E. (2010). Update on the global spread of dengue. *Int J Antimicrob Agents*, *36 Suppl 1*, S40-42. doi: 10.1016/j.ijantimicag.2010.06.018
- Guzman, M. G., Halstead, S. B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D. J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H. S., Martínez, E., Nathan, M. B., Pelegrino, J. L., Simmons, C., Yoksan, S., & Peeling, R. W. (2010). Dengue: a continuing global threat. *Nat Rev Microbiol*, *8*(12 Suppl), S7-16. doi: 10.1038/nrmicro2460
- Guzman, M. G., & Vazquez, S. (2010). The complexity of antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Viruses*, *2*(12), 2649-2662. doi: 10.3390/v2122649
- Hadinegoro, S. R., Arredondo-García, J. L., Capeding, M. R., Deseda, C., Chotpitayasunondh, T., Dietze, R., Muhammad Ismail, H. I., Reynales, H., Limkittikul, K., Rivera-Medina, D. M., Tran, H. N., Bouckennooghe, A., Chansinghakul, D., Cortés, M., Fanouillere, K., Forrat, R., Frago, C., Gailhardou, S., Jackson, N., Noriega, F., Plennevaux, E., Wartel, T. A., Zambrano, B., & Saviile, M. (2015). Efficacy and Long-Term Safety of a Dengue Vaccine in Regions of Endemic Disease. *N Engl J Med*, *373*(13), 1195-1206. doi: 10.1056/NEJMoa1506223
- Halstead, S. B. (1980). Dengue haemorrhagic fever--a public health problem and a field for research. *Bull World Health Organ*, *58*(1), 1-21.
- Halstead, S. B. (2015). Pathogenesis of Dengue: Dawn of a New Era. *F1000Res*, *4*. doi: 10.12688/f1000research.7024.1
- Halstead, S. B., Nimmannitya, S., & Cohen, S. N. (1970). Observations related to pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. IV. Relation of disease severity to antibody response and virus recovered. *Yale J Biol Med*, *42*(5), 311-328.

- Halstead, S. B., & O'Rourke, E. J. (1977). Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *J Exp Med*, *146*(1), 201-217. doi: 10.1084/jem.146.1.201
- Halstead, S. B., & Russell, P. K. (2016). Protective and immunological behavior of chimeric yellow fever dengue vaccine. *Vaccine*, *34*(14), 1643-1647. doi: 10.1016/j.vaccine.2016.02.004
- Hammon, W. M., Rudnick, A., Sather, G., Rogers, K. D., & Morse, L. J. (1960). New hemorrhagic fevers of children in the Philippines and Thailand. *Trans Assoc Am Physicians*, *73*, 140-155.
- Harapan, H., Michie, A., Sasmono, R. T., & Imrie, A. (2020). Dengue: A Minireview. *Viruses*, *12*(8). doi: 10.3390/v12080829
- Harbach, R. (2008). Culicidae, from <http://mosquito-taxonomic-inventory.info/>
- Hardy, J. L., Houk, E. J., Kramer, L. D., & Reeves, W. C. (1983). Intrinsic factors affecting vector competence of mosquitoes for arboviruses. *Annu Rev Entomol*, *28*, 229-262. doi: 10.1146/annurev.en.28.010183.001305
- Harrington, L. C., Scott, T. W., Lerdthusnee, K., Coleman, R. C., Costero, A., Clark, G. G., Jones, J. J., Kitthawee, S., Kittayapong, P., Sithiprasasna, R., & Edman, J. D. (2005). Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *Am J Trop Med Hyg*, *72*(2), 209-220.
- Hayes, E. B., & Gubler, D. J. (1992). Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Pediatr Infect Dis J*, *11*(4), 311-317. doi: 10.1097/00006454-199204000-00010
- Henchal, E. A., & Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clin Microbiol Rev*, *3*(4), 376-396. doi: 10.1128/cmr.3.4.376
- Hery, L., Boullis, A., Delannay, C., & Vega-Rúa, A. (2019). Transmission potential of African, Asian and American Zika virus strains by *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus* from Guadeloupe (French West Indies). *Emerg Microbes Infect*, *8*(1), 699-706. doi: 10.1080/22221751.2019.1615849

- Holmes, E. C. (2006). The evolutionary biology of dengue virus. *Novartis Found Symp*, 277, 177-187; discussion 187-192, 251-173. doi: 10.1002/0470058005.ch13
- Holmes, E. C., & Twiddy, S. S. (2003). The origin, emergence and evolutionary genetics of dengue virus. *Infect Genet Evol*, 3(1), 19-28. doi: 10.1016/s1567-1348(03)00004-2
- Indriani, C., Tantowijoyo, W., Rancès, E., Andari, B., Prabowo, E., Yusdi, D., Ansari, M. R., Wardana, D. S., Supriyati, E., Nurhayati, I., Ernesia, I., Setyawan, S., Fitriana, I., Arguni, E., Amelia, Y., Ahmad, R. A., Jewell, N. P., Dufault, S. M., Ryan, P. A., Green, B. R., McAdam, T. F., O'Neill, S. L., Tanamas, S. K., Simmons, C. P., Anders, K. L., & Utarini, A. (2020). Reduced dengue incidence following deployments of Wolbachia-infected *Aedes aegypti* in Yogyakarta, Indonesia: a quasi-experimental trial using controlled interrupted time series analysis. *Gates Open Res*, 4, 50. doi: 10.12688/gatesopenres.13122.1
- Inizan, C., O'Connor, O., Worwor, G., Cabemaiwai, T., Grignon, J. C., Girault, D., Minier, M., Prot, M., Ballan, V., Pakoa, G. J., Grangeon, J. P., Guyant, P., Lepers, C., Faktaufon, D., Sahukhan, A., Merilles, O. E., Jr., Gourinat, A. C., Simon-Lorière, E., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2020). Molecular Characterization of Dengue Type 2 Outbreak in Pacific Islands Countries and Territories, 2017-2020. *Viruses*, 12(10). doi: 10.3390/v12101081
- Inizan, C., Tarantola, A., O'Connor, O., Mangeas, M., Pocquet, N., Forfait, C., Descloux, E., Gourinat, A. C., Pfannstiel, A., Klement-Frutos, E., Menkes, C., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2019). Dengue in New Caledonia: Knowledge and Gaps. *Trop Med Infect Dis*, 4(2). doi: 10.3390/tropicalmed4020095
- James, A. (1994). Molecular and biochemical analyses of the salivary glands of vector mosquitoes. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 92(2), 133-150.
- Jansen, C. C., & Beebe, N. W. (2010). The dengue vector *Aedes aegypti*: what comes next. *Microbes Infect*, 12(4), 272-279. doi: 10.1016/j.micinf.2009.12.011

- Jenkins, G. M., Rambaut, A., Pybus, O. G., & Holmes, E. C. (2002). Rates of molecular evolution in RNA viruses: a quantitative phylogenetic analysis. *J Mol Evol*, *54*(2), 156-165. doi: 10.1007/s00239-001-0064-3
- Jerzak, G. V., Bernard, K., Kramer, L. D., Shi, P. Y., & Ebel, G. D. (2007). The West Nile virus mutant spectrum is host-dependant and a determinant of mortality in mice. *Virology*, *360*(2), 469-476. doi: 10.1016/j.virol.2006.10.029
- Juárez-Martínez, A. B., Vega-Almeida, T. O., Salas-Benito, M., García-Espitia, M., De Nova-Ocampo, M., Del Ángel, R. M., & Salas-Benito, J. S. (2013). Detection and sequencing of defective viral genomes in C6/36 cells persistently infected with dengue virus 2. *Arch Virol*, *158*(3), 583-599. doi: 10.1007/s00705-012-1525-2
- Katzelnick, L. C., Fonville, J. M., Gromowski, G. D., Bustos Arriaga, J., Green, A., James, S. L., Lau, L., Montoya, M., Wang, C., VanBlargan, L. A., Russell, C. A., Thu, H. M., Pierson, T. C., Buchy, P., Aaskov, J. G., Muñoz-Jordán, J. L., Vasilakis, N., Gibbons, R. V., Tesh, R. B., Osterhaus, A. D., Fouchier, R. A., Durbin, A., Simmons, C. P., Holmes, E. C., Harris, E., Whitehead, S. S., & Smith, D. J. (2015). Dengue viruses cluster antigenically but not as discrete serotypes. *Science*, *349*(6254), 1338-1343. doi: 10.1126/science.aac5017
- Khadka, S., Vangeloff, A. D., Zhang, C., Siddavatam, P., Heaton, N. S., Wang, L., Sengupta, R., Sahasrabudhe, S., Randall, G., Gribskov, M., Kuhn, R. J., Perera, R., & LaCount, D. J. (2011). A physical interaction network of dengue virus and human proteins. *Mol Cell Proteomics*, *10*(12), M111 012187. doi: 10.1074/mcp.M111.012187
- Kliks, S. C., Nimmanitya, S., Nisalak, A., & Burke, D. S. (1988). Evidence that maternal dengue antibodies are important in the development of dengue hemorrhagic fever in infants. *Am J Trop Med Hyg*, *38*(2), 411-419. doi: 10.4269/ajtmh.1988.38.411
- Knox, T. B., Kay, B. H., Hall, R. A., & Ryan, P. A. (2003). Enhanced vector competence of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from the Torres Strait compared with mainland Australia for dengue 2 and 4 viruses. *J Med Entomol*, *40*(6), 950-956. doi: 10.1603/0022-2585-40.6.950

- Koh, C., Islam, M. N., Ye, Y. H., Chotiwan, N., Graham, B., Belisle, J. T., Kouremenos, K. A., Dayalan, S., Tull, D. L., Klatt, S., Perera, R., & McGraw, E. A. (2020). Dengue virus dominates lipid metabolism modulations in Wolbachia-coinfected *Aedes aegypti*. *Commun Biol*, 3(1), 518. doi: 10.1038/s42003-020-01254-z
- Krol, L., Gorsich, E. E., Hunting, E. R., Govender, D., van Bodegom, P. M., & Schrama, M. (2019). Eutrophication governs predator-prey interactions and temperature effects in *Aedes aegypti* populations. *Parasit Vectors*, 12(1), 179. doi: 10.1186/s13071-019-3431-x
- Kucharski, A. J., Kama, M., Watson, C. H., Aubry, M., Funk, S., Henderson, A. D., Brady, O. J., Vanhomwegen, J., Manuguerra, J. C., Lau, C. L., Edmunds, W. J., Aaskov, J., Nilles, E. J., Cao-Lormeau, V. M., Hué, S., & Hibberd, M. L. (2018). Using paired serology and surveillance data to quantify dengue transmission and control during a large outbreak in Fiji. *Elife*, 7. doi: 10.7554/eLife.34848
- Kuhn, R. J., Zhang, W., Rossmann, M. G., Pletnev, S. V., Corver, J., Lenches, E., Jones, C. T., Mukhopadhyay, S., Chipman, P. R., Strauss, E. G., Baker, T. S., & Strauss, J. H. (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*, 108(5), 717-725. doi: 10.1016/s0092-8674(02)00660-8
- Kuno, G. (2009). Emergence of the severe syndrome and mortality associated with dengue and dengue-like illness: historical records (1890 to 1950) and their compatibility with current hypotheses on the shift of disease manifestation. *Clin Microbiol Rev*, 22(2), 186-201, Table of Contents. doi: 10.1128/cmr.00052-08
- Kurosu, T. (2011). Quasispecies of dengue virus. *Trop Med Health*, 39(4 Suppl), 29-36. doi: 10.2149/tmh.2011-S02
- Lacey, L. A. (2007). *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc*, 23(2 Suppl), 133-163. doi: 10.2987/8756-971x(2007)23[133:btsiab]2.0.co;2
- Lacroix, R., McKemey, A. R., Raduan, N., Kwee Wee, L., Hong Ming, W., Guat Ney, T., Rahidah, A. A. S., Salman, S., Subramaniam, S., Nordin, O., Hanum, A. T. N.,

- Angamuthu, C., Marlina Mansor, S., Lees, R. S., Naish, N., Scaife, S., Gray, P., Labbé, G., Beech, C., Nimmo, D., Alphey, L., Vasan, S. S., Han Lim, L., Wasi, A. N., & Murad, S. (2012). Open field release of genetically engineered sterile male *Aedes aegypti* in Malaysia. *PLoS One*, *7*(8), e42771. doi: 10.1371/journal.pone.0042771
- Lambrechts, L. (2011). Quantitative genetics of *Aedes aegypti* vector competence for dengue viruses: towards a new paradigm? *Trends Parasitol*, *27*(3), 111-114. doi: 10.1016/j.pt.2010.12.001
- Lambrechts, L., Chevillon, C., Albright, R. G., Thaisomboonsuk, B., Richardson, J. H., Jarman, R. G., & Scott, T. W. (2009). Genetic specificity and potential for local adaptation between dengue viruses and mosquito vectors. *BMC Evol Biol*, *9*, 160. doi: 10.1186/1471-2148-9-160
- Lambrechts, L., Paaijmans, K. P., Fansiri, T., Carrington, L. B., Kramer, L. D., Thomas, M. B., & Scott, T. W. (2011). Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by *Aedes aegypti*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(18), 7460-7465. doi: 10.1073/pnas.1101377108
- Lanciotti, R. S., Gubler, D. J., & Trent, D. W. (1997). Molecular evolution and phylogeny of dengue-4 viruses. *J Gen Virol*, *78* (Pt 9), 2279-2284. doi: 10.1099/0022-1317-78-9-2279
- Lanciotti, R. S., Lewis, J. G., Gubler, D. J., & Trent, D. W. (1994). Molecular evolution and epidemiology of dengue-3 viruses. *J Gen Virol*, *75* (Pt 1), 65-75. doi: 10.1099/0022-1317-75-1-65
- Lepers, C. (2003). Dengue update - 17 January 2003. *Inform'ACTION*(13), 12-13.
- Lequime, S., Fontaine, A., Ar Gouilh, M., Moltini-Conclois, I., & Lambrechts, L. (2016). Genetic Drift, Purifying Selection and Vector Genotype Shape Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity in Mosquitoes. *PLoS Genet*, *12*(6), e1006111. doi: 10.1371/journal.pgen.1006111

- Lequime, S., & Lambrechts, L. (2014). Vertical transmission of arboviruses in mosquitoes: a historical perspective. *Infect Genet Evol*, *28*, 681-690. doi: 10.1016/j.meegid.2014.07.025
- Li, D. S., Liu, W., Guigon, A., Mostyn, C., Grant, R., & Aaskov, J. (2010). Rapid displacement of dengue virus type 1 by type 4, Pacific region, 2007-2009. *Emerg Infect Dis*, *16*(1), 123-125. doi: 10.3201/eid1601.091275
- Li, L., Lok, S. M., Yu, I. M., Zhang, Y., Kuhn, R. J., Chen, J., & Rossmann, M. G. (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*, *319*(5871), 1830-1834. doi: 10.1126/science.1153263
- Lindenbach, B. D., & Rice, C. M. (2003). Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*, *59*, 23-61. doi: 10.1016/s0065-3527(03)59002-9
- Low, J. G., Sung, C., Wijaya, L., Wei, Y., Rathore, A. P. S., Watanabe, S., Tan, B. H., Toh, L., Chua, L. T., Hou, Y., Chow, A., Howe, S., Chan, W. K., Tan, K. H., Chung, J. S., Cherg, B. P., Lye, D. C., Tambayah, P. A., Ng, L. C., Connolly, J., Hibberd, M. L., Leo, Y. S., Cheung, Y. B., Ooi, E. E., & Vasudevan, S. G. (2014). Efficacy and safety of celgosivir in patients with dengue fever (CELADEN): a phase 1b, randomised, double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial. *Lancet Infect Dis*, *14*(8), 706-715. doi: 10.1016/s1473-3099(14)70730-3
- Manokaran, G., Finol, E., Wang, C., Gunaratne, J., Bahl, J., Ong, E. Z., Tan, H. C., Sessions, O. M., Ward, A. M., Gubler, D. J., Harris, E., Garcia-Blanco, M. A., & Ooi, E. E. (2015). Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*, *350*(6257), 217-221. doi: 10.1126/science.aab3369
- Marcombe, S., Darriet, F., Tolosa, M., Agnew, P., Duchon, S., Etienne, M., Yp Tcha, M. M., Chandre, F., Corbel, V., & Yébakima, A. (2011). Pyrethroid resistance reduces the efficacy of space sprays for dengue control on the island of Martinique (Caribbean). *PLoS Negl Trop Dis*, *5*(6), e1202. doi: 10.1371/journal.pntd.0001202
- Massonnet-Bruneel, B., Corre-Catelin, N., Lacroix, R., Lees, R. S., Hoang, K. P., Nimmo, D., Alphey, L., & Reiter, P. (2013). Fitness of transgenic mosquito *Aedes aegypti* males

- carrying a dominant lethal genetic system. *PLoS One*, 8(5), e62711. doi: 10.1371/journal.pone.0062711
- Mathur, G., Sanchez-Vargas, I., Alvarez, D., Olson, K. E., Marinotti, O., & James, A. A. (2010). Transgene-mediated suppression of dengue viruses in the salivary glands of the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Mol Biol*, 19(6), 753-763. doi: 10.1111/j.1365-2583.2010.01032.x
- Matsumura, F. (2010). Studies on the action mechanism of benzoylurea insecticides to inhibit the process of chitin synthesis in insects: A review on the status of research activities in the past, the present and the future prospects. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 97(2), 133-139. doi: <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.10.001>
- Mattingly, P. F. (1967). Taxonomy of *Aedes aegypti* and related species. *Bull World Health Organ*, 36(4), 552-554.
- McFarlane, M., Arias-Goeta, C., Martin, E., O'Hara, Z., Lulla, A., Mousson, L., Rainey, S. M., Misbah, S., Schnettler, E., Donald, C. L., Merits, A., Kohl, A., & Failloux, A. B. (2014). Characterization of *Aedes aegypti* innate-immune pathways that limit Chikungunya virus replication. *PLoS Negl Trop Dis*, 8(7), e2994. doi: 10.1371/journal.pntd.0002994
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W., Sidhu, M., Wang, Y. F., & O'Neill, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science*, 323(5910), 141-144. doi: 10.1126/science.1165326
- Mellor, P. S. (2000). Replication of arboviruses in insect vectors. *J Comp Pathol*, 123(4), 231-247. doi: 10.1053/jcpa.2000.0434
- Messina, J. P., Brady, O. J., Scott, T. W., Zou, C., Pigott, D. M., Duda, K. A., Bhatt, S., Katzelnick, L., Howes, R. E., Battle, K. E., Simmons, C. P., & Hay, S. I. (2014). Global spread of dengue virus types: mapping the 70 year history. *Trends Microbiol*, 22(3), 138-146. doi: 10.1016/j.tim.2013.12.011
- Moon, S. L., Dodd, B. J., Brackney, D. E., Wilusz, C. J., Ebel, G. D., & Wilusz, J. (2015). Flavivirus sRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and

mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery. *Virology*, 485, 322-329.
doi: 10.1016/j.virol.2015.08.009

Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., Rocha, B. C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L. E., Johnson, K. N., Kay, B. H., McGraw, E. A., van den Hurk, A. F., Ryan, P. A., & O'Neill, S. L. (2009). A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268-1278. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.042

Moyes, C. L., Vontas, J., Martins, A. J., Ng, L. C., Koou, S. Y., Dusfour, I., Raghavendra, K., Pinto, J., Corbel, V., David, J. P., & Weetman, D. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl Trop Dis*, 11(7), e0005625. doi: 10.1371/journal.pntd.0005625

Mukhopadhyay, S., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*, 3(1), 13-22. doi: 10.1038/nrmicro1067

Murray, C. L., Jones, C. T., & Rice, C. M. (2008). Architects of assembly: roles of Flaviviridae non-structural proteins in virion morphogenesis. *Nat Rev Microbiol*, 6(9), 699-708. doi: 10.1038/nrmicro1928

Musso, D., Ko, A. I., & Baud, D. (2019). Zika Virus Infection - After the Pandemic. *N Engl J Med*, 381(15), 1444-1457. doi: 10.1056/NEJMra1808246

Musso, D., Nilles, E. J., & Cao-Lormeau, V. M. (2014). Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clin Microbiol Infect*, 20(10), 0595-596. doi: 10.1111/1469-0691.12707

Najioullah, F., Viron, F., Patrel, L., & Césaire, R. (2012). Diagnostic biologique de la dengue. *Virologie (Montrouge)*, 16(1), 18-31. doi: 10.1684/vir.2012.0433

Ng, W. C., Soto-Acosta, R., Bradrick, S. S., Garcia-Blanco, M. A., & Ooi, E. E. (2017). The 5' and 3' Untranslated Regions of the Flaviviral Genome. *Viruses*, 9(6). doi: 10.3390/v9060137

- Nguyen, N. M., Tran, C. N., Phung, L. K., Duong, K. T., Huynh Hle, A., Farrar, J., Nguyen, Q. T., Tran, H. T., Nguyen, C. V., Merson, L., Hoang, L. T., Hibberd, M. L., Aw, P. P., Wilm, A., Nagarajan, N., Nguyen, D. T., Pham, M. P., Nguyen, T. T., Javanbakht, H., Klumpp, K., Hammond, J., Petric, R., Wolbers, M., Nguyen, C. T., & Simmons, C. P. (2013). A randomized, double-blind placebo controlled trial of balapiravir, a polymerase inhibitor, in adult dengue patients. *J Infect Dis*, 207(9), 1442-1450. doi: 10.1093/infdis/jis470
- Nimmannitya, S., Halstead, S. B., Cohen, S. N., & Margiotta, M. R. (1969). Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. I. Observations on hospitalized patients with hemorrhagic fever. *Am J Trop Med Hyg*, 18(6), 954-971. doi: 10.4269/ajtmh.1969.18.954
- Nogareda, F., Joshua, C., Sio, A., Shortus, M., Dalipanda, T., Durski, K., Musto, J., Puiahi, E., Dofai, A., Aaskov, J., Cao-Lormeau, V. M., Musso, D., Dutta, N., Fleisch, J., & Nilles, E. (2013). Ongoing outbreak of dengue serotype-3 in Solomon Islands, January to May 2013. *Western Pac Surveill Response J*, 4(3), 28-33. doi: 10.5365/wpsar.2013.4.2.013
- O'Connor, O., Calvez, E., Inizan, C., Pocquet, N., Richard, V., & Dupont-Rouzeyrol, M. (2020). Vector competence of *Aedes aegypti* from New Caledonia for the four recent circulating dengue virus serotypes. *PLoS Negl Trop Dis*, 14(5), e0008303. doi: 10.1371/journal.pntd.0008303
- O'Neal, S. T., Samuel, G. H., Adelman, Z. N., & Myles, K. M. (2014). Mosquito-borne viruses and suppressors of invertebrate antiviral RNA silencing. *Viruses*, 6(11), 4314-4331. doi: 10.3390/v6114314
- OMS. (2013). Guide pour la prise en charge clinique de la dengue.
- Papa, A. (2019). Emerging arboviruses of medical importance in the Mediterranean region. *J Clin Virol*, 115, 5-10. doi: 10.1016/j.jcv.2019.03.007
- Paul, A., Harrington, L. C., & Scott, J. G. (2006). Evaluation of novel insecticides for control of dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol*, 43(1), 55-60. doi: 10.1603/0022-2585(2006)043[0055:eonifc]2.0.co;2

- Perera, R., & Kuhn, R. J. (2008). Structural proteomics of dengue virus. *Curr Opin Microbiol*, 11(4), 369-377. doi: 10.1016/j.mib.2008.06.004
- Perry, W. J. (1950). The mosquitoes and mosquito-borne diseases on New Caledonia, an historic account; 1885-1946. *Am J Trop Med Hyg*, 30(1), 103-114, illust. doi: 10.4269/ajtmh.1950.s1-30.103
- Petersen, E., Wilson, M. E., Touch, S., McCloskey, B., Mwaba, P., Bates, M., Dar, O., Mattes, F., Kidd, M., Ippolito, G., Azhar, E. I., & Zumla, A. (2016). Rapid Spread of Zika Virus in The Americas--Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. *Int J Infect Dis*, 44, 11-15. doi: 10.1016/j.ijid.2016.02.001
- Phuc, H. K., Andreasen, M. H., Burton, R. S., Vass, C., Epton, M. J., Pape, G., Fu, G., Condon, K. C., Scaife, S., Donnelly, C. A., Coleman, P. G., White-Cooper, H., & Alpey, L. (2007). Late-acting dominant lethal genetic systems and mosquito control. *BMC Biol*, 5, 11. doi: 10.1186/1741-7007-5-11
- Pocquet, N., Pol, M., Sarengat, V., Cattel, J., Faucon, F., Minier, M., Kilama, S., Lucien, K., David, J. P., & Guillaumot, L. (2018). *Fifteen year's monitoring and managing Aedes aegypti resistance to deltamethrin in Noumea, New Caledonia*. Paper presented at the Combating Resistance: microbes and vectors, 4th edition of the Institut Pasteur International Network Symposium, Paris, France.
- Poirier, E. Z., Goic, B., Tomé-Poderti, L., Frangeul, L., Boussier, J., Gausson, V., Blanc, H., Vallet, T., Loyd, H., Levi, L. I., Lanciano, S., Baron, C., Merklings, S. H., Lambrechts, L., Mirouze, M., Carpenter, S., Vignuzzi, M., & Saleh, M. C. (2018). Dicer-2-Dependent Generation of Viral DNA from Defective Genomes of RNA Viruses Modulates Antiviral Immunity in Insects. *Cell Host Microbe*, 23(3), 353-365 e358. doi: 10.1016/j.chom.2018.02.001
- Pol, M., Kilama, S., Duperier, S., Soupé-Gilbert, M. E., Calvez, E., & Pocquet, N. (2018). Introduction of the *Anopheles bancroftii* Mosquito, a Malaria Vector, into New Caledonia. *Emerg Infect Dis*, 24(3), 604-605. doi: 10.3201/eid2403.171689

- Pompon, J., Manuel, M., Ng, G. K., Wong, B., Shan, C., Manokaran, G., Soto-Acosta, R., Bradrick, S. S., Ooi, E. E., Missé, D., Shi, P. Y., & Garcia-Blanco, M. A. (2017a). Dengue subgenomic flaviviral RNA disrupts immunity in mosquito salivary glands to increase virus transmission. *PLoS Pathog*, *13*(7), e1006535. doi: 10.1371/journal.ppat.1006535
- Pompon, J., Morales-Vargas, R., Manuel, M., Huat Tan, C., Vial, T., Hao Tan, J., Sessions, O. M., Vasconcelos, P. D. C., Ng, L. C., & Missé, D. (2017b). A Zika virus from America is more efficiently transmitted than an Asian virus by *Aedes aegypti* mosquitoes from Asia. *Sci Rep*, *7*(1), 1215. doi: 10.1038/s41598-017-01282-6
- Rakotonirina, A., Pol, M., Kainiu, M., Barsac, E., Tutagata, J., Kilama, S., O'Connor, O., Tarantola, A., Colot, J., Dupont-Rouzeyrol, M., Richard, V., & Pocquet, N. (2020). MALDI-TOF MS: optimization for future uses in entomological surveillance and identification of mosquitoes from New Caledonia. *Parasit Vectors*, *13*(1), 359. doi: 10.1186/s13071-020-04234-8
- Ramirez, J. L., & Dimopoulos, G. (2010). The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes. *Dev Comp Immunol*, *34*(6), 625-629. doi: 10.1016/j.dci.2010.01.006
- Raquin, V., & Lambrechts, L. (2017). Dengue virus replicates and accumulates in *Aedes aegypti* salivary glands. *Virology*, *507*, 75-81. doi: 10.1016/j.virol.2017.04.009
- Rasgon, J. L., Styer, L. M., & Scott, T. W. (2003). Wolbachia-induced mortality as a mechanism to modulate pathogen transmission by vector arthropods. *J Med Entomol*, *40*(2), 125-132. doi: 10.1603/0022-2585-40.2.125
- Rezende, G. L., Martins, A. J., Gentile, C., Farnesi, L. C., Pelajo-Machado, M., Peixoto, A. A., & Valle, D. (2008). Embryonic desiccation resistance in *Aedes aegypti*: presumptive role of the chitinized serosal cuticle. *BMC Dev Biol*, *8*, 82. doi: 10.1186/1471-213x-8-82
- Rico-Hesse, R. (1990). Molecular evolution and distribution of dengue viruses type 1 and 2 in nature. *Virology*, *174*(2), 479-493. doi: 10.1016/0042-6822(90)90102-w

- Rico-Hesse, R. (2003). Microevolution and virulence of dengue viruses. *Adv Virus Res*, 59, 315-341. doi: 10.1016/s0065-3527(03)59009-1
- Ritchie, S. A., Pyke, A. T., Hall-Mendelin, S., Day, A., Mores, C. N., Christofferson, R. C., Gubler, D. J., Bennett, S. N., & van den Hurk, A. F. (2013). An explosive epidemic of DENV-3 in Cairns, Australia. *PLoS One*, 8(7), e68137. doi: 10.1371/journal.pone.0068137
- Rosen, L. (1967). A recent outbreak of dengue in French Polynesia. *Jpn J Med Sci Biol*, 20 Suppl, 67-69.
- Ross, P. A., & Hoffmann, A. A. (2018). Continued Susceptibility of the wMel Wolbachia Infection in *Aedes aegypti* to Heat Stress Following Field Deployment and Selection. *Insects*, 9(3). doi: 10.3390/insects9030078
- Ross, P. A., Ritchie, S. A., Axford, J. K., & Hoffmann, A. A. (2019). Loss of cytoplasmic incompatibility in Wolbachia-infected *Aedes aegypti* under field conditions. *PLoS Negl Trop Dis*, 13(4), e0007357. doi: 10.1371/journal.pntd.0007357
- Ross, P. A., Wiwatanaratnabutr, I., Axford, J. K., White, V. L., Endersby-Harshman, N. M., & Hoffmann, A. A. (2017). Wolbachia Infections in *Aedes aegypti* Differ Markedly in Their Response to Cyclical Heat Stress. *PLoS Pathog*, 13(1), e1006006. doi: 10.1371/journal.ppat.1006006
- Roth, A., Mercier, A., Lepers, C., Hoy, D., Duituturaga, S., Benyon, E., Guillaumot, L., & Souares, Y. (2014). Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveill*, 19(41). doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.41.20929
- Roy, A. (2014). *Coût d'une épidémie de dengue en Nouvelle-Calédonie*. Direction des Affaires Sanitaires et Sociales Retrieved from https://dass.gouv.nc/sites/default/files/atoms/files/epidemie_de_dengue_2012-2013.pdf.

- Rozen-Gagnon, K., Stapleford, K. A., Mongelli, V., Blanc, H., Failloux, A. B., Saleh, M. C., & Vignuzzi, M. (2014). Alphavirus mutator variants present host-specific defects and attenuation in mammalian and insect models. *PLoS Pathog*, *10*(1), e1003877. doi: 10.1371/journal.ppat.1003877
- Ryan, P. A., Turley, A. P., Wilson, G., Hurst, T. P., Retzki, K., Brown-Kenyon, J., Hodgson, L., Kenny, N., Cook, H., Montgomery, B. L., Paton, C. J., Ritchie, S. A., Hoffmann, A. A., Jewell, N. P., Tanamas, S. K., Anders, K. L., Simmons, C. P., & O'Neill, S. L. (2019). Establishment of wMel Wolbachia in *Aedes aegypti* mosquitoes and reduction of local dengue transmission in Cairns and surrounding locations in northern Queensland, Australia. *Gates Open Res*, *3*, 1547. doi: 10.12688/gatesopenres.13061.2
- Salas-Benito, J. S., & De Nova-Ocampo, M. (2015). Viral Interference and Persistence in Mosquito-Borne Flaviviruses. *J Immunol Res*, *2015*, 873404. doi: 10.1155/2015/873404
- Samuel, G. H., Adelman, Z. N., & Myles, K. M. (2018). Antiviral Immunity and Virus-Mediated Antagonism in Disease Vector Mosquitoes. *Trends Microbiol*, *26*(5), 447-461. doi: 10.1016/j.tim.2017.12.005
- Sánchez-Vargas, I., Scott, J. C., Poole-Smith, B. K., Franz, A. W., Barbosa-Solomieu, V., Wilusz, J., Olson, K. E., & Blair, C. D. (2009). Dengue virus type 2 infections of *Aedes aegypti* are modulated by the mosquito's RNA interference pathway. *PLoS Pathog*, *5*(2), e1000299. doi: 10.1371/journal.ppat.1000299
- Sanjuán, R., Nebot, M. R., Chirico, N., Mansky, L. M., & Belshaw, R. (2010). Viral mutation rates. *J Virol*, *84*(19), 9733-9748. doi: 10.1128/jvi.00694-10
- Scholle, F., Girard, Y. A., Zhao, Q., Higgs, S., & Mason, P. W. (2004). trans-Packaged West Nile virus-like particles: infectious properties in vitro and in infected mosquito vectors. *J Virol*, *78*(21), 11605-11614. doi: 10.1128/jvi.78.21.11605-11614.2004
- Schultz, M. J., Tan, A. L., Gray, C. N., Isern, S., Michael, S. F., Frydman, H. M., & Connor, J. H. (2018). Wolbachia wStri Blocks Zika Virus Growth at Two Independent Stages of Viral Replication. *mBio*, *9*(3). doi: 10.1128/mBio.00738-18

- Seng, C. M., Seta, T., Nealon, J., Socheat, D., Chantha, N., & Nathan, M. B. (2008). Community-based use of the larvivorous fish *Poecilia reticulata* to control the dengue vector *Aedes aegypti* in domestic water storage containers in rural Cambodia. *J Vector Ecol*, 33(1), 139-144. doi: 10.3376/1081-1710(2008)33[139:cuotlf]2.0.co;2
- Shepard, D. S., Undurraga, E. A., & Halasa, Y. A. (2013). Economic and disease burden of dengue in Southeast Asia. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(2), e2055. doi: 10.1371/journal.pntd.0002055
- Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., & Stanaway, J. D. (2016). The global economic burden of dengue: a systematic analysis. *Lancet Infect Dis*, 16(8), 935-941. doi: 10.1016/s1473-3099(16)00146-8
- Sim, S., Aw, P. P., Wilm, A., Teoh, G., Hue, K. D., Nguyen, N. M., Nagarajan, N., Simmons, C. P., & Hibberd, M. L. (2015). Tracking Dengue Virus Intra-host Genetic Diversity during Human-to-Mosquito Transmission. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(9), e0004052. doi: 10.1371/journal.pntd.0004052
- Sim, S., Jupatanakul, N., Ramirez, J. L., Kang, S., Romero-Vivas, C. M., Mohammed, H., & Dimopoulos, G. (2013). Transcriptomic profiling of diverse *Aedes aegypti* strains reveals increased basal-level immune activation in dengue virus-refractory populations and identifies novel virus-vector molecular interactions. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(7), e2295. doi: 10.1371/journal.pntd.0002295
- Simmonds, P., Becher, P., Bukh, J., Gould, E. A., Meyers, G., Monath, T., Muerhoff, S., Pletnev, A., Rico-Hesse, R., Smith, D. B., Stapleton, J. T., & Ictv Report, C. (2017). ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. *J Gen Virol*, 98(1), 2-3. doi: 10.1099/jgv.0.000672
- Singh, N., Kiedrzyński, T., Lepers, C., & Benyon, E. K. (2005). Dengue in the Pacific--an update of the current situation. *Pac Health Dialog*, 12(2), 111-119.
- Smith, D. R., Adams, A. P., Kenney, J. L., Wang, E., & Weaver, S. C. (2008). Venezuelan equine encephalitis virus in the mosquito vector *Aedes taeniorhynchus*: infection initiated by

a small number of susceptible epithelial cells and a population bottleneck. *Virology*, 372(1), 176-186. doi: 10.1016/j.virol.2007.10.011

Souza-Neto, J. A., Sim, S., & Dimopoulos, G. (2009). An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(42), 17841-17846. doi: 10.1073/pnas.0905006106

Sridhar, S., Luedtke, A., Langevin, E., Zhu, M., Bonaparte, M., Machabert, T., Savarino, S., Zambrano, B., Moureau, A., Khromava, A., Moodie, Z., Westling, T., Mascareñas, C., Frago, C., Cortés, M., Chansinghakul, D., Noriega, F., Bouckenoghe, A., Chen, J., Ng, S. P., Gilbert, P. B., Gurunathan, S., & DiazGranados, C. A. (2018). Effect of Dengue Serostatus on Dengue Vaccine Safety and Efficacy. *N Engl J Med*, 379(4), 327-340. doi: 10.1056/NEJMoa1800820

Stanaway, J. D., Shepard, D. S., Undurraga, E. A., Halasa, Y. A., Coffeng, L. E., Brady, O. J., Hay, S. I., Bedi, N., Bensenor, I. M., Castañeda-Orjuela, C. A., Chuang, T. W., Gibney, K. B., Memish, Z. A., Rafay, A., Ukwaja, K. N., Yonemoto, N., & Murray, C. J. L. (2016). The global burden of dengue: an analysis from the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet Infect Dis*, 16(6), 712-723. doi: 10.1016/s1473-3099(16)00026-8

Stapleford, K. A., Coffey, L. L., Lay, S., Bordería, A. V., Duong, V., Isakov, O., Rozen-Gagnon, K., Arias-Goeta, C., Blanc, H., Beaucourt, S., Haliloğlu, T., Schmitt, C., Bonne, I., Ben-Tal, N., Shomron, N., Failloux, A. B., Buchy, P., & Vignuzzi, M. (2014). Emergence and transmission of arbovirus evolutionary intermediates with epidemic potential. *Cell Host Microbe*, 15(6), 706-716. doi: 10.1016/j.chom.2014.05.008

Steinwascher, K. (2018). Competition among *Aedes aegypti* larvae. *PLoS One*, 13(11), e0202455. doi: 10.1371/journal.pone.0202455

Syenina, A., Vijaykrishna, D., Gan, E. S., Tan, H. C., Choy, M. M., Siriphanitchakorn, T., Cheng, C., Vasudevan, S. G., & Ooi, E. E. (2020). Positive epistasis between viral polymerase and the 3' untranslated region of its genome reveals the epidemiologic fitness of dengue virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 117(20), 11038-11047. doi: 10.1073/pnas.1919287117

- Tam, D. T., Ngoc, T. V., Tien, N. T., Kieu, N. T., Thuy, T. T., Thanh, L. T., Tam, C. T., Truong, N. T., Dung, N. T., Qui, P. T., Hien, T. T., Farrar, J. J., Simmons, C. P., Wolbers, M., & Wills, B. A. (2012). Effects of short-course oral corticosteroid therapy in early dengue infection in Vietnamese patients: a randomized, placebo-controlled trial. *Clin Infect Dis*, 55(9), 1216-1224. doi: 10.1093/cid/cis655
- Tassniyom, S., Vasanawathana, S., Dhiensiri, T., Nisalak, A., & Chirawatkul, A. (1997). Failure of carbazochrome sodium sulfonate (AC-17) to prevent dengue vascular permeability or shock: a randomized, controlled trial. *J Pediatr*, 131(4), 525-528. doi: 10.1016/s0022-3476(97)70055-6
- Tay, M. Y. F., & Vasudevan, S. G. (2018). The Transactions of NS3 and NS5 in Flaviviral RNA Replication. *Adv Exp Med Biol*, 1062, 147-163. doi: 10.1007/978-981-10-8727-1_11
- Terradas, G., & McGraw, E. A. (2017). Wolbachia-mediated virus blocking in the mosquito vector *Aedes aegypti*. *Curr Opin Insect Sci*, 22, 37-44. doi: 10.1016/j.cois.2017.05.005
- Thavara, U., Tawatsin, A., Chansang, C., Asavadachanukorn, P., Zaim, M., & Mulla, M. S. (2007). Simulated field evaluation of the efficacy of two formulations of diflubenzuron, a chitin synthesis inhibitor against larvae of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae) in water-storage containers. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 38(2), 269-275.
- Tricou, V., Minh, N. N., Van, T. P., Lee, S. J., Farrar, J., Wills, B., Tran, H. T., & Simmons, C. P. (2010). A randomized controlled trial of chloroquine for the treatment of dengue in Vietnamese adults. *PLoS Negl Trop Dis*, 4(8), e785. doi: 10.1371/journal.pntd.0000785
- Tun-Lin, W., Burkot, T. R., & Kay, B. H. (2000). Effects of temperature and larval diet on development rates and survival of the dengue vector *Aedes aegypti* in north Queensland, Australia. *Med Vet Entomol*, 14(1), 31-37. doi: 10.1046/j.1365-2915.2000.00207.x
- Twiddy, S. S., Farrar, J. J., Vinh Chau, N., Wills, B., Gould, E. A., Gritsun, T., Lloyd, G., & Holmes, E. C. (2002). Phylogenetic relationships and differential selection pressures

- among genotypes of dengue-2 virus. *Virology*, 298(1), 63-72. doi: 10.1006/viro.2002.1447
- Ubol, S., Phuklia, W., Kalayanarooj, S., & Modhiran, N. (2010). Mechanisms of immune evasion induced by a complex of dengue virus and preexisting enhancing antibodies. *J Infect Dis*, 201(6), 923-935. doi: 10.1086/651018
- Ulrich, J. N., Beier, J. C., Devine, G. J., & Hugo, L. E. (2016). Heat Sensitivity of wMel Wolbachia during *Aedes aegypti* Development. *PLoS Negl Trop Dis*, 10(7), e0004873. doi: 10.1371/journal.pntd.0004873
- Vargas, H. C., Farnesi, L. C., Martins, A. J., Valle, D., & Rezende, G. L. (2014). Serosal cuticle formation and distinct degrees of desiccation resistance in embryos of the mosquito vectors *Aedes aegypti*, *Anopheles aquasalis* and *Culex quinquefasciatus*. *J Insect Physiol*, 62, 54-60. doi: 10.1016/j.jinsphys.2014.02.001
- Vasilakis, N., & Weaver, S. C. (2008). The history and evolution of human dengue emergence. *Adv Virus Res*, 72, 1-76. doi: 10.1016/s0065-3527(08)00401-6
- Vazeille, M., Gaborit, P., Mousson, L., Girod, R., & Failloux, A. B. (2016). Competitive advantage of a dengue 4 virus when co-infecting the mosquito *Aedes aegypti* with a dengue 1 virus. *BMC Infect Dis*, 16, 318. doi: 10.1186/s12879-016-1666-0
- Villar, L., Dayan, G. H., Arredondo-García, J. L., Rivera, D. M., Cunha, R., Deseda, C., Reynales, H., Costa, M. S., Morales-Ramírez, J. O., Carrasquilla, G., Rey, L. C., Dietze, R., Luz, K., Rivas, E., Miranda Montoya, M. C., Cortés Supelano, M., Zambrano, B., Langevin, E., Boaz, M., Tornieporth, N., Saviile, M., & Noriega, F. (2015). Efficacy of a tetravalent dengue vaccine in children in Latin America. *N Engl J Med*, 372(2), 113-123. doi: 10.1056/NEJMoa1411037
- Walker, T., Johnson, P. H., Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Frentiu, F. D., McMeniman, C. J., Leong, Y. S., Dong, Y., Axford, J., Kriesner, P., Lloyd, A. L., Ritchie, S. A., O'Neill, S. L., & Hoffmann, A. A. (2011). The wMel Wolbachia strain blocks dengue and invades caged *Aedes aegypti* populations. *Nature*, 476(7361), 450-453. doi: 10.1038/nature10355

- Wargo, A. R., & Kurath, G. (2012). Viral fitness: definitions, measurement, and current insights. *Curr Opin Virol*, 2(5), 538-545. doi: 10.1016/j.coviro.2012.07.007
- Watson, T. M., & Kay, B. H. (1999). Vector competence of *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) for Barmah Forest virus and of this species and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) for dengue 1-4 viruses in Queensland, Australia. *J Med Entomol*, 36(4), 508-514. doi: 10.1093/jmedent/36.4.508
- Weaver, S. C. (2006). Evolutionary influences in arboviral disease. *Curr Top Microbiol Immunol*, 299, 285-314. doi: 10.1007/3-540-26397-7_10
- Weaver, S. C., & Forrester, N. L. (2015). Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Res*, 120, 32-39. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.04.016
- Weaver, S. C., Forrester, N. L., Liu, J., & Vasilakis, N. (2021). Population bottlenecks and founder effects: implications for mosquito-borne arboviral emergence. *Nat Rev Microbiol*, 1-12. doi: 10.1038/s41579-020-00482-8
- Welsch, S., Miller, S., Romero-Brey, I., Merz, A., Bleck, C. K., Walther, P., Fuller, S. D., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2009). Composition and three-dimensional architecture of the dengue virus replication and assembly sites. *Cell Host Microbe*, 5(4), 365-375. doi: 10.1016/j.chom.2009.03.007
- White, P. M., Serbus, L. R., Debec, A., Codina, A., Bray, W., Guichet, A., Lokey, R. S., & Sullivan, W. (2017). Reliance of *Wolbachia* on High Rates of Host Proteolysis Revealed by a Genome-Wide RNAi Screen of *Drosophila* Cells. *Genetics*, 205(4), 1473-1488. doi: 10.1534/genetics.116.198903
- Whitehorn, J., Nguyen, C. V. V., Khanh, L. P., Kien, D. T. H., Quyen, N. T. H., Tran, N. T. T., Hang, N. T., Truong, N. T., Hue Tai, L. T., Cam Huong, N. T., Nhon, V. T., Van Tram, T., Farrar, J., Wolbers, M., Simmons, C. P., & Wills, B. (2016). Lovastatin for the Treatment of Adult Patients With Dengue: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Trial. *Clin Infect Dis*, 62(4), 468-476. doi: 10.1093/cid/civ949

- WHO. (2019). Dengue vaccine: WHO position paper, September 2018 - Recommendations. *Vaccine*, 37(35), 4848-4849. doi: 10.1016/j.vaccine.2018.09.063
- WHO. (2020). Dengue and severe dengue, from <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- Wilder-Smith, A., Hombach, J., Ferguson, N., Selgelid, M., O'Brien, K., Vannice, K., Barrett, A., Ferdinand, E., Flasche, S., Guzman, M., Novaes, H. M., Ng, L. C., Smith, P. G., Tharmaphornpilas, P., Yoon, I. K., Cravioto, A., Farrar, J., & Nolan, T. M. (2019). Deliberations of the Strategic Advisory Group of Experts on Immunization on the use of CYD-TDV dengue vaccine. *Lancet Infect Dis*, 19(1), e31-e38. doi: 10.1016/s1473-3099(18)30494-8
- Wilke, A. B., & Marrelli, M. T. (2012). Genetic control of mosquitoes: population suppression strategies. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 54(5), 287-292. doi: 10.1590/s0036-46652012000500009
- Yaicharoen, R., Kiatfuengfoo, R., Chareonviriyaphap, T., & Rongnoparut, P. (2005). Characterization of deltamethrin resistance in field populations of *Aedes aegypti* in Thailand. *J Vector Ecol*, 30(1), 144-150.
- Ye, Y. H., Carrasco, A. M., Frentiu, F. D., Chenoweth, S. F., Beebe, N. W., van den Hurk, A. F., Simmons, C. P., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2015). Wolbachia Reduces the Transmission Potential of Dengue-Infected *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 9(6), e0003894. doi: 10.1371/journal.pntd.0003894
- Ye, Y. H., Woolfit, M., Rancès, E., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2013). Wolbachia-associated bacterial protection in the mosquito *Aedes aegypti*. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(8), e2362. doi: 10.1371/journal.pntd.0002362
- Yu, I. M., Zhang, W., Holdaway, H. A., Li, L., Kostyuchenko, V. A., Chipman, P. R., Kuhn, R. J., Rossmann, M. G., & Chen, J. (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science*, 319(5871), 1834-1837. doi: 10.1126/science.1153264

- Zhang, W., Chipman, P. R., Corver, J., Johnson, P. R., Zhang, Y., Mukhopadhyay, S., Baker, T. S., Strauss, J. H., Rossmann, M. G., & Kuhn, R. J. (2003a). Visualization of membrane protein domains by cryo-electron microscopy of dengue virus. *Nat Struct Biol*, *10*(11), 907-912. doi: 10.1038/nsb990
- Zhang, Y., Corver, J., Chipman, P. R., Zhang, W., Pletnev, S. V., Sedlak, D., Baker, T. S., Strauss, J. H., Kuhn, R. J., & Rossmann, M. G. (2003b). Structures of immature flavivirus particles. *EMBO J*, *22*(11), 2604-2613. doi: 10.1093/emboj/cdg270
- Zompi, S., Montoya, M., Pohl, M. O., Balmaseda, A., & Harris, E. (2012). Dominant cross-reactive B cell response during secondary acute dengue virus infection in humans. *PLoS Negl Trop Dis*, *6*(3), e1568. doi: 10.1371/journal.pntd.0001568