Écologie du microbiote bactérien associé au moustique tigre Aedes albopictus : une approche "omique" pour l'exploration de l'holobionte vecteur

Guillaume Minard

▶ **To cite this version:**

Guillaume Minard. Écologie du microbiote bactérien associé au moustique tigre Aedes albopictus : une approche "omique" pour l'exploration de l'holobionte vecteur. Ecologie, Environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10299 . tel-01165201

HAL Id: tel-01165201
https://theses.hal.science/tel-01165201

Submitted on 18 Jun 2015

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.

N° d'ordre 299-2014

Thèse de l'Université de Lyon

Délivrée par l'Université Claude Bernard Lyon 1

Ecole Doctorale : Evolution, Ecosystèmes, Microbiologie et Modélisation

Laboratoire d'Ecologie Microbienne

Pour l'obtention du

Diplôme de DOCTORAT en Biologie

Spécialité « Microorganismes, interactions, infections »

(Arrêté du 7 Août 2006)

Ecologie du microbiote bactérien associé au moustique tigre *Aedes albopictus* : une approche « omique » pour l'exploration de l'holobionte vecteur.

Présentée publiquement le 15 décembre 2014 par

Guillaume MINARD

Directeur de thèse : Madame Claire VALIENTE MORO

Co-directeur de thèse : Monsieur Patrick MAVINGUI

Devant le Jury composé de :

Monsieur Denis Le Paslier (Directeur de recherche, CNRS, Evry)	*Rapporteur*
Monsieur Pablo Tortosa (Maître de conférences, Université La Réunion)	*Rapporteur*
Monsieur Frédéric Simard (Directeur de recherche, IRD, Montpellier)	*Examinateur*
Monsieur Jean-Christophe Simon (Directeur de recherche, INRA, Rennes)	*Examinateur*
Madame Cristina Vieira-Heddi (Professeur des Universités, UCBL, Lyon)	*Examinateur*
Madame Claire Valiente Moro (Maître de conférences, UCBL, Lyon)	*Directeur de thèse*
Monsieur Patrick Mavingui (Directeur de recherche, CNRS, Lyon)	*Co-directeur de thèse*

Thèse mise en place et soutenue par la Région Rhône-Alpes

Remerciements

Maintenant que je dois faire le bilan de ces trois ans de thèse, je me rends compte que tout ceci aurait été tellement différent sans toutes les personnes qui auront partagé avec moi une partie, l'ensemble ou bien plus que ces quelques années…

Tout d'abord je remercie les membres du jury qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps pour lire, écouter et évaluer ce travail. Merci donc à madame Cristina Vieira-Heddi qui a accepté de présider le jury. Merci également aux rapporteurs de cette thèse messieurs Denis Le Paslier et Pablo Tortosa. Je remercie enfin les examinateurs madame Claire Valiente Moro, messieurs Patrick Mavingui, Frederic Simard et Jean Christophe Simon.

Je remercie également mon tuteur monsieur Fabrice Vavre, ainsi que l'ensemble des membres de mon comité de pilotage dont madame Karine Hubert messieurs Didier Bouchon et Guy Perrière.

Merci également à la région Rhône-Alpes à travers l'ARC1-Santé qui a sélectionné et soutenu financièrement mon projet de thèse.

Bien entendu une grande partie de mes remerciements vont vers Claire, qui a expérimenté avec moi les joies de l'encadrement, parfois même au péril de sa vie (l'attaque de cafards à Ho Chi Minh en est un exemple frappant). Ses conseils avisés et son soutien même dans les moments de doutes m'ont été d'une aide précieuse. C'est grâce à Claire que j'ai découvert le monde de la recherche et comment m'imaginer ailleurs que dans un laboratoire maintenant ?

Je remercie en particulier Patrick, qui m'aura appris la persévérance et la rigueur scientifique. J'ai bénéficié de toute son expérience et de sa confiance pour mener à bien des projets dont je me sentais encore incapable il y a 3 ans de cela. Merci donc pour tous ces enseignements que je conserverai bien après ma thèse.

Merci à tous les collaborateurs qui nous ont aidé, conseillé et guidé à travers mes différents sites d'échantillonnages en France, au Vietnam et sur l'île de Madagascar : l'Entente Interdépartementale Rhône-Alpes pour la démoustication et plus particulièrement monsieur Christophe Bellet ; l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication du pourtour méditerranéen et en particulier monsieur Gregory Lambert ; l'Institut Pasteur d'Ho Chi Minh Ville et plus particulièrement madame Trang H.K. Huynh et monsieur Ly Khan ; le Centre National de Recherche sur l'Environnement de Madagascar et madame Fara Nantenaina Raharimalala ainsi que monsieur Pierre Ravelonandro.

Je remercie toute la plateforme IBIO dont j'ai fait fumer les serveurs, et particulièrement Audrey qui s'est toujours montrée extrêmement disponible et patiente. Merci également à tous les membres qui participent au bon fonctionnement et à l'efficacité de cette plateforme notamment Daniel, Danis et Thomas.

Merci à Clément G. le roi de la génétique des pops qui a été de très bon conseil dans des analyses qui relevaient au départ du chinois pour moi. Mes Albos sont entre de bonnes mains. Merci également à Eléonore Hellard et Bernard Kaufmann qui m'ont fait partager leurs expertises respectives dans la modélisation et la génétique des populations.

Je remercie également mes collègues de bureau et bien entendu Florence qui a été ma sœur de labo pendant plus de 3 ans et qui nous prépare un beau petit cadeau pour noël. Tes expressions nous rapporteront de l'or un jour. Yoann qui nous rappel que derrière la petite lumière rouge d'une salle culture cellulaire ou derrière le hublot d'un P3, se cache un fan de Pokémon. Mon ex-colocataire de bureau Vincent parti chasser les moustiques de Pasteur.

Je remercie également mes collègues qui ont un jour partagé ce lieu de culte dont MiniGuillaume, mon padawan de choc. MP Confort notre invitée de Gerland toujours dynamique, motivée et motivante. Miniclaire dont le rire a réussi à percer le son de ma voix (et pourtant). Ghada une nouvelle maman discrète et souriante. François qui s'est découvert une passion pour la culture et le repiquage des moustiques. Alessia dont les Tiramitsu ont fait vibrer l'étage, Elodie la proteogirl, mais également Marie, Erika et Fara…

Je remercie Van, la mémoire du laboratoire qui nous fait partager sa gastronomie exotique toujours avec le sourire. Je remercie les autres membres de l'équipe : Patrick Pottier qui a toujours la répartie pour détendre l'atmosphère, Catherine Legras qui profites maintenant de la notoriété de ProfileXpert-ViroScan3D pour développer les

projets de l'équipe. Je remercie également nos collègues de Gerland : Dimitri et Margot devenue une experte dans la recherche des larves.

Je remercie ensuite toute la team 2 du Lwoff et plus particulièrement dans le désordre : Saint Florian l'amoureux du saucisson et des os brisés ; Choco, coureur marathonien le lundi et gymnaste cueilleur le reste de la semaine ; Marie la révolutionnaire passionnée, partie cultiver les champignons bien loin de la recherche ; Jane Golden notre horloge électronique de la pause repas ; Patricia ma première concurrente dans la catégorie « décoiffage vocale » ; Lawrence Smallvalley, quelqu'un qui regarde « l'attaque du requin à deux têtes » sur NRJ12 ne peut pas avoir mauvais fond ; Aurélie pour les longues discussions d'après 20h ; Merci à Claudia (coach en bioinformatiques et préparation de pizza) ; Merci également à Roland, Gilles, Laurence, Guillaume 2, et les autres...

Je remercie l'équipe de choc des étudiants sans qui toutes ces années aurait été bien plus monotones et plus particulièrement les actuels dont Magalie, Benjamin, Seb, Jordan, Marie, Julien, Manon, Stéphanie, Clement, Amine... les nouveaux : Elodie, Isaline, Quentin, Thibaut, Guillaume... les anciens : Malek, Florent, Benjamin Y, Benoit, Arnaud, Juliana...

Merci aux permanents du Mendel et notamment David, Daniel, Ludo, Florence et tous les autres...

Un grand merci à Maxime, Un inconditionnel du Whisky, de la phylogénie et maintenant converti aux huitres et au bignou. J'espère que les vents bretons n'auront pas raison de ta témérité. A Cyrus notre ami américain fan de Hockey et de chansons québécoises qui aura eu bien du mal à rejoindre son labo. A Denis qui m'a accueilli sous le soleil niçois avant de migrer dans le pays des meubles IKEA.

Un énorme merci à tous mes amis avec qui j'ai partagé bien plus que ces années : Mathieu et Marion, Rémy et Agathe, Thibaud, Myrtille, Kévin, Anne-Marie, Laurianne, Marjo, Diane, Gary, Edouard, Seb...

Je remercie également toute ma famille et ma belle-famille que je n'ai pas pu voir autant que j'aurais voulu durant ces 3 ans, mais je compte bien me rattraper ! Merci à mes parents pour leur soutien, mais également à mes beaux-parents, à mon frère parti chasser le kangourou, à mes belles sœurs et mon beau-frère.

Enfin un très grand merci à Marion, qui m'a soutenu, écouté, supporté et assisté depuis le début. J'ai beaucoup de chance d'avoir une Quokka'me sœur comme toi et tu le sais.

Enfin je présente toutes mes excuses à ceux que j'aurais oubliés...

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université	**M. François-Noël GILLY**
Vice-président du Conseil d'Administration	M. le Professeur Hamda BEN HADID
Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire	M. le Professeur Philippe LALLE
Vice-président du Conseil Scientifique	M. le Professeur Germain GILLET
Directeur Général des Services	M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard	Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE
Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux	Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON
Faculté d'Odontologie	Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS
Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques	Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA
Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation	Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON
Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine	Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies	Directeur : M. F. DE MARCHI
Département Biologie	Directeur : M. le Professeur F. FLEURY
Département Chimie Biochimie	Directeur : Mme Caroline FELIX
Département GEP	Directeur : M. Hassan HAMMOURI
Département Informatique	Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE
Département Mathématiques	Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique	Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID
Département Physique	Directeur : M. Jean-Claude PLENET
UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives	Directeur : M. Y.VANPOULLE
Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon	Directeur : M. B. GUIDERDONI
Polytech Lyon	Directeur : M. P. FOURNIER
Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique	Directeur : M. G. PIGNAULT
Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1	Directeur : M. le Professeur C. VITON
Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education	Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE
Institut de Science Financière et d'Assurances	Directeur : M. N. LEBOISNE

RESUME

Face à la recrudescence de maladies à transmission vectorielle dans le monde, la compréhension de l'écologie des insectes vecteurs est devenue un enjeu majeur de santé publique. Le cas du moustique (Diptera : Culicidae) *Aedes albopictus*, plus communément appelé « moustique tigre » suscite des préoccupations grandissantes. En effet, sa capacité à transmettre de nombreux arbovirus et parasites eucaryotes associée à son fort pouvoir invasif accentuent les risques épidémiques dans des régions du globe jusque-là épargnées. Originaire d'Asie du Sud et de l'Est, *Ae. albopictus* est aujourd'hui implanté sur 5 des 6 continents et les moyens de lutte mis en place pour l'éliminer peinent à freiner son expansion. Ces dernières années, l'étude des communautés microbiennes associées aux insectes a permis de démontrer leur implication dans des fonctions clefs de la biologie de leurs hôtes (nutrition, immunité, résistance aux stress biotiques et abiotiques …). Ensemble, ils constituent un super-organisme appelé holobionte. Ainsi, une meilleure connaissance de l'écologie microbienne d'*Ae. albopictus* pourrait nous apporter de nouvelles perspectives dans la compréhension du fonctionnement du pathosystème vectoriel. C'est dans ce contexte que s'est inscrit mon projet de thèse qui a consisté à décrire le microbiote bactérien du moustique tigre en lien avec son écologie et la génétique de ses populations. Nos travaux se sont tout d'abord portés sur des exemples précis d'interactions avec des symbiotes d'intérêts puis nous avons élargi cette étude à l'ensemble des communautés bactériennes et leurs facteurs de variation, en bénéficiant du développement des nouvelles technologies de séquençage. Le microbiote bactérien de moustiques entiers a été majoritairement dominé par la bactérie endosymbiotique *Wolbachia.* A l'inverse, une étude ciblée sur le tube digestif a mis en évidence un microbiote local plus diversifié. A une échelle populationnelle, l'un de nos résultats majeurs a été la mise en évidence d'une réduction de la diversité bactérienne dans l'intestin, associée à une réduction de la diversité génétique chez les populations invasives de France, comparées aux populations autochtones du Vietnam. Ces travaux ont également révélé la forte prévalence de deux symbiotes cultivables : *Dysgonomonas* et *Acinetobacter*. Enfin, nous avons mis en évidence une similitude dans la composition du microbiote bactérien intestinal chez une espèce génétiquement proche du moustique tigre, dépourvue de *Wolbachia*. En conclusion, ces résultats ouvrent la voie vers de nouvelles hypothèses sur le fonctionnement et la dynamique de l'holobionte moustique avec la prise en compte des interactions symbiotiques comme un élément majeur du pathosystème vectoriel.

TABLE DES MATIERES

Introduction 10

Synthèse Bibliographique 13
1. Le moustique tigre : *Aedes albopictus* 14
1.1. Introduction 14
1.2. Biologie, anatomie et écologie du moustique tigre 14
1.2.1. L'œuf 16
1.2.2. Le stade larvaire 17
1.2.3. Le stade nymphal (pupe) 20
1.2.4. Le stade adulte (imago) 21
1.3. Une espèce invasive 24
1.3.1. Les premières invasions (1050-1980) 24
1.3.2. L'intensification (1981-1990) 25
1.3.3. L'état actuel (1991-Aujourd'hui) 25
1.4. Un vecteur préoccupant 27
1.4.1. Pathogènes transmis 27
1.4.2. Lutte anti-vectorielle 30
1.4.2.1. Insecticides 30
1.4.2.2. Lutte biologique 31
1.4.2.3. Lutte génétique 31
1.4.2.4. La gestion environnementale 32
2. La symbiose chez les insectes : conséquences écologiques et évolutives 33
2.1. Introduction 33
2.2. Interactions symbiotiques bactéries-insectes 35
2.2.1. Symbiotes primaires et secondaires chez les insectes 35
2.2.2. Implication des bactéries symbiotiques dans la nutrition des insectes 36
2.2.3. Implication des bactéries symbiotiques dans la reproduction des insectes 38
2.2.4. Implication des bactéries symbiotiques dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques chez les insectes 40
2.2.5. Interactions des bactéries symbiotiques avec le système immunitaire des insectes 42
2.3. Diversité et fonction du microbiote bactérien chez l'holobionte moustique 46
2.3.1. Introduction 46
2.3.2. Publication n°1. « Diversity and function of the bacterial microbiota in the mosquito holobiont » 46
2.3.3. Le microbiote bactérien d'*Aedes albopictus* 59
2.3.3.1. *Wolbachia* 59
2.3.3.2. Autres symbiotes d'intérêt 60
2.3.3.3. Les autres membres du microbiote bactérien d'*Ae. albopictus* 62

Mémoire Expérimental 63
1. Introduction 64
2. Etudes des symbiotes secondaires : *Asaia* et *Acinetobacter* 65
2.1. Contexte et objectif général de l'étude 65
2.2. Publication n°2 : « Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field.caught *Aedes albopictus* » 66
2.3. Discussion et conclusions 83
3. Développement et validation d'une approche de séquençage haut.débit pour l'étude de la diversité bactérienne du moustique tigre 85

3.1. Contexte et objectif général de l'étude 85
3.2. Publication n°3 : « Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus* : a pilot study » 87
3.3. Discussion et conclusions 98
3.4. Mise en place d'une stratégie alternative pour l'étude de la diversité bactérienne du moustique tigre 100
3.4.1. Stratégie 1 : Elimination des séquences de *Wolbachia* 100
3.4.1.1. Introduction 100
3.4.1.2. Matériel et méthodes 101
3.4.1.3. Résultats et discussion 104
3.4.1.4. Conclusions et perspectives 108
3.4.2. Stratégie 2 : Etude du microbiote intestinal du moustique tigre par séquençage Miseq 109
3.4.2.1. Contexte et objectif général de l'étude 109
3.4.2.2. Matériel et méthodes 110
3.4.2.3. Résultats et discussion 112
3.4.2.4. Conclusion 119
4. Méta-taxogénomique bactérienne et génétique des populations autochtones et invasives du moustique tigre *Aedes albopictus* 119
4.1. Contexte et objectif général de l'étude 119
4.2. Critères de sélection des sites d'échantillonnage des populations de moustiques 120
4.3. Publication n°4 «Invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity 123
4.4. Discussion et conclusions 168
4.5. Mise en évidence d'une espèce cryptique et caractérisation de son microbiote bactérien 171
4.5.1. Contexte de l'étude 171
4.5.2. Matériel et méthodes 172
4.5.3. Résultats et discussion 174
4.5.4. Conclusion 179

Discussion Générale 181
Références 195
Annexes 219
Annexe 1. *Ascogregarina taïwanensis* 220
Annexe 2. Détails technique du séquençage et de l'assemblage des isolats bactériens 224
Annexe 3. Mise au point d'une méthode de séparation de la fraction bactérienne et validation en PCR quantitative 225
Annexe 4. Publication n°5 – « Whole.genome sequence of *Wolbachia* strain *w*AlbB, an endosymbiont of tiger mosquito vector *Aedes albopictus*. 227

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Taxonomie simplifiée des Culicidae.

Figure 2. Cycle de vie du moustique *Ae. albopictus*.

Figure 3. Photographie d'un œuf d'*Ae. albopictus*.

Figure 4. Anatomie de larves d'*Ae. albopictus*.

Figure 5. Exemple de gîtes larvaires d'*Ae. albopictus*.

Figure 6. Pupe d'*Ae. albopictus*.

Figure 7. Anatomie générale des moustiques basée sur le modèle d'une femelle adulte *Ae. albopictus*.

Figure 8. *Ae. albopictus* (imago).

Figure 9. Carte de l'aire de répartition d'*Ae. albopictus* dans le monde en 2013.

Figure 10. Carte de l'aire de répartition d'*Ae. albopictus* en Europe au 1er Janvier 2014.

Figure 11. Schéma général de l'infection et de la transmission de pathogènes par *Ae. albopictus*.

Figure 12. Diagramme simplifié de l'hologénome.

Figure 13. Différents phénotypes induits par *Wolbachia* chez les arthropodes.

Figure 14. Gènes régulés par le système immunitaire chez la drosophile.

Figure 15. Principe des sondes bloquant l'élongation.

Figure 16. Test de contamination des sondes.

Figure 17. Essais de digestion des séquences contaminantes de la sonde W-1.

Figure 18. Optimisation du protocole de blocage de l'amplification avec la sonde W-4.

Figure 19. Evaluation de l'efficacité de l'amorce bloquante W-4 par PCR en temps réel.

Figure 20. Evaluation de l'efficacité de l'amorce bloquante W-4 par PCR en temps réel avec paliers d'hybridation.

Figure 21. Analyses comparatives des indices de richesse et de diversité entre les carcasses et les intestins moyens.

Figure 22. Abondance relative des différents phylotypes bactériens.

Figure 23. Positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) des échantillons.

Figure 23. Sites d'échantillonnage en France.

Figure 24. Sites d'échantillonnage au Vietnam.

Figure 25. Méthodes de capture des moustiques adultes.

Figure 26. Phylogénie des différentes espèces d'*Aedes* basée sur les haplotypes mitochondriaux.

Figure 27. Abondance relative des différents phylotypes bactériens.

Figure 28. Comparaison entre la phylogénie de l'hôte et ses communautés bactériennes intestinales.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Les différentes catégories d'interactions symbiotiques.

Tableau 2. Bactéries associées à la manipulation de la reproduction chez les insectes.

Tableau 3. Caractéristiques des différentes sondes bloquantes.

Tableau 4. Indices de richesse et de diversité.

Tableau 5. Haplotypes et proportion d'infection par *Wolbachia*.

Tableau 6. Pattern d'incompatibilité cytoplasmique bidirectionnelle dans un contexte de superinfections.

LISTE DES ABREVIATIONS

AAB : Acetic Acid Bacteria

ADN : Acide Desoxyribonucléique

AIC : Critère d'Information d'Akaike

AMP : Anti-Microbial Peptide

ARN : Acide RiboNucléique

BD : Bình Dương

BGM : Bù Gia Mập

BIC : Critère d'Information Bayésien

C : Carcasses

CHIKV : Chikungunya Virus

COI : Cytochrome c Oxydase sous unité I

Col A : Coleoptéricine A

CP : Carcasses poolées

Ct : Crossing threshold

DCV : Drosophila C Virus

DENV : Dengue Virus

DGGE : Denaturating Gradient Gel Electrophoresis

E : Individus Entiers

e.g. : exemple général

ECDC : European Center for Disease prevention and Control

EID : Entente Interdépartementale pour la Démoustication

FHV : Flock House Virus

FISH : Fluorescent *In Situ* Hybridisation

GTR : Generalised Time Reversible substitution model

H' : Indice de Shannon

HCM : Hồ Chí Minh ville

HKY : Kishino and Yano substitution model

IIT : Incompatible Insect Technique

Imd : Immune deficiency

ITS : Internal Transcribed Spacer

J' : Indice d'équitabilité de Pielou

JAK-STAT : Janus kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription

JNK : Janus Kinase

L1, L2, L3, L4 : Stades Larvaires 1, 2, 3, 4

LAV : Lutte Antivectorielle

MAMP : Microbial Associated Molecular Pattern

Mb : Mega bases

MCMC : Markov Chain Monte Carlo

MLST : Multilocus Sequence Typing

NC : Nice

ND5 : NADH Déshydrogénase sous unité 5

NMDS : Non-Metric multi-Dimentional Scaling

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

pb : paires de bases

PCR : Polymerase Chain Reaction

PGRP : Peptidoglycan Recognition Protein

PLV : Portes-lès-Valence

PRR : Pathogen Recognition Receptor

PSRF : Potential Scale Reduction Factor

R^2 : Rapport de correlation de Pearson

RAD : Restriction site Associated DNA

RIDL : Release of Insect with Dominant Lethality

rrs : 16S ribosomal RNA gene

SIT : Steril Insect Technique

SNP : Single Nucleotide Polymorphism

sobs : Richesse observée

SP : Saint-Priest

SPE : *Sitophilus primary endosymbiont*

T : Témoin négatif

TD : Intestin moyen (Tube Digestif)

UTO : Unité Taxonomique Opérationnelle

VT : Vũng Tàu ville

wsp : Wolbachia Surface Protein gene

Introduction

Ces dernières années, des maladies humaines et animales transmises par les arthropodes vecteurs sont apparues dans de nouvelles régions du globe jusque-là épargnées. Un exemple révélateur est celui des émergences et réémergences des arboviroses (maladies virales transmises par les arthropodes) dans le monde, en particulier liées à l'expansion géographique de plusieurs espèces de moustiques vecteurs (Lounibos, 2002; Kaufman and Fonseca, 2014). Parmi elles, *Aedes albopictus*, plus communément appelée moustique tigre, est considérée comme une des espèces animales les plus invasives au monde (Global Invasive Species Database). Outre son fort pouvoir invasif, ce moustique est capable de transmettre pas moins de 19 virus humains et animaux (chikungunya, dengue, Nil Occidental, …) ou encore des filaires (Paupy et al., 2009). Originaire d'Asie du Sud et de l'Est, *Ae. albopictus* a colonisé 5 des 6 continents en l'espace de 150 ans (revu par Bonizzoni et al., 2013). Selon les données actuelles, deux facteurs anthropogéniques seraient à l'origine de son extension géographique: les pratiques humaines liées au développement des transports, notamment le commerce international des pneus, et le réchauffement climatique qui aurait un impact direct sur sa biogéographie (Gould and Higgs, 2009). Ainsi, son aire de répartition ne cesse de croître d'année en année avec des risques sanitaires préoccupants.

Face à l'absence de vaccins efficaces, la maîtrise des arboviroses repose essentiellement sur le contrôle des populations de vecteurs, principalement par l'utilisation d'insecticides chimiques. Même si l'application de tels composés s'est révélée efficace pour diminuer la densité de moustiques et enrayer certaines épidémies, l'apparition de moustiques résistants aux insecticides associée à la contamination environnementale et la destruction d'organismes non cibles ont amplifié la controverse autour de ce moyen de lutte. Dans ce contexte, des efforts ont été conduits pour développer de nouvelles stratégies de contrôle. Parmi ces méthodes, l'utilisation de bactéries symbiotiques comme agents limitant la transmission des pathogènes a été mise en avant au niveau international (Moreira et al., 2009; Sassera et al., 2013). En effet, lors de son développement dans l'insecte, le pathogène va coloniser différents organes connus pour abriter une microflore endogène susceptible d'interagir avec lui (Cirimotich, Ramirez, et al., 2011; Weiss and Aksoy, 2011). Chez les moustiques, des résultats encourageants d'applications en lutte antivectorielle ont d'ores et déjà pu être obtenus avec la bactérie intracellulaire *Wolbachia*. Ainsi, il a été montré que des moustiques *Aedes aegypti* transinfectés avec la souche *w*Melpop CLA de *Drosophila melanogaster* présentaient une forte diminution de la dissémination des virus de la dengue et du chikungunya (McMeniman et al., 2009; Moreira et al., 2009; Bian et al., 2010). Ce phénotype d'interférence a également été observé chez les moustiques *Anopheles gambiae,* vecteurs du paludisme, où les bactéries *Enterobacter* sp. EspZ ont montré une action antagoniste envers les parasites *Plasmodium* (Dong et al., 2009;

Cirimotich et al., 2011). Chez *Ae. albopictus,* naturellement infectée par *Wolbachia*, il a été montré que la bactérie pouvait limiter la dissémination du virus de la dengue vers les glandes salivaires (Mousson et al., 2012).

En dehors de *Wolbachia*, *Ae. albopictus* héberge également des symbiotes secondaires et plus largement un microbiote bactérien dont l'impact sur sa biologie a été peu étudié jusque-là. Or, les relations durables entre organismes sont reconnues comme l'un des mécanismes majeurs des transitions et innovations évolutives de l'histoire de la vie. En particulier, les liens fonctionnels qui unissent les arthropodes et leur microbiote sont souvent le fruit d'une évolution concertée (Brucker and Bordenstein, 2012; Guerrero et al., 2013). Jusqu'à présent, les études visant à décrire le rôle biologique des microorganismes associés aux insectes se sont principalement intéressées aux interactions entre bactéries symbiotiques et insectes phytophages. Ces modèles ont ainsi révélé l'implication de la microflore bactérienne des hôtes dans des fonctions clés comme la nutrition, la reproduction, la thermotolérance, la protection contre les parasites et plus largement leur adaptation aux contraintes environnementales (Buchner, 1965 ; Moran et al., 2008 ; Moya et al., 2008). Ainsi, une compréhension globale de la biologie des insectes nécessite une analyse intégrée qui prend en compte la composante microbienne. Ces observations alimentent la « théorie de l'hologénome », théorie selon laquelle l'unité de sélection évolutive n'est pas uniquement représentée par les gènes de l'individu isolé mais plus par ceux de l'holobionte, c'est-à-dire l'hôte et tous les microorganismes qui lui sont associés (Rosenberg et Zilber-Rosenberg, 2011).

Chez *Ae. albopictus*, l'étude des communautés bactériennes a principalement porté sur une analyse descriptive permettant de dresser un inventaire significatif mais non exhaustif des taxons bactériens présents (Chouaia et al, 2010 ; Zouache et al, 2009 ; 2011 ; 2012). L'avènement des méthodes de séquençage haut débit offre aujourd'hui la possibilité d'accéder à une nouvelle vision de la biodiversité (Petrosino et al., 2009; Metzker, 2010). Dans ce contexte, mon projet de thèse avait pour but l'étude descriptive exhaustive du microbiote bactérien associé à *Ae. albopictus*. Dans une première partie de ce manuscrit, une synthèse des données bibliographiques sur la symbiose bactérienne chez les insectes et sur la biologie du moustique tigre a été réalisée. Dans une seconde partie, les résultats expérimentaux obtenus, centrés sur le moustique *Ae. albopictus*, sont présentés en trois chapitres distincts incluant (i) l'étude spécifique de taxons bactériens cultivables, (ii) le développement et la validation d'une approche haut débit pour l'étude de la diversité bactérienne et (iii) l'application de cette méthodologie pour l'analyse méta-taxogénomique et génétique des populations de moustiques de populations autochtones et invasives. Enfin, la dernière partie sera consacrée à la discussion générale des résultats et aux perspectives entrevues pour la continuité de ces travaux.

Synthèse Bibliographique

1. Le moustique tigre : *Aedes albopictus*

1.1. Introduction

Les moustiques sont considérés comme les premiers vecteurs de pathogènes au monde et en particulier les genres *Aedes, Anopheles* et *Culex* (OMS). Ils constituent un enjeu majeur de santé publique dont les préoccupations actuelles sont la lutte contre la transmission des maladies infectieuses d'origine parasitaires (e.g. Paludisme, Filarioses) ou virales (e.g. Dengue, Chikungunya, Fièvre Jaune). Parmi les moustiques vecteurs d'agents infectieux, l'espèce *Aedes albopictus*, plus communément appelée moustique tigre, suscite des inquiétudes grandissantes. En effet, elle a été montrée compétente au laboratoire (capacité à s'infecter, à répliquer et à retransmettre des pathogènes) pour 19 virus humains ainsi que des filaires d'intérêt vétérinaire (Paupy et al., 2009). Cependant, les preuves de son implication dans la transmission de ces pathogènes *in natura* n'ont pas été apportées pour la majorité d'entre eux. De plus, ces préoccupations sanitaires sont accentuées par son fort pouvoir invasif. En effet, la première description du moustique date de 1894 dans la région du Bengale, en Inde (Skuse, 1894). Depuis, cette espèce n'a eu de cesse d'étendre son aire de répartition et est désormais présente sur 5 des 6 continents. Elle est à ce titre considérée comme l'une des 100 espèces les plus invasives au monde (Global Invasive Species Database). Si son introduction sur de nouvelles aires géographiques est très fortement corrélée aux activités humaines, sa forte plasticité écologique de même que sa capacité à entrer en diapause (survie aux conditions de stress par une forme de dormance) ont également largement contribué à son succès adaptatif dans des territoires présentant des caractéristiques éco-climatiques contrastés (Paupy et al., 2009; Bonizzoni et al., 2013). La première partie de mon mémoire bibliographique sera consacrée à l'état actuel des connaissances sur la biologie, l'historique d'invasion et le rôle vecteur d'*Ae. albopictus*, qui constitue le modèle d'étude de cette thèse.

1.2. Biologie, anatomie et écologie du moustique tigre

Ae. albopictus est membre du super ordre des Holometabola ou Endopterygota (Clements, 1992). Il s'agit d'un insecte de la famille des *Culicidae*, appartenant à la Tribu des *Aedini* et au sous genre *Stegomya* (Figure 1). Son cycle de vie comprend plusieurs stades morphologiques incluant le passage par un stade nymphal permettant une métamorphose finale donnant naissance à la forme adulte. Plus précisément, le cycle de vie du moustique

est constitué d'une succession de quatre stades majeurs : l'œuf, la larve, la nymphe et l'adulte marqués par des spécificités biologiques et écologiques (Figure 2). Les trois premiers stades sont réalisés en immersion dans l'eau durant 19 à 36 jours (Gomes et al., 1995) tandis que le stade adulte marquera l'émergence du moustique hors de l'eau et pourra durer jusqu'à 60 jours selon les conditions environnementales (Clements, 1992; Brady et al., 2013). Les paragraphes qui suivent sont consacrés à la description détaillée des caractéristiques des différents stades du développement du moustique.

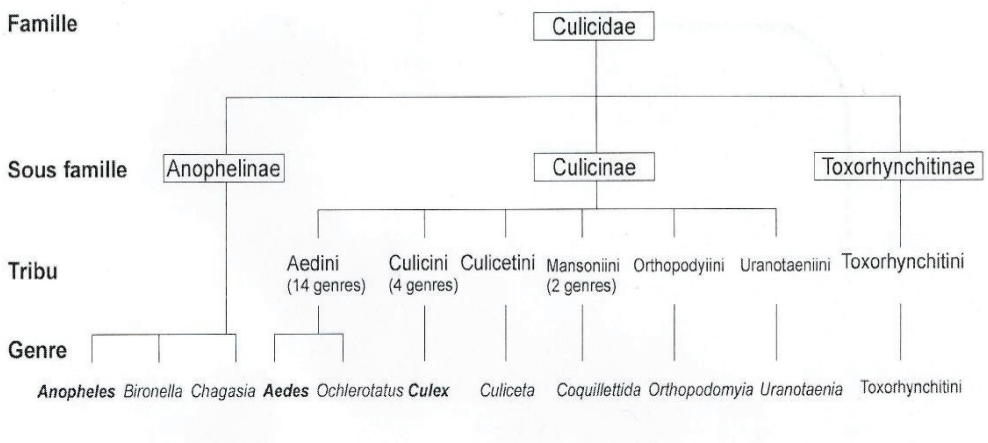


Figure 1. Taxonomie simplifiée des *Culicidae* (adaptée de Harbach, 2004**).**

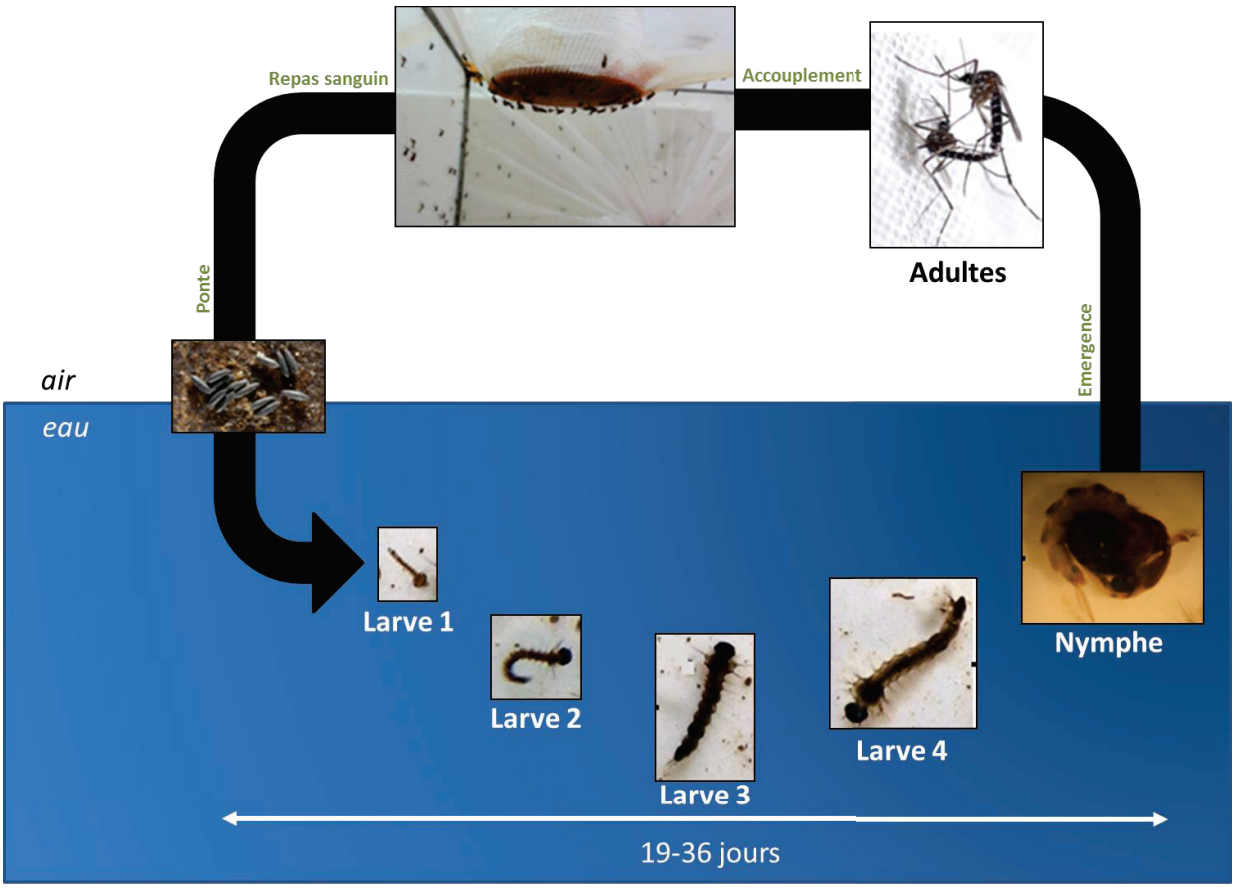


Figure 2. Cycle de vie du moustique *Ae. albopictus.* (Adapté de la thèse de Fara N. Raharimalala)

1.2.1. L'œuf

Les œufs d'*Ae. albopictus* ont une forme ovale allongée dite forme de « cigare » (Figure 3). Ils mesurent environ 500 µm de long et apparaissent de couleur noir-brillant (Linley, 1989). Déposés isolément par la femelle à la surface de l'eau ou sur une surface sèche, ils écloront en 5 à 6 jours après immersion. Une de leurs caractéristiques, également à l'origine du fort pouvoir invasif de l'espèce, est leur très forte résistance aux stress biotiques et abiotiques (Juliano and Lounibos, 2005). En effet, les œufs de certaines populations du moustique tigre présentent une résistance accrue aux conditions défavorables leur permettant de survivre aux périodes hivernales dans les zones tempérées (Denlinger and Armbruster, 2014). Cette période de latence ou diapause se produit généralement en réponse à un stimuli extérieur comme par exemple les chutes de températures, la dessiccation ou encore le raccourcissement de la photopériode (durée d'ensoleillement par jour) (Sota & Mogi, 1992; Hanson & Craig, 1994). Au cours de la diapause, la larve va se former à l'intérieur même du chorion de l'œuf et va être maintenue en dormance (Reynolds et al., 2012). Les mécanismes physiologiques et métaboliques à l'origine de ce phénomène

restent encore peu décrits à ce jour. Ils impliqueraient notamment une conservation du métabolisme lipidique et une augmentation de la proportion de lipides polyinsaturés qui permettraient une meilleure résistance des membranes cellulaires aux stress thermiques et à la dessiccation (Urbanski et al., 2010; Reynolds et al., 2012). De plus, les œufs d'*Ae. albopictus* présentent une forte aptitude à la compétition interspécifique au sein du gîte larvaire. En effet, des études en conditions de laboratoire et de terrain ont montré une faible inhibition de leur éclosion en présence de larves de la même espèce ou d'espèces différentes (Juliano, 2009). Néanmoins, tout comme les stades qui se succéderont, ils sont soumis à une forte pression de prédation. En particulier, les larves de la coccinelle insectivore *Curinus coeruleus* ou encore les fourmis de l'espèce *Solenopsis invicta* sont deux prédateurs reconnus des œufs d'*Ae. albopictus* (Burnham et al., 1994; Yang, 2006; Duhrkopf et al., 2011).

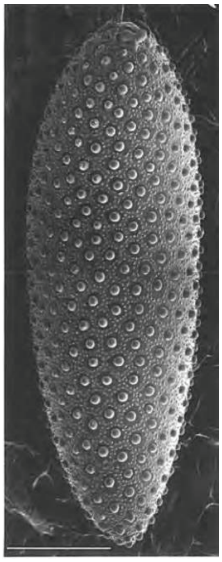


Figure 3. Photographie d'un œuf d'*Ae. albopictus* (Linley, 1989). La surface du chorion est visible par microscopie électronique. L'échelle représente une taille réelle de 100 µm.

1.2.2. Le stade larvaire

La durée du stade larvaire est d'environ 5 à 10 jours. Il est subdivisé en quatre stades de développements successifs communément appelés stades L1, L2, L3, L4 (Hawley, 1988; Löwenberg Neto and Navarro-Silva, 2004). L'exosquelette des arthropodes étant inextensible, chacun de ces stades est séparé par une mue ou « ecdysis » permettant le renouvellement de la cuticule au cours des phases de croissance (Clements, 1992). Les larves sont de couleur brun-noir et leur anatomie est divisée en trois sections majeures : la tête, le thorax et l'abdomen (Figure 4). Lors du premier stade larvaire, les larves mesurent

près de 1mm de long et sont caractérisées par la présence d'un cône sur la partie postérieure de la tête leur permettant de casser le chorion de l'œuf au moment de l'éclosion (Malar Sivanathan, 2006). Au cours du premier stade, la larve va doubler de volume. Lors du second stade larvaire, la larve va s'allonger de 2 à 3 mm, sa tête va s'assombrir et les organes respiratoires (siphon, trachée) vont se développer. C'est au cours du troisième stade larvaire que la larve va le plus varier en taille : le corps est plus large qu'au stade précédent et la tête est proportionnellement plus petite que le reste du corps. Le quatrième stade de même taille que le précédent est quant à lui, marqué par une accumulation de corps gras. On peut également observer les rudiments des futures palettes natatoires de la pupe. A l'état larvaire, le moustique est mobile et respire par l'intermédiaire d'un siphon postérieur, en remontant régulièrement à la surface de l'eau (Clements, 1992).

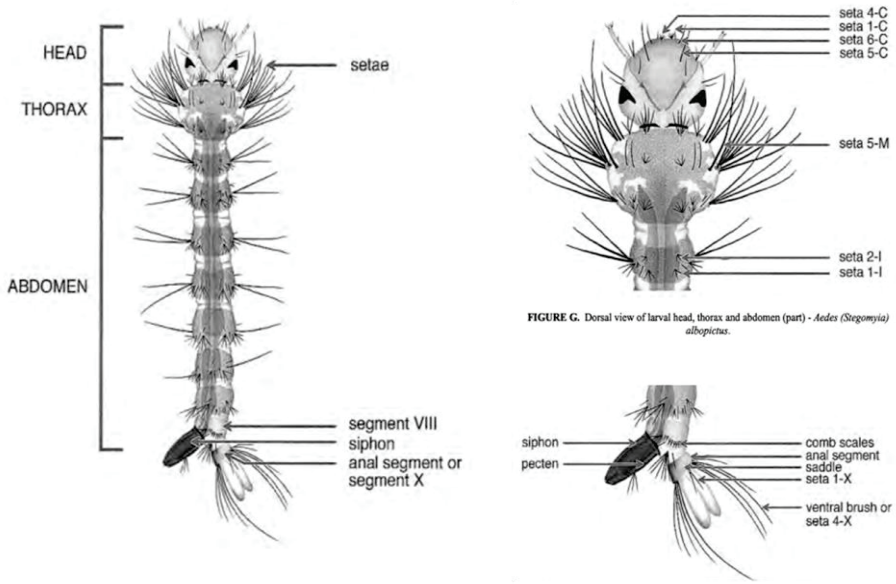


Figure 4. Anatomie de larves d'*Ae. albopictus* (modifié d'après Rueda, 2004).

Au stade larvaire, le moustique est capable de coloniser aussi bien des gîtes d'origine naturelle comme par exemple des phytotelmes qui s'apparentent à des habitats aquatiques contenus dans des cavités de végétaux (trous d'arbres, Broméliacées, bambous) que des gîtes d'origine artificielle (pots de fleurs, pneus usagés) (Hawley, 1988; Vezzani, 2007; Yee, 2008; Bartlett-Healy et al., 2012). Les gîtes préférentiels sont protégés du soleil et ont la particularité de contenir de faibles volumes d'eau stagnante (Figure 5) (Clements, 1992). Cette grande plasticité écologique confère donc au moustique tigre un avantage pour la colonisation d'un large panel d'écosystèmes ruraux, périurbains et urbains. C'est au sein de ces gîtes qu'elles puiseront leur nourriture essentiellement constituée de matière organique (Hawley, 1988). Elles se nourrissent principalement par filtration et broutage, mais elles

peuvent également être prédatrices (Clements, 1992). Les larves sont dites détritiphages, leurs nutriments étant principalement constitués de détritus d'origine animale (carcasse d'insectes) ou végétale (résidus végétaux en décomposition) (Daugherty et al., 2000; Murrell and Juliano, 2008; Bara et al., 2014). Certaines études ont également suggéré la possibilité que les larves se nourrissent de bactéries et de champignons qui joueraient par ailleurs le rôle de décomposeurs primaires des nutriments facilitant ainsi leur digestion (Yee et al., 2007). Les larves tireraient donc directement profit des pics de densité microbienne induits par la libération de sources d'azotes et de phosphore lors de la décomposition des détritus au sein des gîtes (Yee and Juliano, 2006).

Figure 5. Exemple de gîtes larvaires d'*Ae. albopictus.* (Bonizzoni et al., 2013). Différents exemples de gîtes sont représentés dont (A) containeur en métal, (B) terrarium, (C) trous dans des pierres, (D) vases en céramique, (E) containeur en plastique, (F) gouttière, (G) pneus, (H) surfaces accumulant l'eau, (I) gobelet jetable, (J) dalles percées, (K) pots de fleurs, (L) containeur en métal.

La larve va par ailleurs constituer l'un des stades les plus vulnérables du cycle de développement du moustique. En effet, elle est soumise aux pressions de prédation de la part d'autres espèces de moustiques, d'invertébrés et de parasites. Par exemple, *Toxorhynchites splendens* est une espèce de moustique évoluant en zones tropicales ou sub-tropicales et qui se nourrit exclusivement de *Culicidae* (Miyagi et al., 1992). De même, les copépodes cyclopoïdes, en particulier les espèces *Mesocyclope aspericornis, Diacyclops*

navus, Acanthocyclops vernalis, Mesocyclops rutterni et *Mesocyclops edax* sont des crustacés microscopiques qui se nourrissent des larves d'*Ae. albopictus* présentes au sein de gîtes naturels ou artificiels (Marten, 1990). Leur appétence pour les larves de ce moustique a fait de ces crustacés un agent majeur de lutte biologique. Par ailleurs, les larves d'*Aedes* sont connues pour être parasitées par des protozoaires appartenant au genre *Ascogregarina* (voir Annexe 1). Parmi eux, l'espèce *A. taïwanensis* a un tropisme spécifique pour les larves d'*Ae. albopictus*. Les larves acquièrent le parasite dans l'eau du gîte, qui par la suite se multiplie chez la nymphe grâce à un développement synchronisé des deux partenaires. Le parasite peut être transmis verticalement à la descendance par infection des œufs ou horizontalement d'une larve à une autre (Chen and Yang, 1996; Lantova and Volf, 2014). L'espèce *A. taïwanensis* serait également capable d'infecter les espèces *Ae. triseriatus* et *Ae. taeniorhynchus* et devenir, dans certaines circonstances, une source importante de mortalité chez ces dernières (Garcia et al., 1994; Aliabadi and Juliano, 2002). En général, ce parasite est reconnu pour diminuer la durée de vie du moustique adulte (Tseng, 2007). Cependant, sa forte prévalence (proche des 100% en condition naturelle) et son impact favorable lors des phénomènes de compétition posent des questions sur la nature de son interaction avec le moustique tigre (Lantova and Volf, 2014). De façon intéressante, il a déjà été démontré l'existence de compétition indirecte exercée par la présence d'un parasite chez les moustiques (revu par Juliano & Lounibos, 2005). Ce phénomène pourrait en partie expliquer la plus forte compétitivité de l'espèce *Ae. albopictus* vis-à-vis des espèces voisines (*Ae. triseriatus, Culex coronator, Cx. quinquefasciatus, Ae. aegypti*) partageant le même habitat larvaire (Braks et al., 2004; Juliano and Lounibos, 2005; Allgood and Yee, 2014; Kesavaraju et al., 2014; Yee and Skiff, 2014).

1.2.3. Le stade nymphal (pupe)

Suite au dernier stade larvaire, la larve va muer en pupe (ou nymphe). Cette métamorphose dure entre 1 et 3 jours lorsque les conditions de température sont optimales mais peut se prolonger au-delà de 13 jours si les conditions environnementales sont défavorables (Hawley, 1988; Gomes et al., 1995; Löwenberg Neto and Navarro-Silva, 2004). La morphologie de la pupe est dite « en forme de virgule » (Figure 6). L'une de ses caractéristiques majeures est l'absence de nutrition. Sa survie est donc principalement dépendante des réserves accumulées à l'état larvaire. Elle respire en affleurant la surface de l'eau, à l'aide de trompètes respiratoires situées sur son céphalothorax (Clements, 1992). La pupe est également mobile grâce à la présence de palettes natatoires, lui permettant de fuir en cas de danger (Clements, 1992). Au cours de cette métamorphose, diverses

transformations anatomiques vont être opérées notamment au niveau du tube digestif qui va subir une stérilisation partielle (Moll et al., 2001). Cette stérilisation s'accompagne d'une défécation terminale débutant lors du quatrième stade larvaire et qui permet l'élimination de la membrane péritrophique primaire constituée de polysaccharides emprisonnant le microbiote intestinal larvaire. A l'issue de ces modifications profondes, le moustique émerge, sous sa forme adulte, par une fente formée à la surface de la cuticule.

Figure 6. Pupe d'*Ae. albopictus* (source : http://fmel.ifas.ufl.edu)

1.2.4. Le stade adulte (imago)

Au stade adulte, la morphologie générale du moustique est composée de trois sections : la tête, le thorax et l'abdomen. Sa tête est notamment munie d'une paire d'antennes, d'une paire de pédipalpes (organes sensoriels) et d'une trompe ou proboscis (organe permettant la nutrition) (Figure 7). Le thorax porte trois paires de pattes (une paire antérieure, une paire médiane et une paire postérieure) ainsi qu'une paire d'ailes antérieure. Les ailes postérieures sont transformées pour former un organe balancier ou « haltères » qui équilibre le vol (Clements, 1992). Les moustiques comme beaucoup d'espèces animales présentent un dimorphisme sexuel, principalement visible au niveau de la tête. En effet, le moustique mâle possède des organes sensoriels (antennes et pédipalpes) plus développés et un proboscis plus atrophié que la femelle (Figure 8). En plus des différences morphologiques,

les deux sexes se distinguent par des différences de comportement et physiologiques. Les mâles émergent généralement en premier (~17 h avant les femelles) et ont un taux de survie plus faible que les femelles (~77% de survie hebdomadaire pour les mâles et 89% pour les femelles en conditions naturelles) (Estrada-Franco and Craig, 1995; Clements, 1999). Les deux sexes se nourrissent principalement de nectar dont les sucres simples (en particulier le fructose) qui leur fournissent un apport énergétique essentiel à leur survie (Foster, 1995). La reproduction du moustique tigre débute généralement en vol et dans un délai proche de l'émergence de la femelle (Clements, 1999). A l'issue de l'accouplement, les femelles conservent le sperme des mâles au sein de spermathèques qui leur assureront une fécondation régulière tout au long de leur vie. Le moustique tigre est un organisme anautogène. Cela signifie que les femelles ont besoin de protéines acquises à partir de sang d'animaux vertébrés pour accomplir leur cycle gonotrophique (Foster, 1995). Des études effectuées avec différents apports en sang ont permis d'identifier l'Isoleucine comme étant un acide aminé essentiel à l'accomplissement de l'ovogénèse (Spielman, 1971; Spielman and Wong, 1974). De plus, les femelles ont un comportement nutritionnel opportuniste et sont capables de prendre leur repas de sang à partir d'un large spectre d'hôtes vertébrés à sang chaud ou froid: reptiles, oiseaux, amphibiens et mammifères (en particulier l'homme) (Scholte and Schaffner, 2007; Paupy et al., 2009). Des études visant à déterminer les préférences trophiques du moustique ont d'ailleurs montré une plus forte affinité pour l'homme (Egizi et al., 2013). Son repas sanguin est donc constitué à plus de 60% de sang humain (Delatte et al., 2008; Egizi et al., 2013). Enfin, les femelles devant trouver un lieu de ponte adapté pour y déposer leurs œufs, elles démontrent une plus grande capacité de dispersion que les mâles (Foster, 1995).

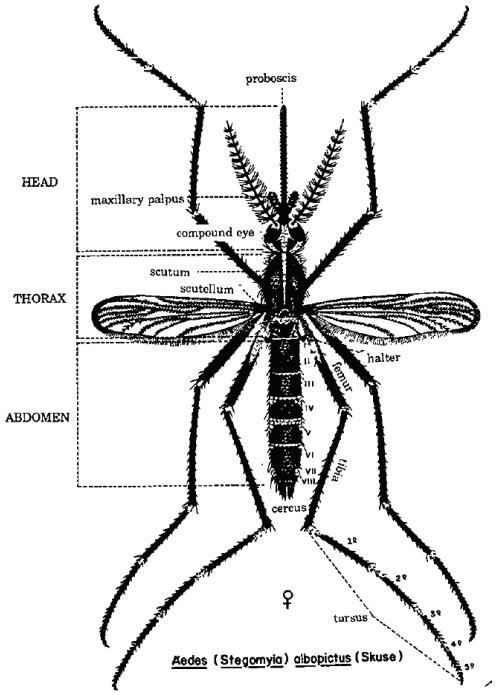


Figure 7. Anatomie générale des moustiques basée sur le modèle d'une femelle adulte *Ae. albopictus* (adapté d'après Estrada-Franco & Craig, 1995)**.**

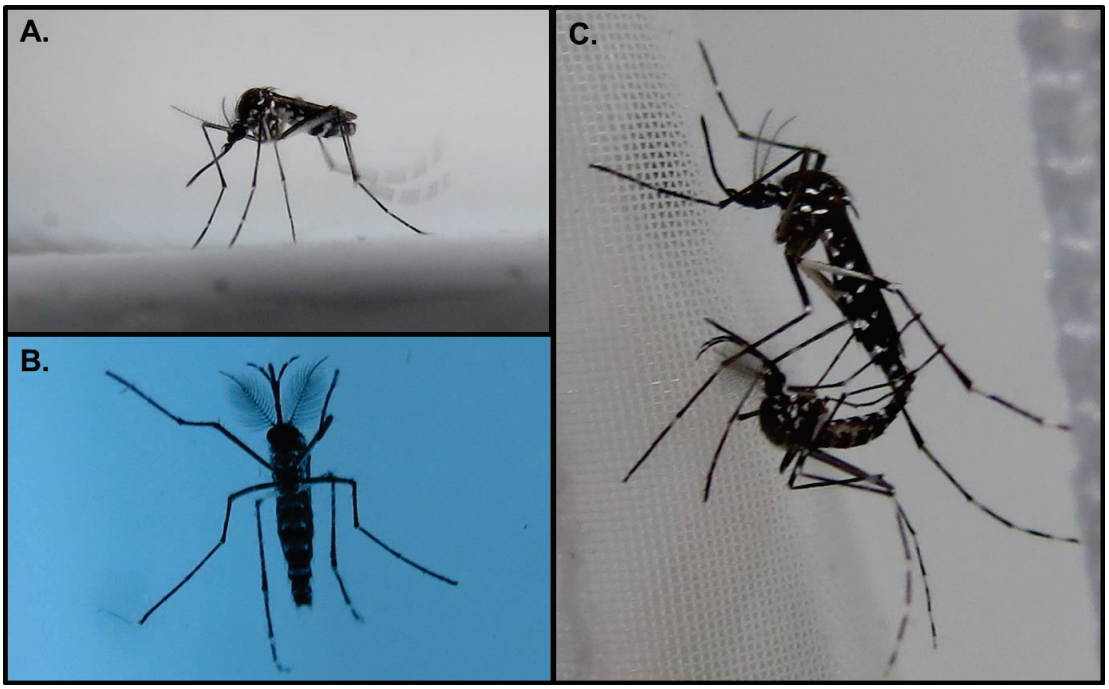


Figure 8. *Ae. albopictus* (imago). (A) Femelle (B) Mâle (C) Accouplement (source : F. Chaix)

1.3. Une espèce invasive

Le moustique *Ae. albopictus* est une espèce originaire du Sud et de l'Est de l'Asie (Hawley, 1988). C'est pour cette raison qu'il est parfois appelé moustique tigre asiatique. Sa forte plasticité écologique et sa capacité à entrer en diapause sont deux des caractéristiques majeures lui ayant permis de s'adapter à des régions écoclimatiques contrastées. Cette plasticité est telle que des modèles basés sur l'analyse de ses gènes mitochondriaux ne montrent aucune phase de fragmentation en Asie du Sud-Est au cours de la dernière période de glaciation (il y a environ 21 000 ans) suggérant ainsi une aire de répartition constante y compris en conditions extrêmes (Porretta et al., 2012). Depuis le XXème siècle, les changements globaux liés aux activités humaines (intensification des échanges commerciaux, changements climatiques) ont largement participé à la dissémination du moustique et à son maintien dans de nombreuses régions du monde au sein de 5 des 6 continents (Figure 9). C'est ainsi qu'*Ae. albopictus* est aujourd'hui considérée comme l'une des 100 espèces les plus invasives (Global Invasive Species Database). L'invasivité d'une espèce étant définie par sa capacité à se déplacer au sein de nouvelles aires géographiques et à s'y implanter durablement. L'historique de son invasion peut être ainsi séparée en quatre phases majeures : les premières invasions (1050-1980), les prémices d'une invasion mondiale (1981-1990), l'intensification (1991-2000), l'état actuel (2001-présent) (Bonizzoni et al., 2013).

1.3.1. Les premières invasions (1050-1980)

Les difficultés à obtenir des rapports documentés sur les invasions d'*Ae. albopictus* au cours de la période 1050-1980 ne permettent pas d'établir précisément la dynamique d'invasion de l'espèce. S'il est avéré qu'elle est essentiellement endémique d'Asie, quelques invasions ont pourtant été reportées en dehors de cette aire géographique, principalement dans des régions insulaires. Le moustique tigre se serait implanté à Hawaii aux alentours des années 1890, mais curieusement il n'étendra son aire de répartition à d'autres îles du Pacifique dont la Nouvelle-Calédonie que dans la deuxième moitié du XXème siècle après la seconde guerre mondiale (Joyce, 1961; Rozeboom and Bridges, 1972; Gratz, 2004; LaPointe, 2007). Certains cas de transmission de Dengue attribués à *Ae. albopictus* ont été rapportés à partir de 1975 sur l'île de Guam en Micronésie à l'Est des Philippines (Smith and Carter, 1984; Ward, 1984). A partir de 1928, le moustique a entamé une expansion progressive dans l'Océan indien. Jusqu'alors principalement localisé sur la partie occidentale de l'Inde, il a progressivement étendu son aire de répartition notamment dans l'archipel Chagos au Sud-est de l'Inde (Lambrecht and Van Sombren, 1971), aux Seychelles

(Mattingly and Brown, 1955), sur l'île de la Réunion (Hamon, 1956), l'île Maurice (Balfour Kirk, 1928) et Madagascar (Fontenille and Rodhain, 1989). En parallèle, la première introduction durable d'*Ae*. *albopictus* en Europe est recensée en 1979 en Albanie (Adhami and Reiter, 1998). Cette introduction a été attribuée à l'importation de pneus (gîtes larvaires préférentiels du moustique tigre) en provenance de Chine.

1.3.2. L'intensification (1981-1990)

Si aucune population ne s'est implantée durablement en Nouvelle-Zélande, des introductions ponctuelles, via le commerce de pneus, ont été reportées au cours des années 1990 (Laird et al., 1994). Deux implantations majeures de populations de moustique tigre ont été recensées presque simultanément entre 1984 et 1985 aux Etats-Unis et au Brésil (Lounibos, 2002). Les premiers cas déclarés d'introduction durable aux Etats-Unis sont situés au Texas à proximité de Houston (Sprenger and Wuithiranyagool, 1986) même si le moustique avait été auparavant identifié dans un cimetière du Tennessee et dans certains ports contenant des entrepôts de pneus (Moore and Mitchell, 1997). Les populations brésiliennes, quant à elles, se sont implantées dans le sud-ouest du pays à proximité de la côte (Forattini, 1986). Bien qu'il semble probable que les populations nord-américaines sont issues de populations japonaises, les données de génétique des populations montrent des résultats contradictoires quant à l'origine des populations brésiliennes qui pourraient être proches des populations Japonaises (marqueurs nucléaires) ou des populations du Sud-est asiatique (marqueurs mitochondriaux, incapacité à réaliser la diapause) (Hawley, 1988; Kambhampati et al., 1991; Birungi and Munstermann, 2002; Mousson et al., 2005). Enfin, la présence du moustique tigre a été signalée à Cape Town en Afrique du Sud en 1989 suite au commerce de pneus usagés en provenance du Japon mais il a rapidement été contrôlé empêchant ainsi son installation durable (Cornel, 1991; Bonizzoni et al., 2013).

1.3.3. L'état actuel (1991 – aujourd'hui)

La fin des années 1990 et le début des années 2000 vont marquer le succès invasif du moustique tigre sur les continents américains, européens et africains. Hormis l'introduction de 1979 en Albanie, le continent européen avait jusqu'alors été épargné par de nouvelles introductions. Ce n'est qu'en 1990, qu'un nouveau signalement du moustique a été reporté dans la région de Gènes au Nord de l'Italie marquée l'année suivante par une implantation durable du moustique cette fois dans la région de Veneto. Ces événements vont alors marquer le début d'une expansion presque continue jusqu'à nos jours sur le continent

européen (Sabatini, et al., 1990; Dalla Pozza and Majori, 1992). Les trafics routier et maritime en provenance de l'Italie ont été les principaux facteurs à l'origine d'une colonisation de la côte méditerranéenne et du Sud de l'Europe (Figure 10). Au cours de cette période, d'autres pays, plus au Nord (Belgique, Hollande, Allemagne) vont également être confrontés à l'introduction du moustique via l'importation de pneus et de plantes ornementales, notamment les bambous, en provenance d'Asie (Schaffner et al., 2004; Pluskota et al., 2008) (Figure 10). Sur le continent américain, depuis son introduction en 1985, l'aire de répartition du moustique s'est progressivement étendue au sein des pays colonisés (Brésil et Etats-Unis) puis à de nouveaux pays adjacents d'Amérique Centrale et d'Amérique du Sud au cours des années 1990 (Lounibos, 2002; Bonizzoni et al., 2013). La présence du moustique a ainsi été signalé au Mexique, dans les îles des caraïbes dont Cuba et la République Dominicaine, au Salvador, au Honduras, au Nicaragua, au Venezuela, en Colombie, en Bolivie, en Uruguay, au Paraguay et au nord de l'Argentine (Caminade et al., 2012; Medlock et al., 2012). Enfin, sur le continent africain, les populations initialement implantées sur la côte Atlantique ouest au début des années 1990 se sont propagées à l'ensemble du territoire pour atteindre notamment le Cameroun, le Nigeria, la Guinée Equatoriale et le Gabon (Simard et al., 2005; Paupy et al., 2009).

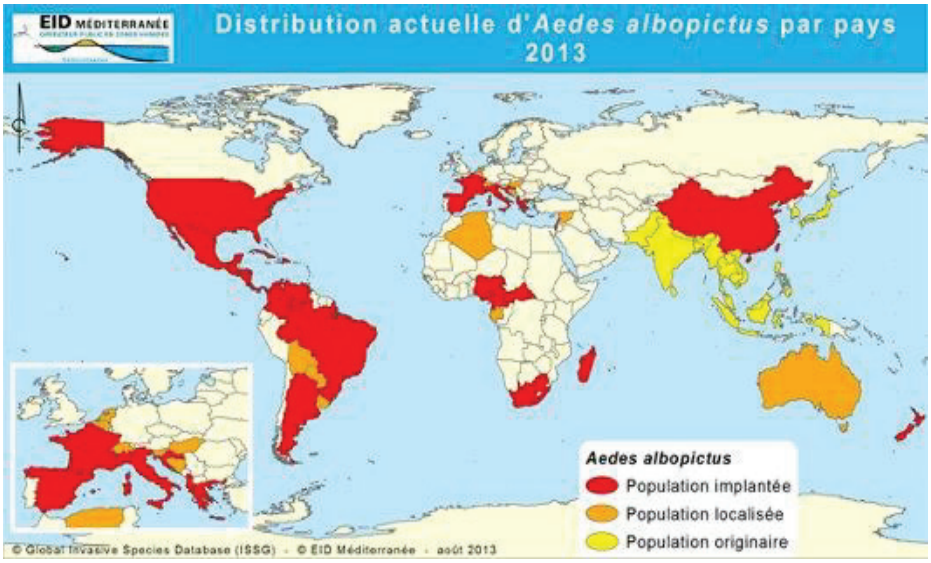


Figure 9. Carte de l'aire de répartition d'*Ae. albopictus* dans le monde en 2013 (source : Entente Interdépartementale de Démoustication en méditerranée). Il convient de signaler que la coloration d'un pays ne signifie pas la colonisation de tout son territoire.

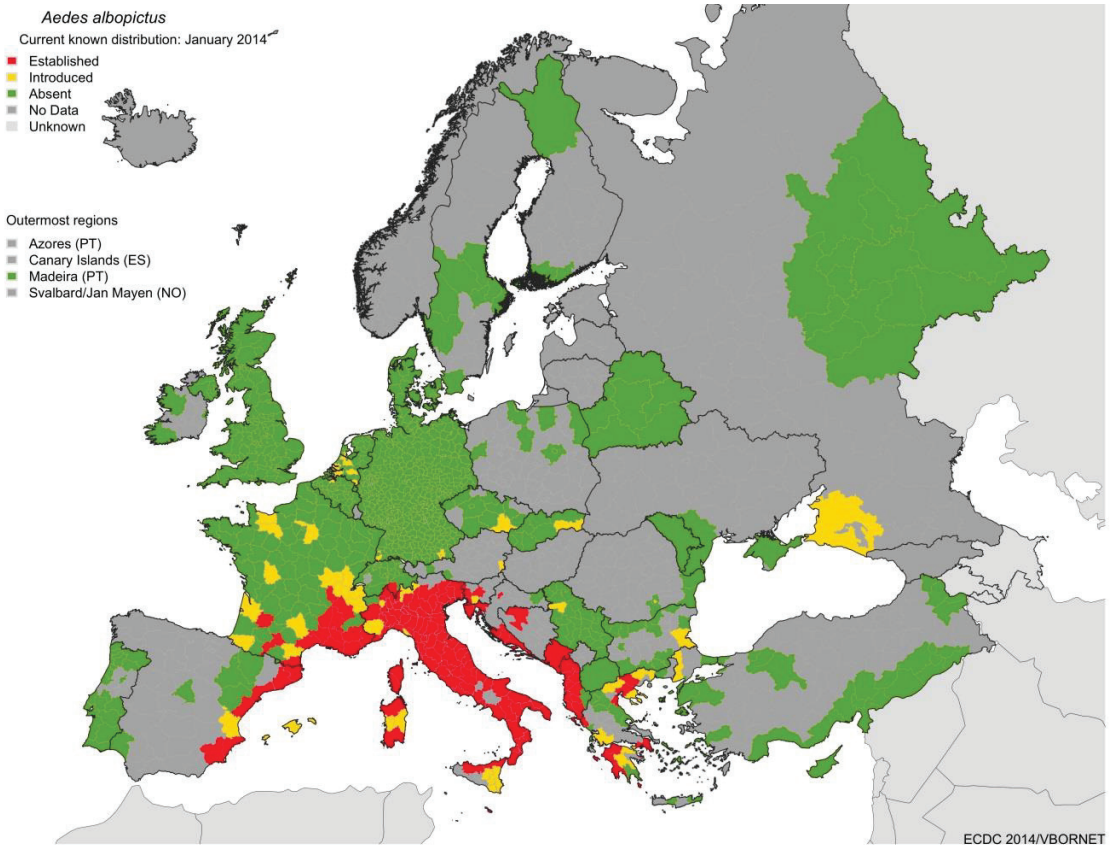


Figure 10. Carte de l'aire de répartition d'*Ae. albopictus* en Europe au 1er Janvier 2014 La présence du moustique a été signalée notamment en France où il sera introduit au début des années 2000 (Schaffner and Karch, 2000), au Monténégro (ECDC), en Suisse (Wymann et al., 2008), en Grèce (Samanidou-Voyadjoglou *et al.,* 2005), en Espagne (Aranda, 2006), en Croatie (Klobucar et al., 2006), en Bosnie-Herzegovine (ECDC), en Slovénie (ECDC), à Monaco (ECDC), à San Marino (ECDC), au Vatican (ECDC) et à Maltes (Paul Gatt, 2009) (source : ECDC).

1.4. Un vecteur préoccupant

1.4.1. Pathogènes transmis

C'est au cours du repas sanguin sur un hôte infecté que les moustiques acquièrent les agents pathogènes (Figure 11). Après une étape de réplication ou de multiplication au sein du moustique, le pathogène pourra alors être retransmis par la salive à un nouvel hôte lors d'un nouveau repas de sang. Le potentiel de transmission est fortement dépendant de la capacité vectorielle qui correspond à l'aptitude du vecteur à transmettre un agent infectieux en fonction de sa bio-écologie et des conditions environnementales. Plus précisément, il s'agit de la résultante de la compétence vectorielle et de la bio-écologie du vecteur (abondance, longévité, préférences trophiques, etc.) sur lesquelles s'exerce l'action des

facteurs environnementaux. Des études en laboratoire ont montré qu'*Ae. albopictus* était compétent pour au moins 19 arbovirus appartenant à quatre familles distinctes : Flaviviridae, Togaviridae, Bunyaviridae et Reoviridae. Au moins 7 virus supplémentaires seraient également susceptibles de l'infecter (revu par Paupy et al., 2009). Les deux familles les plus représentées sont les Flaviviridae (6 virus) et les Togaviridae (8 virus) auxquelles appartiennent respectivement deux des virus les plus médiatisés ces dernières années : les virus de la dengue (DENV) et du Chikungunya (CHIKV).

La Dengue infecte entre 50 et 100 millions de personnes chaque année essentiellement dans les pays tropicaux et se manifeste par des syndromes fiévreux et parfois hémorragiques (Halstead, 2007). Le DENV est un virus à ARN monocaténaire à polarité positive et est divisé en cing sérotypes distincts : DENV-1, DENV-2, DENV-3, DENV-4 et DENV-5. Le cinquième sérotype a été découvert très récemment en 2013 (données non publiées). Une personne infectée par l'un des sérotypes sera immunisée à vie par celui-ci mais pourra encore être infectée par les autres sérotypes (Gubler, 1998). Si aucun traitement n'est actuellement disponible dans le commerce, le développement récent d'un vaccin efficace contre les sérotypes DENV1 à 4 offre de nouvelles perspectives pour enrayer l'expansion de la maladie (Guy et al., 2011). Le nombre de cas rapportés de Chikungunya varie beaucoup en fonction des années et peut atteindre plus de 1 500 000 personnes infectées lors d'une forte épidémie comme cela a été le cas en 2006 en Inde et dans l'océan indien (OMS; Ravi, 2006; Arankalle *et al.*, 2007). Le CHIKV est un virus à ARN monocaténaire à polarité positive. Il est responsable chez l'homme de fortes fièvres, de nausées, de douleurs musculaires et surtout articulaires (OMS).

Les virus DENV et CHIKV sont tous deux transmis par les moustiques *Ae. aegypti* et *Ae. albopictus* (de Lamballerie et al., 2008; Rezza, 2012). Par ailleurs, le virus DENV peut être transmis verticalement d'une génération à l'autre chez chacune des deux espèces (Rosen et al., 1983). L'espèce *Ae. aegypti* a longtemps été considérée comme le vecteur principal des virus DENV et CHIKV du fait de sa capacité à se nourrir sur un large spectre d'hôtes lui conférant ainsi une plus forte probabilité d'infection par le virus et de retransmission de celui-ci. Cependant, ces dernières années, de nombreuses épidémies de Dengue et de Chikungunya à travers le monde ont été imputées à *Ae. albopictus* (Effler et al., 2005; Parola et al., 2006; Charrel et al., 2007; Rezza et al., 2007; Ratsitorahina et al., 2008; Leroy et al., 2009; Issack et al., 2010; Paupy et al., 2012). Deux facteurs principaux seraient à l'origine de ces modifications de capacité de transmission en faveur du moustique tigre: d'une part, son aire de répartition, plus étendue, et d'autre part, sa plus forte compétence vectorielle pour certains génotypes (Parola et al., 2006; Schuffenecker et al., 2006; Lambrechts et al., 2010; Vega-Rua et al., 2013; Vega-Rúa et al., 2014). C'est en particulier l'observation qui a été faite pour le CHIKV pour lequel une plus forte affinité vis-à-vis d'*Ae. albopictus* a été

observée. En effet, une substitution d'acide aminé sur la glycoprotéine E1 de l'enveloppe (E1-A226V) du virus aurait permis au CHIKV de se répliquer plus efficacement chez le moustique tigre *Ae. albopictus* (Parola *et al.,* 2006). Cette mutation aurait été identifiée pour la première fois lors des épidémies de 2005 dans les îles de l'océan indien, puis dans d'autres régions en inde et Afrique Centrale. Elle aurait donc été acquise à plusieurs reprises par convergence évolutive (de Lamballerie et al., 2008). De plus, d'autres mutations sur les glycoprotéines E1 et E2 auraient également conféré au virus une augmentation de sa valeur sélective (Tsetsarkin et al., 2014).

Hormis les pathogènes viraux, le moustique tigre est également compétent pour la transmission de nématodes parasites d'animaux impliqués dans de rares cas d'infection chez l'homme, tels que *Dirofilaria immitis*, *D. repens*, *Setaria labiatopapillosa* (Cancrini et al., 1995). En plus de son impact en santé humaine, *Ae. albopitus* joue également un rôle important en médecine vétérinaire par les pathologies lourdes causées par des parasites transmis aux animaux de compagnie tels que les chiens et les chats (*D. immitis, D. repens*) ainsi que chez les animaux d'élevages tels que les ongulés (*S. labiatopapillosa*) (Anderson, 2000).

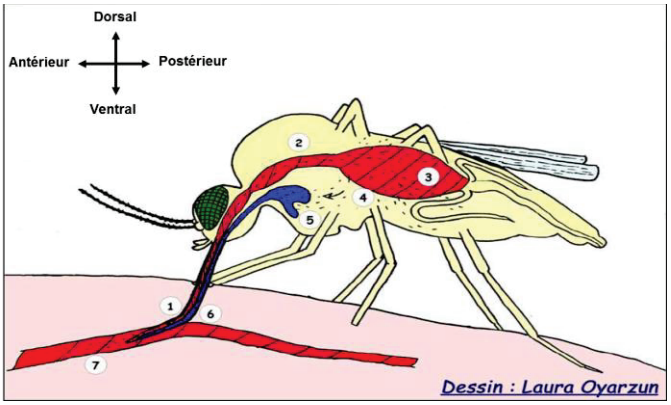


Figure 11. Schéma général de l'infection et de la transmission de pathogènes par *Ae. albopictus.* (1) Repas sanguin sur un hôte infecté, (2) à (5) Période d'incubation extrinsèque : (2) le pathogène passe dans l'intestin antérieur de l'insecte, (3) puis dans l'intestin moyen (lieu de réplication en particulier pour les pathogènes viraux), (4) franchit la membrane épithéliale de l'intestin et se dissémine aux différents organes *via* l'hémolymphe, (5) arrive dans les glandes salivaires (lieu de réplication pour les virus). (6) Infection d'un hôte *via* un nouveau repas sanguin (modifié d'après la thèse de K. Zouache).

1.4.2. Lutte antivectorielle

Aucun traitement efficace n'étant disponible à l'heure actuelle pour lutter contre la majorité des pathogènes transmis par le moustique tigre, la lutte antivectorielle (LAV) reste un dispositif essentiel pour contrôler et/ou éliminer le vecteur. Selon le Centre National d'Expertise sur les Vecteurs, la LAV est définie comme « la lutte et la protection contre les arthropodes hématophages (insectes et acariens) vecteurs d'agents pathogènes à l'homme et aux vertébrés, et leur surveillance». Les états concernés par les invasions du moustique tigre ont très largement contribué à l'élaboration d'une lutte intégrée basée sur l'utilisation d'insecticides chimiques et de méthodes de contrôle biologique, mais également sur des méthodes alternatives de lutte génétique accompagnées de moyens de prévention et de gestion environnementale optimisés.

1.4.2.1. Insecticides

De façon générale, la LAV contre *Ae. albopictus* repose essentiellement sur l'utilisation d'insecticides chimiques ou biologiques, ayant des effets larvicides ou adulticides. Les larvicides chimiques les plus couramment utilisés sont le Dichlorodiphényltrichloroéthane et le Malathion appartenant à la famille des Organochlorés et le Téméphos et le Fénitrothion appartenant à la famille des Organophosphorés (Vontas et al., 2012). Au stade adulte, les principaux insecticides chimiques ayant montré leur efficacité appartiennent à la famille des Pyréthrinoïdes (Deltaméthrine, Perméthrine) (Vontas et al., 2012). Leur utilisation est principalement restreinte aux périodes épidémiques ou de risques épidémiques car ils sont efficaces sur de courtes durées. En effet, des essais réalisés aux Etats-Unis ont montré que la population de moustiques pouvait recouvrer sa taille initiale trois jours après l'arrêt du traitement (Estrada-Franco and Craig, 1995). Cependant, plusieurs enjeux majeurs se heurtent à l'utilisation des insecticides : leur impact sur les écosystèmes (notamment par élimination d'espèces non cibles) et l'apparition croissante de résistances (Ware, 1980; Sogorb and Vilanova, 2002; Liu et al., 2004; Hamdan et al., 2005; Vontas et al., 2012; Zhang et al., 2012; Karunaratne et al., 2013). De plus, les capacités de dispersion du moustique au sein de différents gîtes est également un facteur supplémentaire accentuant les difficultés de traitement (Estrada-Franco and Craig, 1995).

1.4.2.2. Lutte biologique

La lutte biologique est une méthode alternative de plus en plus employée en LAV de par son faible coût et son impact modéré sur les espèces non cibles. En particulier, la bactérie *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* est couramment utilisée contre les larves d'*Ae. albopictus*. Elle a la particularité de produire et libérer les toxines *Cry* et *Cyt* dans le tube digestif des larves (voir détails chapitre 2.2.2). Hormis les bactéries productrices d'insecticides, divers prédateurs de larves ont également été proposés comme agents de lutte biologique en vue du contrôle des populations d'*Ae. albopictus* (voir chapitre 1.2.2.). Ceux-ci affectent la population larvaire qui donnera par conséquent un nombre plus réduit d'adultes aptes à se reproduire et à transmettre des pathogènes. Parmi les prédateurs les plus utilisés, on rencontre notamment les larves du moustique *Toxorhynchites splendens* (Focks, 2007). A l'âge adulte, ce moustique est exclusivement nectarivore et ne présente donc pas de risque sanitaire. Certains crustacés de la sous-classe des copépodes et de l'ordre des Cyclopoida évoluant au sein des gîtes larvaires ont également été proposés comme outil de lutte biologique (Marten, 1990). Leur utilisation a cependant rencontré certaines limites. En effet, les genres *Macrocyclopes* et *Mesocyclopes* qui étaient apparus comme les plus efficaces en conditions de laboratoire, se sont finalement révélés peu adaptés aux gîtes larvaires d'*Ae. albopictus* en comparaison des genres *Eucyclopes*, *Topocyclopes* et *Metacyclopes* (Marten, 1990; Santos and Andrade, 1997). De plus, il a été observé que l'efficacité de prédation des copépodes diminuait progressivement avec le temps, les larves les plus grandes n'étant pas prédatées (Rey et al., 2004). Enfin, le champignon entomopathogène *Metarhizium anisopliae* appartenant à la division des *Ascomycota* a également été proposé dans le cadre du bio-contrôle du moustique tigre (Scholte et al., 2007; Bilal et al., 2012). Cependant, les délais pour observer une diminution suffisante de la population cible s'avérant relativement longs, son utilisation a souvent été préconisée en complément d'autres méthodes (Bilal et al., 2012).

1.4.2.3. Lutte génétique

Une autre alternative à l'usage d'insecticides est la lutte génétique. Il s'agit, non pas d'agir directement sur les individus, mais d'impacter leur probabilité d'être fécondés ou de produire une descendance viable. De nombreuses techniques innovantes ont été développées dans ce sens tel que le SIT (Sterile Insect Technique), l'IIT (Incompatible Insect Technique), le RIDL (Release of Insects with Dominant Lethality). L'une des plus abouties est le SIT qui consiste en l'irradiation des gamètes mâles par rayonnement Gamma et le lâcher des mâles stériles dans l'environnement (Sinkins et al., 1995; Bellini et al., 2007). Cette technique vise

ainsi à réduire fortement la probabilité de fécondation des femelles. Cependant, si cette méthode s'est révélée efficace chez d'autres modèles d'insectes, deux limites majeures ont freiné son application dans la lutte contre le moustique tigre : (i) une diminution des performances sexuelles et de la compétitivité des mâles (Boyer et al., 2011; Bellini et al., 2013) et (ii) des difficultés dans la mise en place d'un système performant de production et de tri des mâles (Benedict and Robinson, 2003). Pour ces raisons, l'utilisation de stratégies alternatives, encore en phase de développement, a été proposée avec entre autre le RIDL et l'IIT. Le RIDL est une variante du SIT basée sur l'utilisation de moustiques possédant un gène létal pour les larves et dont l'expression peut être inhibée par ajout de tétracycline lors de l'élevage au laboratoire (Labbé et al., 2012). La technique IIT, quant à elle, est basée sur l'introduction de la bactérie endosymbiotique manipulatrice de la reproduction *Wolbachia pipientis w*Pip chez les mâles (voir Chapitre 2.2.2.) (Calvitti et al., 2012). L'introduction de cette souche bactérienne (naturellement présente chez les moustiques *Culex pipiens* et absente d'*Ae. albopictus*) empêche chez ce dernier la production de descendance viable lors de croisement entre des mâles infectés et des femelles non infectées. L'effet observé de l'IIT peut alors être comparé à celui du SIT.

1.4.2.4. La gestion environnementale

En complément des méthodes précédentes, diverses pratiques de gestion environnementale ont été préconisées par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) afin d'atténuer l'expansion du moustique tigre. Il s'agit de modifications (transformations physiques durables) ou de manipulations (transformations temporaires) environnementales ou encore de modifications de l'habitat et du comportement humains (réduction du contact entre l'homme et le moustique). Les deux premières méthodes sont directement destinées à détruire les gîtes larvaires préférentiels (pneus ou autres récipients à faibles contenances, Bambous, Broméliacées…). Elles peuvent également consister à vider régulièrement l'eau stagnante de ces gîtes ou les modifier pour éviter l'implantation du vecteur (ajout de sable dans les récipients). Il a été observé que l'efficacité de ces méthodes pouvait être améliorée si elles étaient associées à une sensibilisation du public concerné (Estrada-Franco and Craig, 1995).

2. La symbiose chez les insectes : conséquences écologiques et évolutives

2.1. Introduction

Les organismes supérieurs (végétaux et animaux) hébergent de nombreux microorganismes avec lesquels ils établissent des relations symbiotiques. La symbiose a été décrite par Anton de Bary (1879) comme la vie en communauté d'organismes systématiquement différents (*symbiosis* : du grec *sun* : avec, et *bios*: vie). Cette définition prend également en compte la taille des différents partenaires : l'organisme le plus petit est alors appelé le symbiote tandis que l'organisme le plus grand est appelé l'hôte. Cependant, la notion de taille reste un critère arbitraire et de nombreuses études ont démontré que le génome des symbiotes était souvent plus conséquent que celui de leur hôte. En effet, des études basées sur le métagénome humain ont permis d'estimer que les symbiotes associés à l'homme possédaient 150 fois plus de gènes que n'en contient le génome humain *per se* (Qin et al., 2010). Au delà des symbiotes, l'ensemble des microorganismes (bactéries, champignons, protistes, algues, virus…) associé à un hôte forme ce que l'on appelle le microbiote. Le microbiote serait fortement impliqué dans la biologie de l'hôte et son rôle aurait la même ampleur qu'un organe à part entière tel que le foie. Compte tenu de ces observations, il est essentiel d'adopter une vue intégrée de l'hôte en prenant en compte la nature des partenaires constituant son microbiote et leurs interactions qui forment un continuum allant du mutualisme au parasitisme. Ces interactions peuvent souvent s'avérer complexes à décrypter et peuvent parfois varier entre les mêmes partenaires (Tableau 1). Les études portées sur ces interactions symbiotiques ont donné naissance au concept de l'holobionte qui représente l'ensemble formé par un hôte et son microbiote (Rohwer et al., 2002). Une part du microbiote étant indissociable de l'hôte et souvent transmis entre générations, leur génome cumulé appelé hologénome peut alors être considéré comme une unité de sélection à part entière (Figure 12) (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008).

Au sein du règne animal, la classe des insectes (Insecta) présente la plus forte richesse estimée avec au moins 5 000 000 d'espèces différentes réparties à la surface de la terre (Gaston, 1991). Leur étude est également un enjeu majeur de par leur impact sur le fonctionnement des écosystèmes (e.g. décomposeurs de la matière organique), l'agriculture (e.g. ravageurs de culture, polinisateurs) ainsi que la santé humaine et animale (e.g. vecteurs de pathogènes). Les études basées sur les insectes et en particulier la drosophile ont permis de réaliser de nombreuses avancées significatives dans les domaines de la génétique et du développement ainsi que de l'immunité. C'est donc dans le contexte de l'holobionte que nous allons aborder notre étude bibliographique sur les insectes. Si les microorganismes eucaryotes ou encore les virus sont connus pour intervenir dans la biologie

des insectes, la plupart des travaux de la littérature font majoritairement état de l'implication des microorganismes procaryotes. C'est justement sur les bactéries que nous allons plus particulièrement porter notre attention au cours de ce chapitre bibliographique. Nous décrirons plus précisément les exemples majeurs qui ont permis de montrer l'implication du microbiote bactérien dans la biologie des insectes, ses facteurs de variations ainsi que les conséquences évolutives de ces interactions. Nous nous focaliserons par la suite sur le cas particulier des moustiques au travers d'une revue détaillant les différentes études sur la diversité du microbiote bactérien qui leur est associé suivi d'une partie consacrée à l'état des connaissances disponibles au commencement de ma thèse sur le microbiote bactérien d'*Ae. albopictus*.

Tableau 1. Les différentes catégories d'interactions symbiotiques

Interaction	Hôte	Symbiote
Parasitisme	-	+
Prédation	+	-
Amensalisme	-	0
Compétition	-	-
Neutralisme	0	0
Commensalisme	0	+
Mutualisme	+	+

Selon leur catégorie, les interactions peuvent avoir un effet bénéfique (+), délétère (-) ou neutre (0) sur l'un ou l'autre des partenaires.

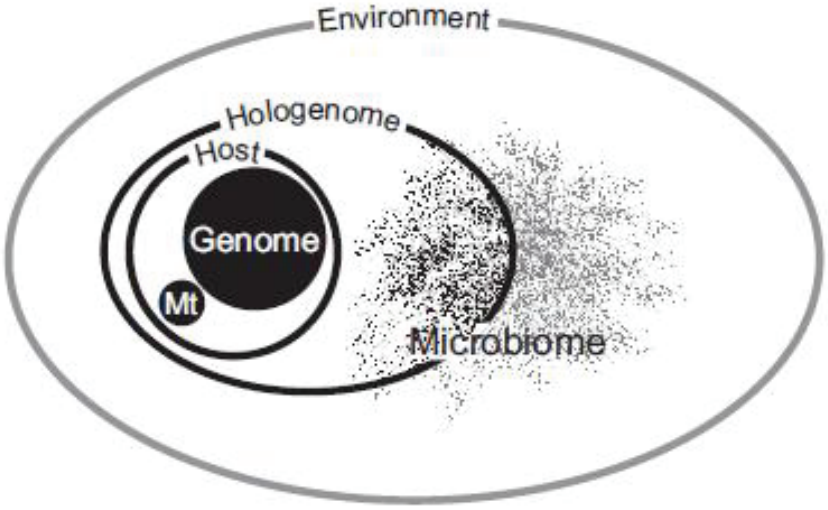


Figure 12. Diagramme simplifié de l'hologénome. Le concept de l'hologénome définit le microbiome ou une partie de celui-ci (génome du microbiote) (en noir) comme une extension des génomes nucléaire (Genome) et mitochondrial (Mt) de l'hôte influençant la valeur sélective de l'ensemble. Il existe, cependant, une certaine plasticité au sein du microbiome (en gris) (Brucker and Bordenstein, 2013).

2.2. Interactions symbiotiques bactéries-insectes

2.2.1. Symbiotes primaires et secondaires chez les insectes

Les études récentes classent les symbiotes mutualistes au sein de deux catégories distinctes : les symbiotes primaires et les symbiotes secondaires (Feldhaar, 2011). L'une des particularités des symbiotes primaires est l'interdépendance des deux partenaires résultant de leur interaction mutualiste (interaction à bénéfice réciproque). La perte de cette interaction étant délétère pour les deux partenaires, ces derniers sont donc constamment retrouvés en association. Les symbiotes primaires seraient par ailleurs essentiels à la reproduction et/ou la survie de plus de 10% des espèces d'insectes (Douglas, 1989). De nombreux exemples de symbiotes primaires ont été décrits chez les insectes, dont les bactéries *Buchnera aphidicola* chez les pucerons *Acyrthosiphon* spp., *Wigglesworthia glossinida* chez la mouche Tsetse *Glossina* spp. ou encore *Blochmania* chez les fourmis *Camponotus* spp. (Munson et al., 1991; Aksoy, 1995; Sauer et al., 2000). Pour maintenir et protéger leurs endosymbiotes primaires, les insectes ont sélectionné des cellules spécialisées appelées Bactériocytes (ou Mycétocytes). Ces cellules ont été identifiées pour la première fois par Blochmann lors d'une étude menée chez la Blatte en 1888 (Perru, 2007). A l'inverse des symbiotes primaires, les symbiotes secondaires sont dits facultatifs. Cela signifie qu'ils sont capables de survivre à

l'extérieur de leur hôte et/ou que leur hôte peut survivre en leur absence. Les symbiotes secondaires sont très diversifiés et les interactions qu'ils entretiennent avec leur hôte peuvent parfois être difficiles à interpréter. C'est pourquoi leur rôle dans la biologie des insectes reste très certainement sous-estimé. Cependant, certaines études ont pu démontrer le rôle fondamental joué par les symbiotes secondaires dans différents processus adaptatifs chez les insectes (Oliver et al., 2003; Russell and Moran, 2006; Kikuchi et al., 2012).

2.2.2. Implication des bactéries symbiotiques dans la nutrition des insectes

Les insectes présentent des modes de nutrition très variés. Selon leur régime alimentaire, on distinguera les phytophages qui se nourrissent du nectar des fleurs, de pollens, de bois, de grains, de fruits ou encore de feuilles, les nécrophages qui consomment les cadavres d'animaux, les insectivores qui se nourrissent d'autres insectes, les coprophages qui s'alimentent à partir d'excréments, les omnivores, qui consomment aussi bien de la matière organique végétale que de la matière organique animale et enfin, les hématophages qui se nourrissent de sang. Ces différents modes de nutrition peuvent être carencés, nécessiter un métabolisme spécifique ou encore être toxiques pour l'insecte. Pour pallier à ces effets délétères pouvant compromettre leur survie ou leur reproduction, de nombreuses espèces ont sélectionné des symbiotes impliqués dans l'approvisionnement de molécules essentielles, la dégradation de la matière organique ou encore la détoxification (Douglas, 2009). Cependant, les exemples relatifs dans la littérature sont largement biaisés en faveur des insectes phytophages.

Le métabolisme azoté qui est un élément essentiel à leur nutrition implique souvent l'intervention de microorganismes pour être fonctionnel. En effet, le régime alimentaire de certains insectes comporte de faibles teneurs en azote et les microorganismes vont palier à ce manque en assurant certaines fonctions clefs comme la dégradation de déchets azotés du métabolisme de l'insecte (acide urique) ou la synthèse de molécules essentielles à sa survie (acides aminés) (Douglas, 2009). En effet, il a été montré que la dégradation de l'acide urique faisait intervenir des bactéries et des champignons. Différents groupes bactériens seraient impliqués tels que les genres *Bacteroides* et *Citrobacter* chez les termites ou les proteobactéries telles que les bactéries endosymbiotiques *Blattabacterium cuenoti* chez les cafards (Mullins and Cochran, 1974; Potrikus and Breznak, 1981; Sabree et al., 2009). Certains hémiptères se nourrissent exclusivement de la sève des plantes qu'ils colonisent. Ce régime alimentaire, carencé en protéines, est compensé par l'apport d'acides aminés essentiels directement produits par leurs symbiotes tels que la bactérie *Buchnera aphidicola* chez le puceron vert du pois ou encore les bactéries *Baumannia cicadellinicola* et *Sulcia muelleri* chez la « mouche pisseuse » *Homalodisca vitripennis* (Akman Gunduz and

Douglas, 2009; McCutcheon et al., 2009). Enfin, la présence de bactéries fixatrices d'azotes a déjà été reportée au sein de nombreux insectes dont certaines espèces de termites et de coléoptères ou encore chez la mouche méditerranéenne du fruit *Ceratitis capitata* (Benemann, 1973; Potrikus and Breznak, 1977; Noda et al., 1999; Behar et al., 2005; Kuranouchi et al., 2006). Cependant, contrairement aux plantes légumineuses et non légumineuses chez lesquelles l'impact des bactéries symbiotiques fixatrices d'azote sur l'approvisionnement de molécules azotées assimilables a été très largement documenté, aucune démonstration formelle n'a permis de déterminer avec précision leur implication dans la physiologie des insectes (Douglas, 2009; Franche et al., 2009).

Chez les insectes hématophages stricts dont la nutrition est exclusivement composée de sang, les carences en vitamines du complexe B pourraient s'avérer néfastes au développement de l'insecte. Cependant, les faibles doses de vitamines requises pour leur métabolisme compliquent les recherches visant à démontrer l'implication des symbiotes dans ces processus (Douglas, 2009). Néanmoins, l'élimination de *Wigglesworthia glossinida* ou de *Wolbachia pipientis w*Cle respectivement chez la mouche tsé-tsé et la punaise de lits *Cimex lectularius* s'est traduite par une forte diminution des traits d'histoire de vie liés à la reproduction (fécondité, production d'une descendance viable). L'apport consécutif de sang supplémenté en vitamines B a par la suite permis de restaurer leur capacité reproductive (Nogge, 1976; Hosokawa et al., 2009). De plus, ces observations ont été corroborées par le fait que les génomes séquencés de ces deux symbiotes comportaient de nombreux gènes impliqués dans les voies de biosynthèse des vitamines B (Akman et al., 2002; Nikoh et al., 2014).

Certains insectes se nourrissent de lignocellulose (polymère de lignine, cellulose et hémicellulose) contenue dans la paroi des cellules végétales. Or, il a déjà été montré que les bactéries possédaient des enzymes capables de dégrader les chaines carbonées. La présence de telles bactéries chez les insectes phytophages ou xylophages pourraient ainsi leur apporter un avantage sélectif (Brune, 2014). La famille des *Termitidae* (ou termites) regroupe plus de 500 espèces différentes qui ont été particulièrement décrites pour leur capacité à dégrader le bois en association avec des microorganismes symbiotiques (Ni and Tokuda, 2013). Tous les termites possèdent leurs propres cellulases mais vont également bénéficier d'enzymes microbiennes. Ainsi, il a été montré que les « termites supérieurs » faisaient appel à une large diversité de cellulases ou hémicellulases d'origines fongiques mais également bactériennes (Warnecke et al., 2007; Lo and Eggleton, 2011; Ni and Tokuda, 2013).

2.2.3. Implication des bactéries symbiotiques dans la reproduction des insectes

De nombreux microorganismes symbiotiques ont mis en place des stratégies visant à manipuler la reproduction de leur hôte de manière à maximiser leur transmission transgénérationnelle. Les exemples connus concernent essentiellement des bactéries endosymbiotiques telles que *Wolbachia*, *Cardinium*, *Spiroplasma*, *Rickettsia* et *Arsenophonus* (Ferrari and Vavre, 2011). Ces différents microorganismes auraient un fort impact sur la structuration des populations d'insectes hôtes. *Wolbachia*, à elle seule, serait capable d'infecter entre 40% et 65% des espèces d'arthropodes terrestres (Werren et al., 2008; Zug and Hammerstein, 2012). Cependant, des études de prévalence réalisées chez 2052 individus répartis au sein de 136 espèces d'arthropodes ont réduit cette estimation à 22-32% d'espèces infectées par au moins un symbiote bactérien manipulateur de la reproduction (Duron et al., 2008). Ces bactéries manipulatrices de la reproduction agissent à travers différents mécanismes tels que l'incompatibilité cytoplasmique (incompatibilité de croisement entre mâles infectés et femelles non infectées ou infectées par un parasite incompatible), la féminisation (différenciation en femelle de mâle génétique), l'induction de la parthénogénèse (induction de reproduction asexuée) ou encore le « male killing » précoce (mort des mâles durant l'embryogénèse) (Engelstädter and Hurst, 2009). *Wolbachia pipientis* serait d'ailleurs la seule espèce bactérienne à ce jour capable d'induire l'ensemble de ces altérations de la reproduction au sein de ses hôtes (Tableau 2, Figure 8).

Ces processus vont avoir plusieurs effets sur les populations d'insectes (Ferrari and Vavre, 2011). La parthénogénèse va par exemple induire une réduction de la diversité génétique au sein des populations car en l'absence de brassage allélique induit par la reproduction sexuée, la sélection naturelle va s'opérer sur des individus « clonaux ». La féminisation ou le « male killing » vont pour leur part fortement impacter le sexe ratio. Cette réduction du nombre de mâles va se traduire par une diminution de la proportion de femelles fécondées et donc de la taille efficace de la population (nombre d'individus participant à la reproduction) (Engelstädter and Hurst, 2009; Ferrari and Vavre, 2011). Ce phénomène se traduit souvent par la fixation d'allèles délétères. Enfin, l'incompatibilité cytoplasmique a pour effet de limiter les possibilités de croisements entre individus et donc d'isoler sexuellement les populations infectées des populations non infectées (Laven, 1967; Breeuwer and Werren, 1990; Telschow et al., 2005; Koukou et al., 2006; Brucker and Bordenstein, 2013; Ritter et al., 2013). L'ensemble de ces processus souvent délétères à l'échelle des populations d'insectes hôtes est au contraire favorable à la transmission des symbiotes. Dans ce cas, l'interaction entre les deux partenaires est souvent qualifiée de parasitaire et on parle alors de symbiotes parasites de la reproduction. Cependant, certains exemples ont montré une évolution des interactions depuis le parasitisme sexuel vers le mutualisme. En effet, pour que le symbiote

se maintienne au sein des populations, sa transmission transgénérationnelle doit être optimale de même que le succès reproducteur de son hôte (Zug and Hammerstein, 2014). Par exemple, la bactérie *Wolbachia pipientis w*Ri a évolué en l'espace de 20 ans vers une interaction mutualiste en maximisant la production d'œufs de son hôte, la mouche du fruit *Drosophila simulans* (Weeks et al., 2007). Par ailleurs, chez la guêpe parasitoïde *Asobara tabida,* si les deux souches de *W. pipientis w*Atab1 et 2 sont considérées comme parasites de la reproduction et induisent un phénotype d'Incompatibilité cytoplasmique, la souche *w*Atab3 pour sa part est mutualiste et s'avère être essentielle à l'ovogénèse de son hôte (Dedeine et al., 2004). De plus, l'absence d'une telle dépendance au sein d'autres espèces du genre *Asobara* suggère une évolution récente de l'interaction (Dedeine et al., 2005). Enfin, des travaux récents réalisés chez d'autres modèles de guêpes parasitoïdes ont démontré une forte implication du microbiote bactérien (notamment les deux genres dominants *Proteus* et *Providencia*) dans l'isolement reproductif entre les deux espèces *Nasonia vitripennis* et *N. giraulti*. Les bactéries induiraient une stimulation du système immunitaire conduisant à la mélanisation des hybrides (Brucker and Bordenstein, 2013).

Tableau 2. Bactéries associées à la manipulation de la reproduction chez les insectes (modifié d'après Engelstädter and Hurst, 2009)

Microorganismes	Incompatibilité cytoplasmique	Féminisation	Induction de la Parthénogénèse	"Male killing" précoce
Wolbachia pipientis	X	X	X	X
Rickettsia			X	X
Cardinium bertigii	X	X	X	
Spiroplasma poulsonii				X
Spiroplasma ixodetis				X
Unnamed Flavobacteria				X
Arsenophonus				X

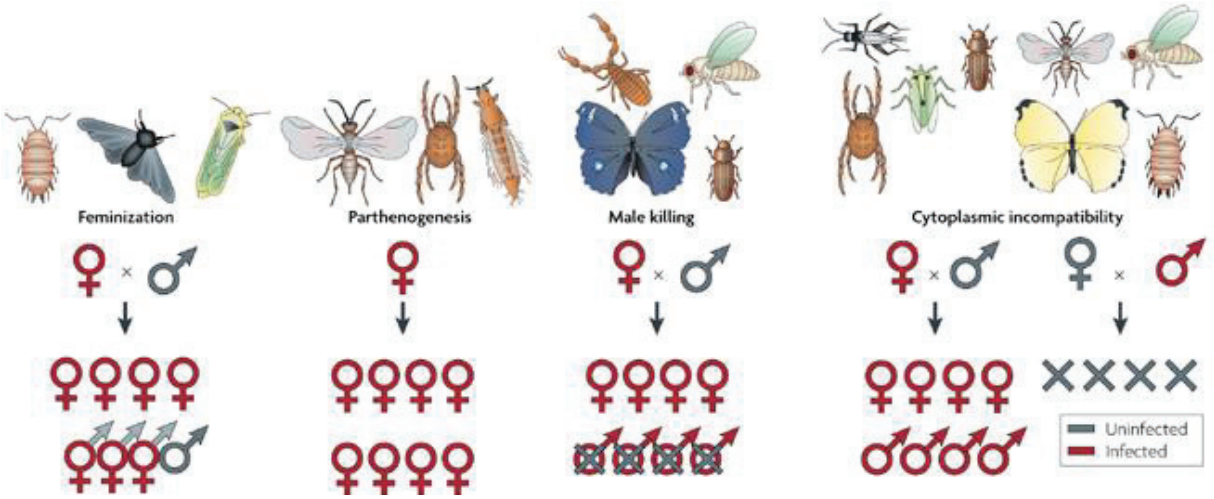


Figure 13. Différents phénotypes induits par *Wolbachia* chez les arthropodes. La féminisation induit un développement femelle chez des mâles génétiques. La parthénogénèse entraîne l'élimination des mâles dans les processus de reproduction. Le « Male killing » élimine les mâles infectés. L'incompatibilité cytoplasmique empêche les croisements féconds entre mâles infectés et femelles non infectées (modifié d'après Werren et al., 2008).

2.2.4. Implication des bactéries symbiotiques dans la résistance aux stress biotiques et abiotiques chez les insectes

Au sein de leurs écosystèmes, les insectes sont fréquemment confrontés à des conditions défavorables dont les conséquences sont très variables dans leur intensité. Outre les réponses adaptatives de l'insecte *per se*, des travaux récents ont montré l'existence d'interférence symbiotique dans les processus adaptatifs rapides des insectes, augmentant ainsi leur plasticité écologique.

Parmi les stress abiotiques, la température est un facteur majeur susceptible d'affecter les traits d'histoire de vie des insectes. Considérés comme des poïkilothermes (animaux dont la température corporelle est affectée par l'environnement), ils sont particulièrement sensibles aux changements brutaux de température. Par conséquent, l'élévation des températures peut directement avoir des effets délétères pour les interactions symbiotiques. Ainsi, il a été montré que le cortège symbiotique des œufs de la punaise *Nezara viridula* était fortement réduit (diminution de la proportion de symbiotes de plus de 91%) lorsque la température s'élevait de 20°C à 30°C (Prado et al., 2009). La perte significative de ces symbiotes induirait à son tour un effet délétère sur les traits d'histoire de vie de l'insecte après éclosion. De même, il a été observé que la densité de la bactérie *Buchnera,* symbiote du puceron du pois, décroissait de façon importante chez son hôte exposé à un choc thermique (4h à 39°C)

(Montllor et al., 2002). Or, comme évoqué précédemment (Chapitre 2.2.1.), ce symbiote primaire est essentiel pour l'approvisionnement de son hôte en acides aminés et impacte fortement leur valeur sélective. D'autre part, certaines études ont montré que les symbiotes secondaires *Serratia symbiotica* et *Hamiltonella defensa* assureraient un meilleur maintien de *Buchnera* au sein des bactériocytes et amélioreraient ainsi la survie du puceron lors des chocs thermiques (Montllor et al., 2002; Russell and Moran, 2006; Harmon et al., 2009). Ainsi, la pression de sélection exercée par les températures élevées expliquerait la très forte prévalence observée de *S. symbiotica* et *H. defensa* dans les pucerons que ce soit en été dans les zones tempérées ou tout au long de l'année en zones désertiques (Harmon et al., 2009). Un autre exemple révélateur chez le puceron concerne encore la bactérie *Buchnera* chez laquelle une mutation ponctuelle sur le promoteur du gène *ibpA* codant une protéine « Heat shock » entraine l'incapacité de l'insecte à produire une descendance viable après un choc thermique (Dunbar et al., 2007). Ces observations témoignent une fois de plus de l'étroite relation liant les symbiotes du puceron à sa capacité de résistance aux températures élevées. De même, chez l'aleurode *Bemisia tabaci* Biotype B, une induction constitutive des gènes de résistance aux stress thermiques a été observée chez des individus infectés par les bactéries du genre *Rickettsia* (Brumin et al., 2011). La présence des bactéries conférerait ainsi une meilleure tolérance des individus à des températures élevées (40°C) en comparaison aux individus non infectés. Chez les Glossines (Diptera : Glossinidae), insectes hématophages vecteurs, la bactérie *Wigglesworthia glossinidia* de la mouche tsé-tsé serait également impliquée dans leur résistance aux fortes températures. En effet, suite à un traitement d'antibiothérapie, les individus asymbiotiques présentent une forte mortalité lorsque la température augmente de 24°C à 27°C en comparaison des individus non traités (Pais et al., 2008).

Les symbiotes peuvent également conférer la résistance de leur hôte à des composés toxiques. Ainsi, certaines souches bactériennes appartenant au genre *Burkholderia* sont capables d'utiliser le fénitrothion, un insecticide couramment utilisé, comme source de carbone (Kikuchi et al., 2012). Ces bactéries, acquises de l'environnement par le ravageur de soja *Riptortus pedestris*, lui confèreraient ainsi une résistance à l'insecticide et lui permettraient de se maintenir dans des plantations indépendamment des traitements.

D'autre part, les insectes sont souvent soumis à des stress biotiques notamment par d'autres organismes parasites (microorganismes pathogènes ou insectes parasitoïdes). Certains exemples ont mis en avant l'interférence des symbiotes dans la résistance à ces stress soit en interférant directement avec les parasites, soit en prévenant leur apparition. Ainsi, le puceron du pois *Acyrthosiphon pisum* présente une forte résistance au champignon entomopathogène *Pandora neoaphidis* lorsqu'il héberge le symbiote secondaire *Regiella insecticola* (Scarborough et al., 2005). A ce jour, les mécanismes à l'origine de la mise en

place de cette résistance ne sont pas connus mais elle s'avère fondamentale pour le maintien des populations de pucerons, le champignon entrainant des dégâts considérables chez l'hôte par dispersion des spores. Ce puceron peut également être affecté par la guêpe parasitoïde *Aphidium ervi* dont la femelle pond un œuf à l'intérieur du corps de l'insecte (Oliver et al., 2003). Après éclosion, l'œuf donne naissance à une larve qui va dévorer le puceron de l'intérieur avant de former un cocon et d'émerger. Cependant, il a été montré que la seule présence du symbiote facultatif *Hamiltonella defensa* chez le puceron induirait une forte mortalité des larves du parasitoïde probablement due à la sécrétion de toxines (Oliver et al., 2003; Moran et al., 2005). Chez la mouche du fruit, *Drosophila melanogaster*, les virus à ARN FHV (Flock House Virus) et DCV (Drosophila C Virus) qui sont transmis horizontalement, sont capables de provoquer une forte mortalité des individus. Or, l'infection expérimentale des individus par certaines souches de *Wolbachia* entrainerait une diminution significative du nombre de copies du génome viral (de 100 à 1000 fois moins en 23 jours) accompagnée d'un taux de mortalité plus faible des mouches (Lauren M Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008; Chrostek et al., 2013). Par ailleurs, les symbiotes peuvent également présenter une activité prophylactique en contrôlant l'apparition de pathogènes. En effet, les fourmis champignonnières cultivent un « jardin de champignons » composé de *Lepiotaceae* et de *Pterulaceae.* En protégeant la croissance de champignons symbiotiques aux dépens de celle d'autres champignons grâce à la production d'antifongiques, les actinobactéries du genre *Pseudonocardia* sp., associées durablement à la cuticule des fourmis, assureraient la survie de leur hôte (Oh et al., 2009). Une interaction similaire a été mise en évidence entre des guêpes appartenant à des genres différents (*Philanthus*, *Trachypus* et *Philanthinus*) et des bactéries du genre *Streptomyces* (Kaltenpoth et al., 2005, 2010, 2014). Les bactéries principalement retrouvées sur les antennes de l'insecte les protégeraient contre d'éventuels entomopathogènes via la production d'antibiotiques. Cette interaction serait le fruit d'une longue coévolution datant du Crétacé et marquée par la co-diversification des guêpes et des bactéries (Kaltenpoth et al., 2014).

2.2.5. Interactions des bactéries symbiotiques avec le système immunitaire des insectes

Contrairement aux vertébrés, le système immunitaire des invertébrés ne bénéficie pas d'immunité acquise basée sur la production d'anticorps. Les voies impliquées sont essentiellement issues de l'immunité innée (revu par Welchman et al., 2009). La réponse immunitaire des insectes face aux bactéries peut se résumer par la reconnaissance spécifique d'un profil moléculaire associé aux microorganismes (MAMP - Microbial

Associated Molecular Pattern) via des récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR - Pathogen Recognition Receptor). Les MAMPs chez les bactéries étant le plus souvent des composants du peptidoglycane formant la paroi cellulaire, ils sont reconnus par des protéines de reconnaissance du peptidoglycane (PGRP – Peptidoglycan Recognition Protein). D'autres composants, notamment le lipopolysaccharide ou les acides lipotheïcoiques, peuvent également être reconnus comme MAMPs. Cette reconnaissance déclenche alors une cascade moléculaire et conduit à l'expression d'une réponse antibactérienne. Il existe plusieurs grandes voies impliquées dans cette réponse : la voie de transduction du signal Toll d'une part dont les PRR de type PGRP-SA reconnaissent essentiellement le peptidoglycane des bactéries Gram positif et les voies *Immune deficiency* (Imd) et *Jun kinase* (JNK) d'autre part dont les PRR de type PGRP-LC reconnaissent spécifiquement les bactéries à Gram négatif. De plus, les lésions produites par les bactéries sur les cellules ou les tissus pourront également induire une troisième voie de signalisation: la voie *Janus kinase – Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK-STAT). L'ensemble de ces voies activera les défenses cellulaires de l'insecte en déclenchant notamment la production de peptides antimicrobiens (AMP – Anti-Microbial Peptide), la phagocytose des pathogènes ou encore l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire. Enfin, d'autres voies supplémentaires peuvent être également déclenchées en réponse à la présence de bactéries pathogènes. En particulier, la cascade de la prophénol-oxidase conduit à la mélanisation (encapsulation et production de composés antimicrobiens) des bactéries après reconnaissance des PRR de bactéries Gram négatif (PGRP-LE) ou Gram positif (PGRP-SA). Les voies DUOX et NOX, quant à elles, induisent respectivement des stress oxydatif et nitrique (Figure 3).

Le système immunitaire de l'insecte est donc en interaction directe avec ses symbiotes bactériens. Généralement, la présence de symbiotes primaires et/ou secondaires chez l'insecte est le fruit d'une coévolution conduisant le plus souvent à des modifications du système immunitaire favorable à l'élimination de voies superflues. En effet, le maintien des symbiotes chez l'hôte ne doit pas s'accompagner d'une activation forte et permanente du système immunitaire qui serait alors défavorable à sa survie. C'est pourquoi, différentes stratégies ont été sélectionnées au cours de l'évolution. L'étude du génome du puceron du pois a ainsi révélé une importante réduction de son système immunitaire, en particulier l'absence de la voie Imd et de protéines PRR de type PGRP-LC (Gerardo et al., 2010). En parallèle, l'infection de cellules de drosophiles par le symbiote primaire du puceron du pois *Buchnera aphidicola* a montré que celui-ci était éliminé suite à une réponse immunitaire impliquant la voie Imd activée suite à une reconnaissance de la bactérie par les PGRP-LC (Douglas et al., 2011). L'absence des gènes impliqués dans cette voie chez le puceron faciliterait donc l'implantation de son symbiote. Chez d'autres insectes, le système

immunitaire peut directement être impliqué dans le maintien des symbiotes. Par exemple, chez la mouche tsé-tsé, la bactérie *Wigglesworthia glossinida* est reconnue spécifiquement par la protéine PGRP-LB dont l'expression est particulièrement forte dans le bactériome (organe contenant les bactériocytes) (Wang et al., 2009). Lorsque l'expression de *pgrp-lb* est réduite par ARN interférence, la voie Imd est déclenchée et induit la synthèse d'AMPs (Wang et al., 2009). Ces mécanismes ont pour effet de réduire la densité de *W. glossinida* qui pourra être ensuite restaurée par l'inhibition de la voie Imd. La bactérie *Sodalis glossinidus*, symbiote secondaire de la mouche tsé-tsé, présente quant à elle, une modification du lipide A (composant du lipopolysaccharide ancrée dans la paroi bactérienne) lui conférant une résistance aux peptides antimicrobiens (Pontes et al., 2011). Cette modification lui permet d'échapper au système immunitaire et d'être maintenue chez son hôte. Un autre exemple concerne les charançons du genre *Sitophilus* dont les bactériocytes sont infectés par « *Sitophilus primary endosymbiont* » (SPE), un endosymbiote primaire appartenant à la classe des Gamma-Proteobacteries (Heddi et al., 1998; Charles et al., 2001). Ces cellules spécialisées dans la symbiose produisent de manière constitutive un AMP: la *Coleoptéricine A* (*ColA*) (Anselme et al., 2008). *ColA* est exprimée à des doses bactériostatiques permettant ainsi de réguler la population symbiotique au sein des bactériocytes notamment en inhibant la division cellulaire de SPE (Login et al., 2011; Login and Heddi, 2013). Enfin, il a été montré que certaines bactéries étaient capables de déclencher chez leur hôte un effet «priming» (Chambers and Schneider, 2012). Cet effet est généralement décrit comme une forte activation du système immunitaire lors du second contact avec un pathogène. Il peut également être induit par des bactéries mutualistes (symbiotes primaires ou secondaires) et commensales qui entraineront une réponse forte du système immunitaire lors de contacts avec des microorganismes pathogènes. L'exemple le mieux documenté de « priming » est la résistance au parasite *Plasmodium falciparum* chez le moustique *Anopheles gambiae* due à l'induction de la différenciation des hémocytes par des bactéries commensales (Rodrigues et al., 2010). Cependant, d'autres exemples chez les lépidoptères, notamment le Sphinx du tabac *Manduca sexta* et le légionnaire de la betterave *Spodoptera exigua* témoignent également d'un effet de « priming » conférant une résistance intergénérationnelle des individus vis-à-vis de leurs pathogènes via une surexpression des activités lytiques de l'hôte (AMP, Lyzozyme…) (Hernández-Martínez et al., 2010; Trauer and Hilker, 2013).

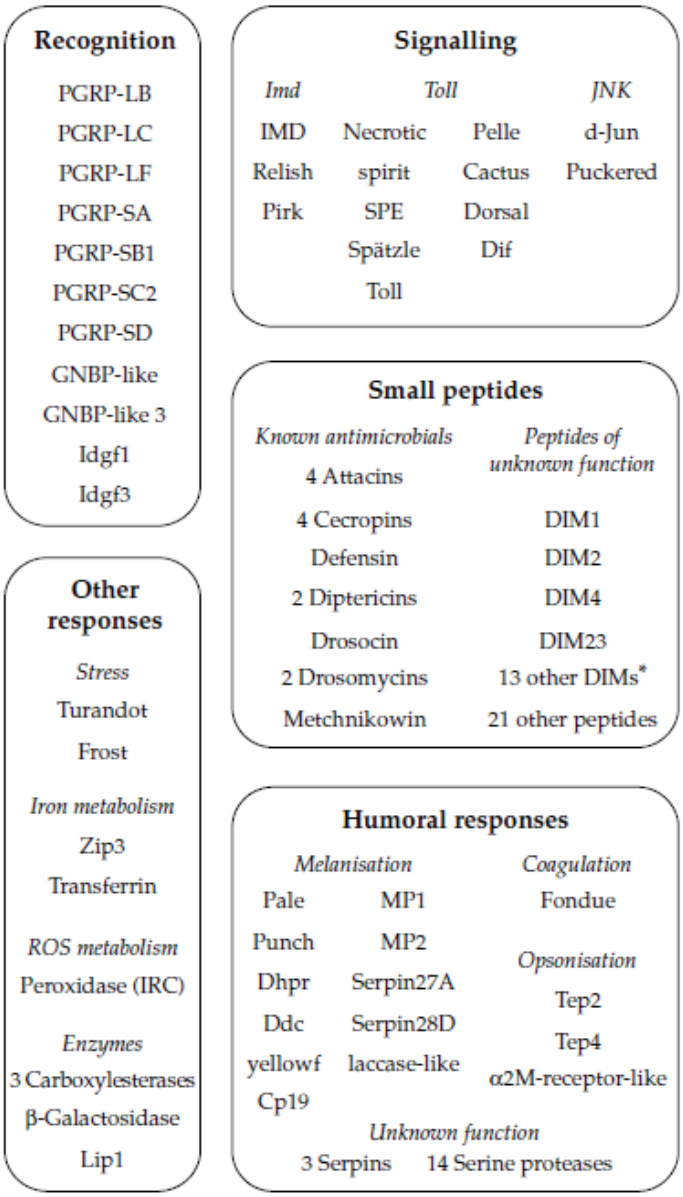


Figure 14. Gènes régulés par le système immunitaire chez la drosophile. Les gènes sont régulés à la suite d'une septicémie induite par un mélange de bactéries Gram-positif, Gram-négatif et de champignons (modifié d'après Rolff et al., 2009).

2.3. Diversité et fonction du microbiote bactérien chez l'holobionte moustique

2.3.1. Introduction

Les moustiques (Diptera : *Culicidae*) ont la particularité de présenter une écologie complexe et diversifiée de par la nature de leur régime alimentaire (hématophagie et phytophagie chez les femelles, phytophagie stricte chez les mâles) et leur cycle de vie (phase immature aquatique et phase adulte aérienne) [chapitre 1]. L'étude des interactions entre les moustiques et leurs symbiotes représente donc un enjeu complexe du fait de l'intervention de nombreuses variables biotiques et abiotiques. Les moustiques étant les principaux vecteurs de pathogènes humains et animaux, une meilleure description de la biologie de ces interactions est un gage essentiel à la compréhension du fonctionnement du pathosystème vectoriel.

2.3.2. Publication n°1 : « Diversity and function of the bacterial microbiota in the mosquito holobiont »

La revue bibliographique décrit l'état des connaissances sur le microbiote bactérien associé aux moustiques. En effet, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à décrire les communautés bactériennes des moustiques en fonction des facteurs majeurs qui les structurent tels que (i) l'espèce hôte, (ii) l'organe considéré, (iii) le sexe du moustique, (iv) le stade de développement, et (v) l'écologie. Nous nous sommes ensuite attachés à décrire l'implication du microbiote bactérien dans la biologie et la physiologie des moustiques avec des exemples plus particuliers sur (i) la nutrition et (ii) la reproduction. Nous avons ensuite développé les différentes approches d'utilisation de la microflore bactérienne dans un contexte de lutte anti-vectorielle. Les applications les plus abouties ont concerné l'utilisation de (i) l'incompatibilité cytoplasmique, (ii) la paratransgénèse, (iii) les modifications de la compétence ou encore (iv) les bactéries productrices d'antibiotiques. Cette revue nous a par ailleurs permis de souligner les lacunes associées à l'étude du microbiote bactérien des moustiques et d'ouvrir par conséquent certaines perspectives.

Ces travaux de revue ont été publiés en 2013 dans le journal ***Parasites & Vectors*** - volume 6 issue 146.

Minard *et al. Parasites & Vectors* 2013, **6**:146
http://www.parasitesandvectors.com/content/6/1/146

Parasites & Vectors

REVIEW Open Access

Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont

Guillaume Minard, Patrick Mavingui* and Claire Valiente Moro*

Abstract

Mosquitoes (Diptera: Culicidae) have been shown to host diverse bacterial communities that vary depending on the sex of the mosquito, the developmental stage, and ecological factors. Some studies have suggested a potential role of microbiota in the nutritional, developmental and reproductive biology of mosquitoes. Here, we present a review of the diversity and functions of mosquito-associated bacteria across multiple variation factors, emphasizing recent findings. Mosquito microbiota is considered in the context of possible extended phenotypes conferred on the insect hosts that allow niche diversification and rapid adaptive evolution in other insects. These kinds of observations have prompted the recent development of new mosquito control methods based on the use of symbiotically-modified mosquitoes to interfere with pathogen transmission or reduce the host life span and reproduction. New opportunities for exploiting bacterial function for vector control are highlighted.

Keywords: Mosquito, Microbiome, Symbiont, Extended phenotype, Bacterial community

Introduction

Sustained relationships between prokaryotes and eukaryotes are known to be an important factor in the evolution and speciation of the interacting partners [1]. The classic example of this evolutionary process is the mitochondrion, an organelle essential for cell metabolism in eukaryotes that derives from a bacterial ancestor [2]. Another example is summed up in the coral probiotic hypothesis proposed by Reshef *et al.* (2006) which posits that corals can adapt to their environment by changing their symbiotic bacteria [3]. The symbiotic relationships between microbiota, whether algae, archaebacteria, eubacteria, protozoa or viruses, and their invertebrate host were shown to contribute to the acquisition of resistance to pathogens or tolerance to abiotic stresses [3,4]. Rosenberg *et al.* (2007) recently proposed the hologenome theory to explain such interactions between higher organisms and microbiota [5]. The hologenome theory is based on the concept that higher organisms are not dissociable from their microbial partners, and so together form a unit of selection in which genes from the interacting partners are pooled for the global function of the holobiont [6].

* Correspondence: patrick.mavingui@univ-lyon1.fr; claire.valiente-moro@univ-lyon1.fr
UMR CNRS 5557, USC INRA 1364, VetAgro Sup, Ecologie Microbienne, FR41 BioEnvironment and Health, Université de Lyon 1, Villeurbanne F-69622, France

There are numerous examples of microbes influencing so-called extended phenotypes of different taxa, particularly insects which establish association with microbial communities ranging from parasitism to mutualism [7,8]. Bacterial endosymbionts are now known to play roles in many key insect functions such as nutrition, reproduction, development or protection against enemies [8]. For example, the facultative bacterium *Hamiltonella defensa* makes phytophagous aphids more resistant to parasitic wasps [9], whereas the primary symbiont *Buchnera aphidicola* provides essential amino acids [10]. The bacterium *Wigglesworthia glossinidi* is thought to provide vitamins to the hematophagous tsetse fly, an important vector of African trypanosomiasis or sleeping sickness, and benefits in return from carbon sources and protection from the insect host [11,12].

Mosquitoes, the *Culicidae* family, number more than 3,500 different species with a worldwide distribution [13]. Most species described are in the genera *Aedes*, *Anopheles* and *Culex* including several blood feeding members able to transmit pathogens to humans and animals, a great concern for public health [14]. *Anopheles* mostly transmit parasites such as *Plasmodium*, whereas *Aedes* and *Culex* are responsible for the transmission of arboviruses including Dengue (Flavivirus), Chikungunya (Alphavirus) or Japanese Encephalitis viruses, and filariases such as

BioMed Central

© 2013 Minard et al.; licensee BioMed Central Ltd. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (http://creativecommons.org/licenses/by/2.0), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Wuchereria bancrofti or *Onchocerca volvulus*. Despite intensive efforts, many mosquito-borne diseases (MBD) are increasing worldwide, partly due to the lack of effective vaccines against etiological agents, but also due to global changes in human activities, especially international travel and trade, that have expanded the distribution of mosquito species previously confined to particular regions. To face these outbreaks, new control strategies based on manipulation of the mosquito hosts and their microbial partners have been proposed recently [15]. A well-known example of this in action is the use of the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* [16,17]. This bacterium has a direct impact on the development of some mosquito species by shortening the insect life span, and has indirect effects interfering with pathogen replication and dissemination that affect the vector transmission ability [18,19].

Other than *Wolbachia*, the interactions between mosquitoes and their associated microbiota have yet to be investigated in depth. Most of the published studies describe bacterial diversity and how it varies according to particular factors. Nevertheless, a common conclusion is that a more comprehensive analysis of symbiotic mosquito interactions is needed at evolutionary and functional levels. Better knowledge of the biological impacts will enable the development of efficient biocontrol approaches for MBD. The present work provides an overview of the diversity of symbiotic bacteria and potential functions in the biology of mosquitoes, and highlights the current and future applications in symbiont-based mosquito control strategies.

Review

I-Bacterial diversity and variation in mosquitoes

Complementary approaches are needed for in-depth analyses of microbial communities in complex ecosystems. Both culture-dependent and culture-independent techniques have been used to explore mosquito microbiota. Some microflora can be cultured by using various isolation procedures and media so that bacterial taxa can be identified [20-31] (for details see Additional file 1). The main difficulty of the culture-dependent approach is in recreating the complex physicochemical environment of the insect body [32]. To overcome this limitation and more thoroughly identify bacteria hosted by mosquito populations, culture-independent methods such as Denaturating Gradient Gel Electrophoresis fingerprints, taxonomic microarrays, and meta-taxogenomics can be used (Additional file 1). For example, such molecular approaches, mainly based on analyzing the sequence of the 16S ribosomal RNA gene (*rrs*), have repeatedly shown the dominance of phylum Proteobacteria in mosquitoes [22-24,28,33-35]. Some bacterial taxa are often underrepresented in results of these global methods, but primers targeting a particular region of *rrs* or other housekeeping genes can be designed to specifically test for their prevalence in mosquitoes [28,36,37]. While these methods are partially successful, they do not give complete overviews of the mosquito-associated bacterial populations. High-throughput sequencing methods are now being implemented to reveal the previously underestimated microbial diversity, and how certain factors impact the composition and structure of these bacterial populations during the life cycle of mosquitoes [33-35]. Microbial communities may be influenced by host intrinsic factors (species, developmental stage, tissue tropism and genetics), the dynamics of intra- and inter-specific interactions and environmental factors.

Host species

Each mosquito genus has its own preferred habitat and ecological preference. Mosquitoes exhibit particular rhythmic behavioral patterns during their life cycle. For instance, the majority of *Anopheles* and *Culex* species are nighttime biters, whereas some *Aedes* also bite in the daytime. *Anopheles* mostly live in clear water exposed to sunlight whereas *Culex* and *Aedes* are mostly found in dark or troubled water containing a lot of organic matter [38]. In *Culicoides* midges within the same infra order of *Culicidae*, it has been demonstrated that the host species could explain 17% of the variability observed among their bacterial diversity [39]. Surprisingly, there has been no exhaustive comparative study of bacterial diversity across different mosquito species. However, it is possible to compare some surveys and compile the information to highlight specific associations. For instance, when the bacterial content of field populations of adult females of *Anopheles stephensi*, *Anopheles gambiae*, *Aedes aegypti*, *Aedes triseriatus* and *Culex quinquefasciatus* was screened with comparable molecular techniques, it emerged that Proteobacteria was the dominant phylum (Figure 1); notably *Gammaproteobacteria* class representing 41% (for *Cx. quinquefasciatus*) to 86% (for *An. stephensi*) of the total sequences analyzed, while *An. gambiae* hosted mainly *Alphaproteobacteria* and *Betaproteobacteria* classes, possibly because the mosquito specimens were collected at the larval stage and emerged under laboratory conditions [22,24,25,34]. Differences in the proportions of Firmicutes were observed as they account for 13% of sequences analyzed in *Cx. quinquefasciatus*, only 1% in *An. stephensi* and were not detected at all in *Ae. aegypti*. Despite these variations, the core bacterial genome present in mosquitoes seems to be similar in different species. Some genera such as *Pantoea*, *Acinetobacter* or *Asaia* are very prevalent in mosquitoes and capable of cross-colonizing different species [30,40,41].

Localization in insect host

Bacteria colonize different organs in mosquitoes, mainly the midgut and to a lesser extent salivary glands and

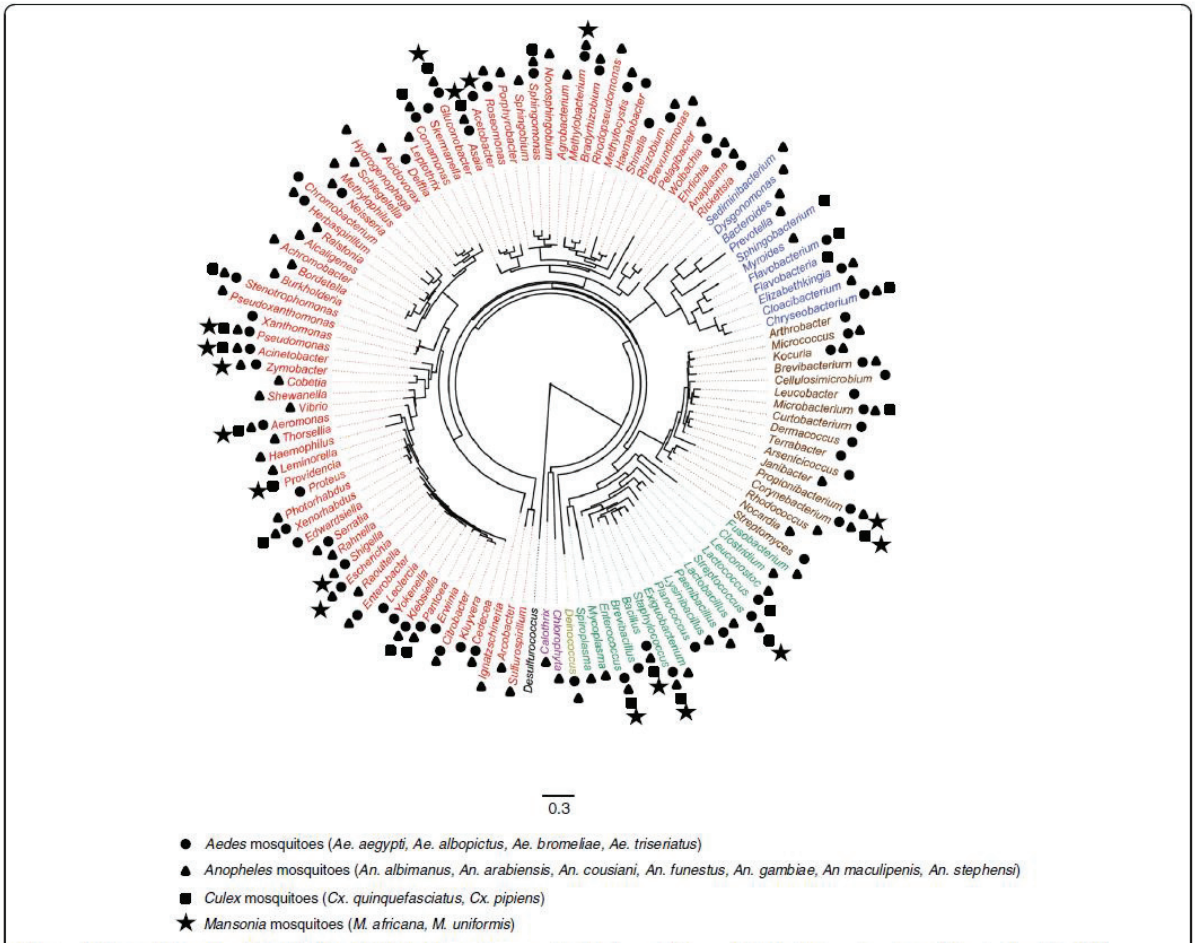


Figure 1 Bacterial genera identified in *Culicidae*. Bacteria were classified according to their phyla based on branching in the 16S rRNA sequence phylogenetic tree with names shown in color as follows: Proteobacteria (red), Bacteroidetes (blue), Actinobacteria (brown), [Firmicutes, Tenericutes and Fusobacteria] (green), Cyanobacteria (purple) and Deinococcus-Thermus (yellow). The maximum-likelihood tree was built with an HKY model using 100 bootstraps. A 16S rRNA sequence from *Desulfurococcus* (Archaebacteria) was used as the tree outgroup.

reproductive organs [22,24,25,28,42,43]. As in most animal models, the insect gut is a key organ for nutrition and is now considered as being immune-competent [24,32]. The gut is an interface with the external environment and provides resources and space that may be favorable to the multiplication of microorganisms ingested [32]. Active gut bacteria contribute to mosquito digestion through the release of lytic enzymes [44]. In some insect species such as aphids, beetles or cockroaches, specialized structures have evolved for microbial endosymbiosis called bacteriocytes or mycetocytes, which are known to be involved in functions including nutrition and immunity [10,45,46]. None of these structures has been described in mosquitoes. Insect salivary glands, ovaries and hemolymph are also known to be key organs for virus or parasite replication, but surprisingly the bacterial content of these organs in mosquitoes has not been fully characterized. Nevertheless, these organs were specifically screened for some bacterial endosymbionts. For example, the bacterium *Asaia* was detected in salivary glands and reproductive systems of different mosquitoes including *Ae. aegypti*, *An. gambiae* and *An. stephensi* [36,40,47]. The endosymbiont *Wolbachia* was also detected in the head, muscles, Malpighian tubules, ovaries and testes of *Culex pipiens* and *Aedes albopictus* [48,49]. Strikingly, *Wolbachia* was also found in *Ae. albopictus* hemolymph, a fluid which is generally assumed to be bacteria-free [48]. If multiple cell tropisms occur for bacterial partners that are almost fixed in the host population, it is not unreasonable to envisage that a physiological role is yet to be discovered.

Sex of mosquito

The sex of the mosquito is also an important factor that affects bacterial microbiota composition. Male and female

mosquitoes exhibit different ecological behaviors in terms of nutritional and dispersal capabilities. Both sexes feed on nectar and plant saps and are able to hydrolyze sucrose, but females are also hematophagous. Indeed, female mosquitoes are anautogenous as they require blood for the completion of their reproductive cycles [50]. In the mosquito digestion process, different hydrolases are released into the anterior and posterior midgut, which constitutes a selective pressure for resident bacteria [51]. Consequently, the composition and distribution of ingested nutrients themselves may also be a constraint for bacterial communities. For instance, a high concentration of carbohydrates and an acidic pH (from 5.2 to 6.5) occurring in the diverticulum structure are selective for certain bacterial taxa [52,53]. Blood digestion in females is also favored by the selection of bacteria for their hemolytic ability [25,44]. Moreover, after a mosquito ingests a blood meal a temperature burst occurs and oxidative stress and immune responses are down regulated, which leads to an increase in the bacterial load [43,54,55].

As mosquito-associated bacteria rely on some of the nutrients brought in the insect meal for growth, the nutrient composition of food sources may directly impact the diversity of bacteria present [24,33]. Zouache *et al.* (2011) showed that around half of the bacterial diversity in field populations of *Ae. albopictus* was explained by the sex of the mosquito with greater diversity observed in females [28]. The effect of the sex of the mosquito on bacterial diversity was also reported in field populations of the malaria vector *An. stephensi*; bacteria from genera *Bacillus* and *Staphylococcus* were detected in males, whereas bacteria from genera *Cryseobacterium, Pseudomonas* and *Serratia* were present exclusively in females [24]. Considering all published data on mosquito-associated bacteria, it appears that the midgut of females is mostly colonized by members of the *Gammaproteobacteria*, as is found in other blood-feeding insects. Interestingly, the genera *Pseudomonas, Serratia* and *Enterobacter* are frequently associated with females of several mosquito species [20-24,26,27,29,30,53]. In contrast, the midgut of males is dominated by bacteria from the phylum Firmicutes including those from *Staphylococcus, Bacillus, Paenibacillus* and *Micrococcus* genera (Figure 2) [24]. Finally, it was also shown that diet, whether sugar or blood meals, significantly affects the bacterial population structure. Wang *et al.* (2011) demonstrated that blood meals drastically reduced the community diversity in

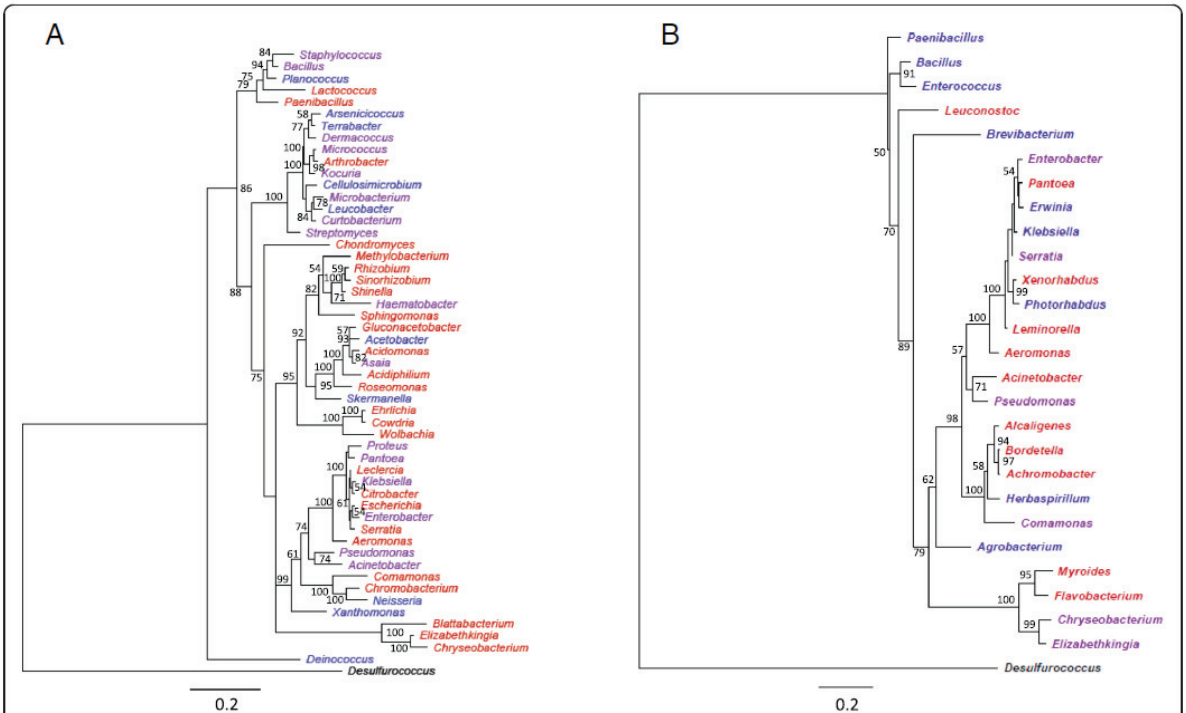


Figure 2 Phylogenetic dendrograms of bacteria identified in mosquito adults. Bacterial genera are classified according to mosquito sex of Ae. albopictus (**A**) and An. stephensi (**B**). Names of bacteria identified only in males (blue), only in females (red) or in both males and females (purple) are given. The tree was constructed using the maximum likelihood method with HKY model using 100 bootstraps. Bootstrap values (60% or above) are shown at branch points. *Desulfurococcus* (Archaebacteria) was used as the outgroup.

favor of enteric bacteria in the *An. gambiae* midgut, while few changes were observed following sugar meals [33]. However, irrespective of the type of meal after 4 days the bacterial microflora reestablishes itself being dominated by the genus *Elizabethkingia*. Finally, male mosquitoes disperse less than females and tend to remain close to breeding sites which could be an additional factor constraining bacterial diversity [50].

Stages of mosquito development

Mosquitoes are holometabola that undergo four gradual stages of metamorphosis - egg, larvae, nymph, and adult - that are intimately connected to their respective biotopes. Eggs, larvae and nymphs are aquatic, whereas adult mosquitoes live in terrestrial environments. The fraction of mosquito-associated microflora that is acquired from the surrounding environment is thus likely to differ during the insect life cycle. At the larval stage, individuals consume bacteria and plankton as nutritive resources. This allows a first stage of bacterial colonization that adds to any inherited bacterial flora. Some of these bacteria such as members of the genus *Wolbachia* are vertically acquired transovarially in *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* or *Ae. albopictus*. Venereal transmission of the bacterium *Asaia* was reported in *An. gambiae* and *An. stephensi* [47,56,57]. The midgut of mosquito larvae also contains many photosynthetic cyanobacteria acquired from breeding sites which are not found in adults [58,59]. Wang *et al.* (2011) showed that in the larval and pupal stages, cyanobacteria were very abundant accounting for 40% of an entire microbial community in *An. gambiae* [33]. During its metamorphosis, the mosquito anatomy is radically modified. In particular, a first meconial peritrophic matrix or membrane (MPM1) is formed early in the pupal stadium and a second (MPM2) emerged sometimes around the time of adult emergence [60]. A recent study suggests that MPMs contribute to the sterilization of the adult midgut by sequestering microorganisms ingested during the larval stage, which, along with remaining meconial material, are egested after adult emergence [60,61]. This phenomenon could explain why the proportions of different bacterial classes or phyla alter drastically between immature and adult stages. For example, it was shown that the number of bacterial operational taxonomic units (OTU) was 3 fold higher in larvae and pupae than in imagos of *An. gambiae* [33]. To date, comparative studies of bacterial composition between stages have only been done in *Anopheles* mosquitoes, in which transtadial maintenance of some bacterial genera such as *Acinetobacter*, *Bacillus*, *Enterobacter*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Chryseobacterium* and *Serratia* sp. has been observed (Figure 3) [24,26,27,33]. Other mosquito genera should be studied in the same way.

Ecology

Studies of mosquito-associated bacteria often compare the bacterial communities found in field and lab populations. However, results from lab-reared mosquitoes have revealed the limits of such an approach. By cloning and analyzing signature sequences, Rani *et al.* (2009) demonstrated that the bacterial diversity of midgut microflora in lab-reared *An. stephensi* was less than in field-caught ones, both for males (15 versus 27 bacterial taxa) and females (7 versus 36 bacterial taxa) [24]. Similarly, in *An. gambiae* 45 distinct OTU were identified in lab-reared mosquitoes compared to 155 in field-caught ones using a pyrosequencing approach [34]. Another study of *An. gambiae* also demonstrated that taxa richness in field-caught mosquitoes was higher than in lab-reared ones for any stage and nutritional condition [33]. Bacterial taxa richness in field-caught mosquitoes shows the extent to which bacteria are acquired from the habitat. Environmental factors should be considered as important drivers impacting the load and composition of bacteria in mosquitoes.

As previously discussed, *Culicidae* usually live in highly contrasting environments where biotic (like competition or the food chain) and abiotic (like temperature or humidity) factors can influence their microbiota [38]. The complexity of such ecosystems partly explains some of the conclusions drawn from the few existing studies of the role of environmental factors in modulating bacterial composition in field populations of mosquitoes [24]. Currently, the proportion of bacterial species acquired from the environment is unknown [32]. Each mosquito species has ecological preferences that could determine its bacterial content. For instance, some of the adult microflora is acquired from water during mosquito emergence [23]. Plant and animal hosts are a major source of bacterial acquisition through feeding so have a direct impact on the bacterial colonization of mosquitoes [33]. In *Culicoides sonorensis*, biting midges which transmit viruses to animals, the bacterial flora is derived from soil, plant, bovine and ovine sources [39]. The bacterium *Acinetobacter* was shown to be frequently associated with different mosquito species, including *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. triseriatus*, *An. stephensi*, *Cx. pipiens*, *Cx. quinquefasciatus* and *Psorophora columbiae*. Interestingly, this bacterium was also found in mosquito larval breeding sites and in various imago food sources such as vertebrates or plants [20,22,24,28,29,37,62,63]. In a similar way the genera *Asaia* and *Pantoea*, whose natural habitat is the nectar of tropical flowers, were also observed in mosquitoes [41,64,65]. Therefore, the environment may strongly affect the composition of mosquito-associated bacteria. We confirmed this recently by showing that *Ae. albopictus* individuals from urban areas of Madagascar with bush and fruit tree cover differed from those from suburban areas with bamboo cover [28]. We also demonstrated that the

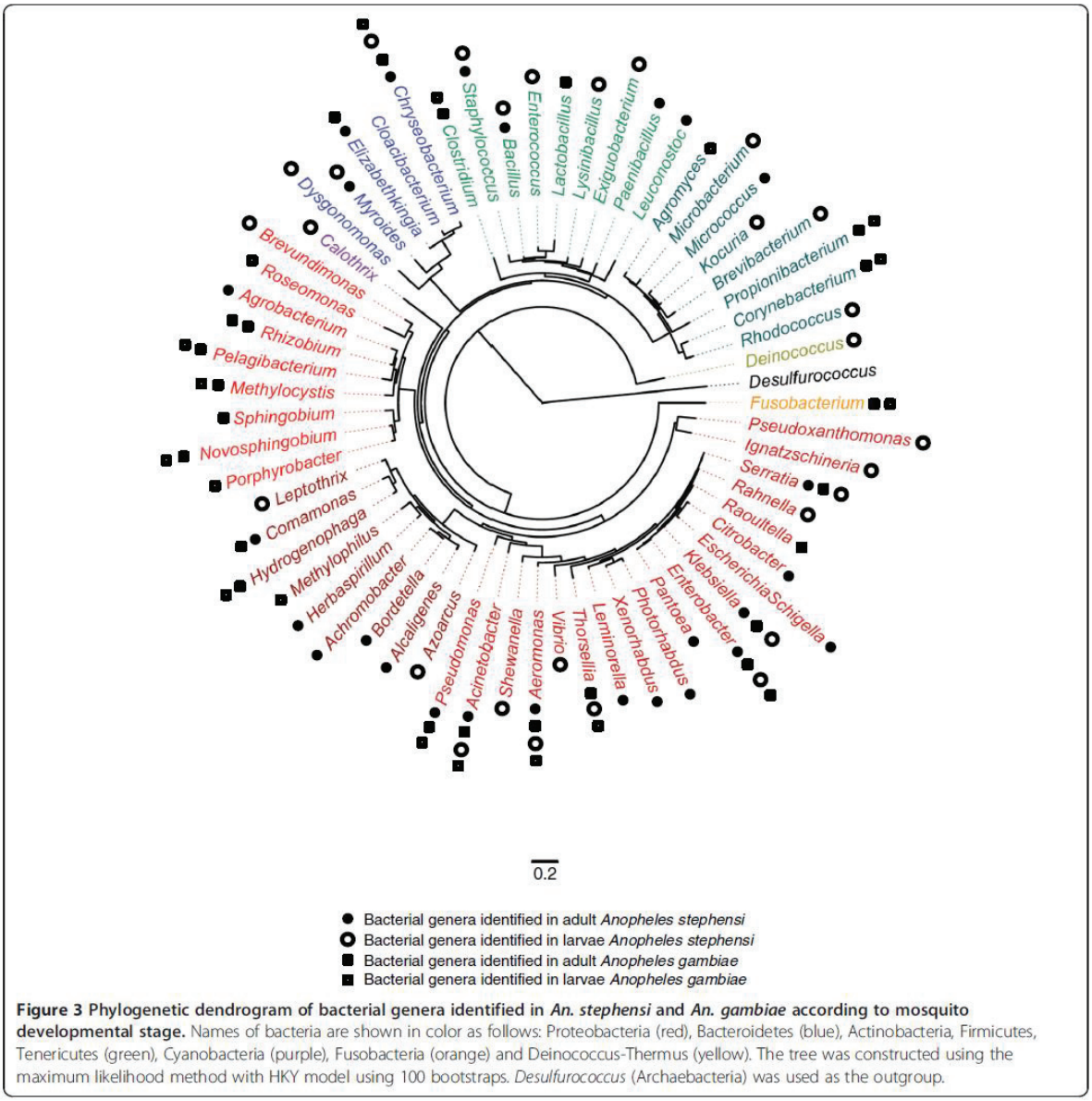


Figure 3 Phylogenetic dendrogram of bacterial genera identified in *An. stephensi* and *An. gambiae* according to mosquito developmental stage. Names of bacteria are shown in color as follows: Proteobacteria (red), Bacteroidetes (blue), Actinobacteria, Firmicutes, Tenericutes (green), Cyanobacteria (purple), Fusobacteria (orange) and Deinococcus-Thermus (yellow). The tree was constructed using the maximum likelihood method with HKY model using 100 bootstraps. *Desulfurococcus* (Archaebacteria) was used as the outgroup.

prevalence of *Asaia* in *Ae. albopictus* was significantly correlated with the ecological characteristics of sampling sites [37]. Generally, these observations support the idea that field studies are necessary to get an integrated view of mosquito-associated microbiota. However, studies of lab-reared mosquitoes may be a more convenient alternative to evaluate the impact of abiotic factors on the structure and composition of bacterial communities. For example, Wang and coworkers demonstrated that the main bacterial families *Enterobacteriaceae*, *Flavobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae* found in lab-reared *An. gambiae* were also identified in field-caught individuals from Kenya [33].

Interactions between microbial communities

Bacterial interactions are important regulators of ecosystem characteristics and species density. These interactions are ranged along the mutualism to parasitism continuum and structure communities [66]. One interesting example is the human gastrointestinal tract. The gut is naturally protected by a heterogeneous bacterial biofilm, a community of microorganisms living inside an adhesive matrix that forms a mutual structure. Pathogen colonization directly alters (dysbiosis) the biofilm structure [67]. Some recent studies focused on the positive and negative interactions between bacteria inside insect

hosts. Terenius *et al.* (2012) tested bacterial interspecies competition with isolates from *Ae. aegypti* and showed that *Serratia marcescens* could create an inhibition zone area on *Sphingomonas* and members of the family *Burkholderiaceae* [30]. The authors suggested a potential link between the presence of *S. marcescens* and the low bacterial diversity observed in the mosquito midgut. Competitive colonization was previously reported in the desert locust *Schistocerca gregaria* where bacterial diversity was shown to increase in the absence of *S. marcescens* [68]. Recently, we found a statistically convincing association between the bacteria *Asaia* and *Acinetobacter* in *Ae. albopictus* [37]. Even though additional analyses are still needed to better understand the degree of interactions between the two genera, we showed that bacterial interaction seems to be synergistic because more *Asaia-Acinetobacter* double-infections were observed than would be expected if the bacteria acted independently.

Bacterial symbionts associated with mosquito vectors have recently been found to interact with pathogens they transmit, modifying the outcome of the multipartite interactions. For instance, it was shown that removing bacterial communities from *Anopheles gambiae* increased its susceptibility to *Plasmodium falciparum* infection [69]. On the contrary, Boissière *et al.* (2012) demonstrated that the presence of some bacteria could favor parasite infection, as they found a positive correlation between the abundance of members of the *Enterobacteriaceae* family in the mosquito midgut and the *Plasmodium* infection status [34]. Conversely, Zouache *et al.* (2012) demonstrated that chikungunya virus infection could modify the diversity of symbiotic bacteria in *Ae. albopictus* [34,70]. Indeed, taxonomic microarray and quantitative PCR analyses showed that the abundance of *Enterobacteriaceae* increased with Chikungunya virus infection, whereas the abundance of some other bacterial genera such as *Wolbachia* and *Blattabacterium* decreased [70]. All these results suggest that complex microbial interactions (direct or indirect, cooperation or competition) occur between pathogens and microbiota that may affect mosquito traits such as vector competence.

II-Putative impact of bacteria on mosquito biology

The huge bacterial diversity associated with insects and the complexity of potential interactions between symbiotic microorganisms and their hosts pose a significant challenge to understanding extended phenotypes in mosquitoes. Current technologies are not sufficient to pinpoint all the fluxes of matter and energy between microorganisms and their hosts. However, some beneficial functions provided by bacteria, especially those living intracellularly, the endosymbionts, have been deciphered. Generally, insect-associated bacteria are classified in two broad categories, namely primary and secondary symbionts. Primary symbionts or obligate endosymbionts have co-evolved with their insect hosts while secondary symbionts have become associated with their insect hosts more recently and are not obligate. As yet, there is no description of primary endosymbionts in mosquitoes; all studies focusing on secondary symbionts and their potential role in host biology.

Nutrition

Bacteria contribute to the nutrition of insects in different ways. Midgut bacteria can produce compounds that are directly assimilated by the host or they can improve digestion by producing degradation enzymes which facilitate the assimilation of complex molecules. In phytophagous insects microbiota generally provide vitamins, amino acids and sterol that complement limited plant diets. The best known example is the involvement of the bacterium *Buchnera* in providing essential amino acids to aphids [10]. However, a role for bacteria in nutritional complementation in hematophagous insects has not been demonstrated so unequivocally. One interesting example are the bacteria that provide vitamin B which is not present in vertebrate blood, the sole nutrient source of *Glossina* tsetse flies [71].

In mosquitoes, such a nutritional function has never been formally demonstrated, but some evidence suggests that bacteria could be involved in some processes. For instance, *Serratia* and *Enterobacter*, which are known to contain hemolytic enzymes, could play a role in blood digestion in hematophagous Diptera [25,39,44]. In *Ae. albopictus*, *Acinetobacter baumannii* and *Acinetobacter johnsonii* could be involved in both blood digestion and nectar assimilation [37]. The evidence for this is that unlike environmental *Acinetobacter* strains, mosquito isolates were able to metabolize the amino acids α-keto -valeric acid and glycine, which are blood components, as well as 4-hydroxy-benzoic acid and xylose, which are common constituents of plant sap. The bacterial species *Asaia bogorensis* isolated from *An. stephensi* was shown to be prototrophic with respect to vitamins suggesting it may provide the mosquito with vitamins [40].

Bacteria are involved in nutrition through the release of various compounds useful for mosquito larval development. For instance, it has been demonstrated that a high level of *Pseudomonas aeruginosa* improved larval growth of *Cx. quinquefasciatus* in a phosphorus-rich medium while that of *Cx. tarsalis* was slowed down [72]. The level of phosphorus in breeding sites could be a factor explaining how mosquitoes can adapt to a specific condition according to their bacterial load, possibly with a trade-off between the nutritional and toxic roles of bacteria. Differential tolerance of larvae to putative toxins

present in *P. aeruginosa* could explain why the two mosquito species are not found in the same aquatic habitat.

Reproduction

As previously shown, some bacteria colonize the reproductive organs of insects allowing them to manipulate host reproduction, allowing them to spread considerably through host populations. The genus *Wolbachia* is able to control mosquito mating by a phenomenon called cytoplasmic incompatibility. This process prevents infected males from producing viable progeny when mating with an uninfected female or a female infected with an incompatible *Wolbachia* strain. In this way, certain mosquito species of *Aedes* and *Culex* are dependent on *Wolbachia* to produce viable offspring. Besides *Wolbachia*, other bacteria could play a role in reproduction, such as the genera *Bacillus* and *Staphylococcus* suspected to affect the fertility of the mosquito *Cx. pipiens*, although the mechanisms remain to be determined [73].

Other potential functions

Bacteria occurring in the environment where mosquitoes mature may also impact on their behavior. This is the case for bacteria producing specific odorant compounds that can act as attractants towards mosquitoes. It was demonstrated that the composition of skin microbiota affects the degree of attractiveness of humans to mosquito species [74]. For example, *Corynebacterium minutissimum produces* volatile compounds *such as* lactic acid or butyl butyrate that attract *An. gambiae* [74]. Moreover, bacteria from breeding sites or water-soluble compounds secreted by those bacteria are able to stimulate the hatching of *Ae. aegypti* eggs [75]. Some studies demonstrated a link between the presence of bacteria in insect hosts and their ability to degrade some insecticide molecules. For instance, the stinkbug which lives on sugarcane may harbor some fenithrotion-resistant *Burkholderia* which are acquired from the environment [76]. The acquisition of these bacteria by each generation could be an easy way for the insect to detoxify itself from the insecticide without any genetic cost. As yet, very few studies have described the role of bacteria in the degradation of xenobiotic molecules, though this could be important in understanding why the number of insecticide-resistant mosquitoes is growing. The load of *Wolbachia* in *Cx. pipiens* seems to be positively correlated with insecticide resistance mediated by esterase genes at some metabolic cost to mosquitoes [77].

Finally, the effects of experimental depletion of the symbiotic strain *Asaia* SF2.1 in *An. stephensi* larvae strongly suggest that the bacterium is a beneficial symbiont of this insect. Indeed, the observation of a delay in the development in larvae after antibiotic treatment in parallel with a dramatic reduction of *Asaia* burden, led to the hypothesis that this bacterium plays a beneficial role in the development of the mosquitoes [78]. Even though the mechanism remains to be identified, the high prevalence of *Asaia* combined with their ability to be transmitted both horizontally and vertically provide evidence of the biological role of bacterium in these mosquitoes [36,47,79].

III-Potential applications of bacteria against mosquito vectors

Application of chemical insecticides is still the most common method for mosquito vector control. However, negative consequences like the emergence of insecticide-resistant mosquitoes, environmental contamination and damage to non-target organisms have called chemical-based methods of control into question [80]. The use of bacteria to biologically control mosquito vectors has become a promising strategy.

Cytoplasmic incompatibility

In the last decade, one of the first efficient strategies to reduce crop insect pests was the introduction of sterile males into a population that, for instance, succeeded in limiting the expansion of the fruit fly *Ceratitis capitata* [81]. The major difficulty of applying the sterile insect technique (SIT) in mosquito populations was the loss of fitness observed in sterilized males [82-84]. Related to SIT, the incompatible insect technique (IIT) was developed based on *Wolbachia*-mediated cytoplasmic incompatibility [85]. The trans-infection of *Ae. albopictus* with *Wolbachia* strains *w*Ri and *w*Pip Istambul originating from *Drosophila simulans* and *Cx. pipiens*, respectively, caused a significant reduction in hatching rates [86,87]. Interestingly, when *Cx. pipiens* was trans-infected with strain *w*Pip Istambul, no impact was observed on the mosquito's fitness, making this a more promising approach than SIT [82,83,87].

Paratransgenesis

Transgenesis has also been proposed as a valuable method for controlling mosquito populations. This method is based on the introduction of a transgene in insect vectors which can directly impact on their life history traits or vector competence or indirectly interfere with pathogen replication and transmission [88]. One inconvenience of using transgenic mosquitoes is the cost to mosquito fitness as they are much less competitive [89]. Rather than modifying the insect genome *per se*, a complementary approach called paratransgenesis was proposed, which consists of using a genetically-modified symbiont known to have an impact on insect life history traits [90,91]. Recently, *Asaia* was proposed as a promising symbiotic control agent for paratransgenesis as this bacterium is transformable and can be used to express candidate genes in key organs of infected mosquito species. Similarly, *Pantoea*, a newly identified mosquito symbiont that cross-colonizes several

mosquito species and can be transformed and cultured, was also proposed for paratransgenic applications [27]. Recently, transgenic strains of *Pantoea agglomerans* were generated by transformation with a plasmid expressing antiplasmodial compounds [92].

Modification of vector competence

Vector competence is the ability of a vector to transmit a pathogen, i.e. the intrinsic permissiveness of a vector to be infected, then to replicate and to transmit a pathogen [93]. One strategy used to fight vector-borne pathogens is to decrease vector competence. There is a growing interest in discovering how bacteria interfere with pathogen transmission. In particular, several studies have shown that *Wolbachia* can decrease or inhibit pathogen replication or transmission in different mosquito species. In general, bacteria successfully interfered with pathogens when mosquitoes were trans-infected with strains isolated from a different host. This is the case for *Ae. aegypti* and *Anopheles* which are not naturally infected with *Wolbachia*. In such artificial systems, a significant reduction in life span and pathogen load (including viruses such as Dengue and Chikungunya or parasites such as plasmodiums and filariases) has been observed [16,18,19,94,95]. In *Cx. pipiens* which is naturally infected by *Wolbachia*, the West Nile virus load was reduced only 2–3 fold compared to individuals lacking *Wolbachia* [96]. More recently, the *Ae. albopictus* ALPROV line naturally harboring two *Wolbachia* strains, *w*AlbA and *w*AlbB, was shown to efficiently replicate the dengue virus but transmission, as measured by the amount of genomic RNA and infectious particles in salivary glands, was significantly reduced compared to the *Wolbachia*-uninfected line [97]. Mechanisms of bacterial interference of vector competence still remain to be deciphered, but some hypotheses have been suggested. As bacteria and pathogens can invade similar tissues or even the same cells, a theoretical assumption is that they could directly compete for resources and space [98]. The presence of bacteria could also induce the immune system by producing specific compounds that directly interact with pathogens like antiviral or antiparasitic compounds. Recently, Pan *et al.* (2012) demonstrated that the inhibition of dengue virus in the presence of *Wolbachia* was correlated with the induction of oxidative stress in the mosquito *Ae. aegypti* [99]. This response resulted in an activation of the Toll pathway allowing the production of antioxidant molecules and anti-microbial peptides (defensin and cecropins) against dengue virus. In *An. gambiae*, it was shown that oxidative compounds secreted by the strain *Enterobacter* Esp_Z. induced a large decrease in *Plasmodium* in mosquitoes [100]. Joyce *et al.* (2011) showed that half of the bacterial species isolated from *Ae. albopictus* midguts decreased the infectivity of the La Crosse virus in animal cells [101].

Bacteria used as insecticides

Some bacterial strains are able to produce insecticidal compounds that act like natural pesticides. The bacterium *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* produces two different toxins encoded by the *cry* and *cyt* genes located on a plasmid replicon [102]. The Cry toxins act on a large insect spectrum (Coleoptera, Lepidoptera, Hymenoptera and Diptera), whereas the Cyt toxins act specifically on Diptera [103]. Both toxins are activated by the alkaline pH of the larval gut and are able to degrade the midgut membrane causing larvae to die [104]. The Firmicute *Lysinibacillus sphaericus* also contains the insecticidal Mtx and Bin toxins that are highly active against mosquito larvae [105]. These toxins paralyze the digestive system and disrupt the insect nervous system. These two classes of larvicidal bacteria are major mosquitocidal candidates and were successfully used in the field to reduce *An. gambiae* populations responsible for malaria outbreaks in Gambia and Ghana [106,107]. Finally, larvicidal toxins of *Clostridium bifermentans* serovar Malaysia and the pupicidal toxin of *Bacillus subtilis* subspecies *subtilis* are also potential candidates as agents in biological control of mosquito populations [108,109].

Conclusions

Even though information on the nature of mosquito-associated bacteria is increasing, their functions and genetic potential are still underexplored. This is partly due to the complexity of interactions in terms of bacterial population dynamics influenced by different biotic and abiotic factors. In the near future, the application of next generation sequencing should improve our knowledge of the essential microbial partners and their roles in mosquito biology. Interestingly, the recent development of techniques such as metagenomics, metatranscriptomics, metaproteomics and metabolomics is opening up the possibility of more comprehensive descriptions of molecular foundations and signatures of the relationships between insects and their microbiomes. Such high-throughput analysis will allow a better understanding of the dynamics and function of the mosquito-associated microbiota. It will be possible to explore bacterial communities in an unprecedented way by highlighting metabolically active bacteria and discovering novel bacterial genes that play important roles in chemical and biological processes of the insect host. Moreover, with global changes that have greatly contributed to increase the density and geographic expansion of mosquito populations, questions are now raised about the possible scenarios of emergence or re-emergence of mosquito-borne diseases worldwide. As microbial symbionts of insects often mediate or constrain adaptation to environmental fluctuations, better knowledge of mosquito-associated bacterial communities will be an important aspect of understanding what drives mosquito adaptation.

Additional file

Additional file 1: Bacterial genera identified in mosquitoes and their habitats. An index of bacterial genera identified in mosquitoes and their habitats is presented according to mosquito species, stage, sex, nutrition type, sampling locality, population type and experimental approach (N/A = Not Applicable).

Competing interests
The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions
GM made the alignments, built the phylogenic trees and drafted the manuscript, CVM and PM helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements
We thank anonymous reviewers for helpful comments. GM was supported by a grant from Academic Research Cluster 1 of Rhône-Alpes Region. This work was partially funded by the grant EC2CO CNRS, and was carried out with the support of CMIRA Coopéra Rhône-Alpes and within the frameworks of GDRIs "Biodiversité et Développement Durable à Madagascar" and "Biodiversity and Infectious Diseases" as well as COST action F0701 'Arthropod Symbioses: from fundamental to pest disease management'.

Received: 19 March 2013 Accepted: 8 May 2013
Published: 20 May 2013

References
1. Dale C, Moran NA: **Molecular interactions between bacterial symbionts and their hosts.** *Cell* 2006, **126**:453–465.
2. Lane N: **Energetics and genetics across the prokaryote-eukaryote divide.** *Biol Direct* 2011, **6**:35.
3. Reshef L, Koren O, Loya Y, Zilber-Rosenberg I, Rosenberg E: **The coral probiotic hypothesis.** *Environ Microbiol* 2006, **8**:2068–2073.
4. Guay J-F, Boudreault S, Michaud D, Cloutier C: **Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: Role of *Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid.** *J Insect Physiol* 2009, **55**:919–926.
5. Rosenberg E, Koren O, Reshef L, Efrony R, Zilber-Rosenberg I: **The role of microorganisms in coral health, disease and evolution.** *Nat Rev Microbiol* 2007, **5**:355–362.
6. Rosenberg E, Zilber-Rosenberg I: **Symbiosis and development: the hologenome concept.** *Birth Defects Res C Embryo Today* 2011, **93**:56–66.
7. Toft C, Andersson SGE: **Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation.** *Nat Rev Genet* 2010, **11**:465–475.
8. Douglas AE: **Lessons from studying insect symbioses.** *Cell Host Microbe* 2011, **10**:359–367.
9. Oliver KM, Russell JA, Moran NA, Hunter MS: **Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:1803–1807.
10. Douglas AE: **Nutritional interactions in insect-microbial symbioses: aphids and their symbiotic bacteria *Buchnera*.** *Annu Rev Entomol* 1998, **43**:17–37.
11. Akman L, Yamashita A, Watanabe H, Oshima K, Shiba T, Hattori M, Aksoy S: **Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*.** *Nat Genet* 2002, **32**:402–407.
12. Pais R, Lohs C, Wu Y, Wang J, Aksoy S: **The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly.** *Appl Environ Microbiol* 2008, **74**:5965–5974.
13. Becker N: *Mosquitoes and Their Control*. New York: Springer; 2003.
14. Cumberland S: **Mosquito wars.** *Bull World Health Organ* 2009, **87**:167–168.
15. Ricci I, Damiani C, Capone A, Defreece C, Rossi P, Favia G: **Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives.** *Curr Opin Microbiol* 2012, **15**:278–284.
16. Iturbe-Ormaetxe I, Walker T, O' Neill SL: ***Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease.** *EMBO Rep* 2011, **12**:508–518.
17. Calvitti M, Moretti R, Skidmore AR, Dobson SL: ***Wolbachia* strain wPip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a *Wolbachia*-based suppression strategy against the disease vector *Aedes albopictus*.** *Parasites & Vectors* 2012, **5**:254.
18. McMeniman CJ, Lane RV, Cass BN, Fong AWC, Sidhu M, Wang Y-F, O'Neill SL: **Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*.** *Science* 2009, **323**:141–144.
19. Moreira LA, Iturbe-Ormaetxe I, Jeffery JA, Lu G, Pyke AT, Hedges LM, Rocha BC, Hall-Mendelin S, Day A, Riegler M, Hugo LE, Johnson KN, Kay BH, McGraw EA, van den Hurk AF, Ryan PA, O'Neill SL: **A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium.** *Cell* 2009, **139**:1268–1278.
20. Demaio J, Pumpuni CB, Kent M, Beier JC: **The midgut bacterial flora of wild *Aedes triseriatus*, *Culex pipiens*, and *Psorophora columbiae* mosquitoes.** *Am J Trop Med Hyg* 1996, **54**:219–223.
21. Gonzalez-Ceron L, Santillan F, Rodriguez MH, Mendez D, Hernandez-Avila JE: **Bacteria in midguts of field-collected *Anopheles albimanus* block *Plasmodium vivax* sporogonic development.** *J Med Entomol* 2003, **40**:371–374.
22. Pidiyar VJ, Jangid K, Patole MS, Shouche YS: **Studies on cultured and uncultured microbiota of wild *Culex quinquefasciatus* mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis.** *Am J Trop Med Hyg* 2004, **70**:597–603.
23. Lindh JM, Terenius O, Faye I: **16S rRNA gene-based identification of midgut bacteria from field-caught *Anopheles gambiae* sensu lato and *A. funestus* mosquitoes reveals new species related to known insect symbionts.** *Appl Environ Microbiol* 2005, **71**:7217–7223.
24. Rani A, Sharma A, Rajagopal R, Adak T, Bhatnagar RK: **Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector.** *BMC Microbiol* 2009, **9**:96.
25. Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, Bacci M Jr, Berbert-Molina MA, Lemos FJA: **Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut.** *Acta Trop* 2010, **115**:275–281.
26. Chavshin AR, Oshaghi MA, Vatandoost H, Pourmand MR, Raeisi A, Enayati AA, Mardani N, Ghoorchian S: **Identification of bacterial microflora in the midgut of the larvae and adult of wild caught *Anopheles stephensi*: a step toward finding suitable paratransgenesis candidates.** *Acta Trop* 2012, **121**:129–134.
27. Dinparast Djadid N, Jazayeri H, Raz A, Favia G, Ricci I, Zakeri S: **Identification of the midgut microbiota of An. stephensi and An. maculipennis for their application as a paratransgenic tool against malaria.** *PLoS One* 2011, **6**:e28484.
28. Zouache K, Raharimalala FN, Raquin V, Tran-Van V, Raveloson LHR, Ravelonandro P, Mavingui P: **Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar.** *FEMS Microbiol Ecol* 2011, **75**:377–389.
29. Ramirez JL, Souza-Neto J, Torres Cosme R, Rovira J, Ortiz A, Pascale JM, Dimopoulos G: **Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**:e1561.
30. Terenius O, Lindh JM, Eriksson-Gonzales K, Bussière L, Laugen AT, Bergquist H, Titanji K, Faye I: **Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*.** *FEMS Microbiol Ecol* 2012, **80**:556–565.
31. Apte-Deshpande A, Paingankar M, Gokhale MD, Deobagkar DN: ***Serratia odorifera* a midgut inhabitant of *Aedes aegypti* mosquito enhances its susceptibility to dengue-2 virus.** *PLoS One* 2012, **7**:e40401.
32. Dillon RJ, Dillon VM: **The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions.** *Annu Rev Entomol* 2004, **49**:71–92.
33. Wang Y, Gilbreath TM 3rd, Kukutla P, Yan G, Xu J: **Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya.** *PLoS One* 2011, **6**:e24767.
34. Boissière A, Tchioffo MT, Bachar D, Abate L, Marie A, Nsango SE, Shahbazkia HR, Awono-Ambene PH, Levashina EA, Christen R, Morlais I: **Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection.** *PLoS Pathog* 2012, **8**:e1002742.
35. Osei-Poku J, Mbogo CM, Palmer WJ, Jiggins FM: **Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya.** *Mol Ecol* 2012, **21**:5138–5150.
36. Favia G, Ricci I, Damiani C, Raddadi N, Crotti E, Marzorati M, Rizzi A, Urso R, Brusetti L, Borin S, Mora D, Scuppa P, Pasqualini L, Clementi E, Genchi M, Corona S, Negri I, Grandi G, Alma A, Kramer L, Esposito F, Bandi C, Sacchi L,

Daffonchio D: **Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2007, **104**:9047–9051.
37. Minard G, Tran FH, Raharimalala FN, Hellard E, Ravelonandro P, Mavingui P, Valiente MC: **Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar.** *FEMS Microbiol Ecol* 2013, **83**:63–73.
38. Clements AN: *The Biology of Mosquitoes: Sensory Reception and Behaviour.* Wallingford: CABI Publishing; 1999.
39. Campbell CL, Mummey DL, Schmidtmann ET, Wilson WC: **Culture-independent analysis of midgut microbiota in the arbovirus vector *Culicoides sonorensis* (Diptera: Ceratopogonidae).** *J Med Entomol* 2004, **41**:340–348.
40. Crotti E, Rizzi A, Chouaia B, Ricci I, Favia G, Alma A, Sacchi L, Bourtzis K, Mandrioli M, Cherif A, Bandi C, Daffonchio D: **Acetic Acid Bacteria, Newly Emerging Symbionts of Insects.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:6963–6970.
41. Valiente Moro C, Tran FH, Nantenaina Raharimalala F, Ravelonandro P, Mavingui P: **Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*.** *BMC Microbiol* 2013, **13**:70.
42. Noden BH, Vaughan JA, Pumpuni CB, Beier JC: **Mosquito ingestion of antibodies against mosquito midgut microbiota improves conversion of ookinetes to oocysts for *Plasmodium falciparum*, but not *P. yoelii*.** *Parasitol Int* 2011, **60**:440–446.
43. Oliveira JHM, Gonçalves RLS, Lara FA, Dias FA, Gandara ACP, Menna-Barreto RFS, Edwards MC, Laurindo FRM, Silva-Neto MAC, Sorgine MHF, Oliveira PL: **Blood meal-derived heme decreases ROS levels in the midgut of *Aedes aegypti* and allows proliferation of intestinal microbiota.** *PLoS Pathog* 2011, **7**:e1001320.
44. De Gaio AO, Gusmão DS, Santos AV, Berbert-Molina MA, Pimenta PF, Lemos FJ: **Contribution of midgut bacteria to blood digestion and egg production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.).** *Parasites Vectors* 2011, **4**:105.
45. Douglas AE: **Mycetocyte symbiosis in insects.** *Biol Rev Camb Philos Soc* 1989, **64**:409–434.
46. Baumann P: **Biology bacteriocyte-associated endosymbionts of plant sap-sucking insects.** *Annu Rev Microbiol* 2005, **59**:155–189.
47. Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, Capone A, Ulissi U, Epis S, Genchi M, Sagnon N, Faye I, Kang A, Chouaia B, Whitehorn C, Moussa GW, Mandrioli M, Esposito F, Sacchi L, Bandi C, Daffonchio D, Favia G: **Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*.** *Microb Ecol* 2010, **60**:644–654.
48. Dobson SL, Bourtzis K, Braig HR, Jones BF, Zhou W, Rousset F, O'Neill SL: ***Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues.** *Insect Biochem Mol Biol* 1999, **29**:153–160.
49. Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mousson L, Failloux A-B, Mavingui P: **Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*.** *PLoS One* 2009, **4**:e6388.
50. Foster WA: **Mosquito Sugar Feeding and Reproductive Energetics.** *Ann Rev Entomol* 1995, **40**:443–474.
51. Nation JL: *Insect Physiology and Biochemistry.* Boca Raton, Florida: CRC Press; 2002.
52. Gelperin A: **Regulation of Feeding.** *Ann Rev Entomol* 1971, **16**:365–378.
53. Gusmão DS, Santos AV, Marini DC, De Russo ES, Peixoto AMD, Bacci Júnior M, Berbert-Molina MA, Lemos FJA: **First isolation of microorganisms from the gut diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): new perspectives for an insect-bacteria association.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2007, **102**:919–924.
54. Kumar S, Molina-Cruz A, Gupta L, Rodrigues J, Barillas-Mury C: **A peroxidase/dual oxidase system modulates midgut epithelial immunity in *Anopheles gambiae*.** *Science* 2010, **327**:1644–1648.
55. Benoit JB, Lopez-Martinez G, Patrick KR, Phillips ZP, Krause TB, Denlinger DL: **Drinking a hot blood meal elicits a protective heat shock response in mosquitoes.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2011, **108**:8026–8029.
56. Kittayapong P, Baisley KJ, Sharpe RG, Baimai V, O'Neill SL: **Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand.** *Am J Trop Med Hyg* 2002, **66**:103–107.
57. Cook PE, McGraw EA: ***Wolbachia pipientis*: an expanding bag of tricks to explore for disease control.** *Trends Parasitol* 2010, **26**:373–375.
58. Thiery I, Nicolas L, Rippka R, De Tandeau MN: **Selection of cyanobacteria isolated from mosquito breeding sites as a potential food source for mosquito larvae.** *Appl Environ Microbiol* 1991, **57**:1354–1359.
59. Vázquez-Martínez MG, Rodríguez MH, Arredondo-Jiménez JI, Méndez-Sanchez JD, Bond-Compeán JG, Cold-Morgan M: **Cyanobacteria associated with *Anopheles albimanus* (Diptera: Culicidae) larval habitats in southern Mexico.** *J Med Entomol* 2002, **39**:825–832.
60. Moncayo AC, Lerdthusnee K, Leon R, Robich RM, Romoser WS: **Meconial peritrophic matrix structure, formation, and meconial degeneration in mosquito pupae/pharate adults: histological and ultrastructural aspects.** *J Med Entomol* 2005, **42**:939–944.
61. Moll RM, Romoser WS, Modrzakowski MC, Moncayo AC, Lerdthusnee K: **Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis.** *J Med Entomol* 2001, **38**:29–32.
62. Jung JY, Park MS, Kim SE, Park BH, Son JY, Kim EY, Lim JE, Lee SK, Lee SH, Lee KJ, Kang YA, Kim SK, Chang J, Kim YS: **Risk factors for multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* bacteremia in patients with colonization in the intensive care unit.** *BMC Infect Dis* 2010, **10**:228.
63. Shi Y, Lou K, Li C: **Growth and photosynthetic efficiency promotion of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) by endophytic bacteria.** *Photosynthesis Res* 2010, **105**:5–13.
64. Lindh JM, Borg-Karlson A-K, Faye I: **Transstadial and horizontal transfer of bacteria within a colony of *Anopheles gambiae* (Diptera: Culicidae) and oviposition response to bacteria-containing water.** *Acta Trop* 2008, **107**:242–250.
65. Chouaia B, Rossi P, Montagna M, Ricci I, Crotti E, Damiani C, Epis S, Faye I, Sagnon N, Alma A, Favia G, Daffonchio D, Bandi C: **Molecular evidence for multiple infections as revealed by typing of *Asaia* bacterial symbionts of four mosquito species.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:7444–7450.
66. Moënne-Loccoz Y, Mavingui P, Combes C, Normand P, Steinberg C: **Micro-organismes et interactions biotiques.** In *Ecologie microbienne: Microbiologie des milieux naturels et anthropisés.* Edited by Bertrand J-C, Caumette P, Lebaron P, Matheron R, Normand P. Publications de l'Université de Pau et des Pays de l'Adour; 2011:413–470.
67. Reid G, Younes JA, Van der Mei HC, Gloor GB, Knight R, Busscher HJ: **Microbiota restoration: natural and supplemented recovery of human microbial communities.** *Nat Rev Microbiol* 2011, **9**:27–38.
68. Dillon R, Charnley K: **Mutualism between the desert locust *Schistocerca gregaria* and its gut microbiota.** *Res Microbiol* 2002, **153**:503–509.
69. Dong Y, Manfredini F, Dimopoulos G: **Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites.** *PLoS Pathog* 2009, **5**:e1000423.
70. Zouache K, Michelland RJ, Failloux A-B, Grundmann GL, Mavingui P: **Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector.** *Mol Ecol* 2012, **21**:2297–2309.
71. Aksoy S: **Tsetse–A haven for microorganisms.** *Parasitol Today (Regul Ed)* 2000, **16**:114–118.
72. Peck GW, Walton WE: **Effect of bacterial quality and density on growth and whole body stoichiometry of *Culex quinquefasciatus* and *Culex tarsalis* (Diptera: Culicidae).** *J Med Entomol* 2006, **43**:25–33.
73. Fouda MA, Hassan MI, Al-Daly AG, Hammad KM: **Effect of midgut bacteria of *Culex pipiens* L. on digestion and reproduction.** *J Egypt Soc Parasitol* 2001, **31**:767–780.
74. Verhulst NO, Andriessen R, Groenhagen U, Bukovinszkiné Kiss G, Schulz S, Takken W, Van Loon JJA, Schraa G, Smallegange RC: **Differential attraction of malaria mosquitoes to volatile blends produced by human skin bacteria.** *PLoS One* 2010, **5**:e15829.
75. Ponnusamy L, Böröczky K, Wesson DM, Schal C, Apperson CS: **Bacteria stimulate hatching of yellow fever mosquito eggs.** *PLoS One* 2011, **6**:e24409.
76. Kikuchi Y, Hosokawa T, Fukatsu T: **An ancient but promiscuous host-symbiont association between *Burkholderia* gut symbionts and their heteropteran hosts.** *ISME J* 2011, **5**:446–460.
77. Berticat C, Rousset F, Raymond M, Berthomieu A, Weill M: **High *Wolbachia* density in insecticide-resistant mosquitoes.** *Proc Biol Sci* 2002, **269**:1413–1416.
78. Chouaia B, Rossi P, Epis S, Mosca M, Ricci I, Damiani C, Ulissi U, Crotti E, Daffonchio D, Bandi C, Favia G: **Delayed larval development in *Anopheles* mosquitoes deprived of *Asaia* bacterial symbionts.** *BMC Microbiol* 2012, **12**(Suppl 1):S2.
79. Damiani C, Ricci I, Crotti E, Rossi P, Rizzi A, Scuppa P, Esposito F, Bandi C, Daffonchio D, Favia G: **Paternal transmission of symbiotic bacteria in malaria vectors.** *Curr Biol* 2008, **18**:R1087–R1088.
80. David J-P, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz MA, Chandor-Proust A, Reynaud S: **Transcriptome response to pollutants and insecticides in the**

dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* 2010, **11**:216.
81. Robinson AS: **Genetic sexing strains in medfly, *Ceratitis capitata*, sterile insect technique programmes.** *Genetica* 2002, **116**:5–13.
82. Alphey L: **Re-engineering the sterile insect technique.** *Insect Biochem Mol Biol* 2002, **32**:1243–1247.
83. Benedict MQ, Robinson AS: **The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique.** *Trends Parasitol* 2003, **19**:349–355.
84. Munhenga G, Brooke BD, Chirwa TF, Hunt RH, Coetzee M, Govender D, Koekemoer LL: **Evaluating the potential of the sterile insect technique for malaria control: relative fitness and mating compatibility between laboratory colonized and a wild population of *Anopheles arabiensis* from the Kruger National Park, South Africa.** *Parasites Vectors* 2011, **4**:208.
85. Werren JH, Baldo L, Clark ME: ***Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology.** *Nat Rev Microbiol* 2008, **6**:741–751.
86. Fu Y, Gavotte L, Mercer DR, Dobson SL: **Artificial triple *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility.** *Appl Environ Microbiol* 2010, **76**:5887–5891.
87. Atyame CM, Duron O, Tortosa P, Pasteur N, Fort P, Weill M: **Multiple *Wolbachia* determinants control the evolution of cytoplasmic incompatibilities in *Culex pipiens* mosquito populations.** *Mol Ecol* 2011, **20**:286–298.
88. Ruang-Areerate T, Kittayapong P: ***Wolbachia* transinfection in *Aedes aegypti*: a potential gene driver of dengue vectors.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2006, **103**:12534–12539.
89. Marrelli MT, Moreira CK, Kelly D, Alphey L, Jacobs-Lorena M: **Mosquito transgenesis: what is the fitness cost?** *Trends Parasitol* 2006, **22**:197–202.
90. Coutinho-Abreu IV, Zhu KY, Ramalho-Ortigao M: **Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: current status and future challenges.** *Parasitol Int* 2010, **59**:1–8.
91. Hurwitz I, Hillesland H, Fieck A, Das P, Durvasula R: **The paratransgenic sand fly: A platform for control of *Leishmania* transmission.** *Parasites Vectors* 2011, **4**:82.
92. Bisi DC, Lampe DJ: **Secretion of anti-Plasmodium effector proteins from a natural *Pantoea agglomerans* isolate by using PelB and HlyA secretion signals.** *Appl Environ Microbiol* 2011, **77**:4669–4675.
93. Lambrechts L, Scott TW: **Mode of transmission and the evolution of arbovirus virulence in mosquito vectors.** *Proc Biol Sci* 2009, **276**:1369–1378.
94. Kambris Z, Blagborough AM, Pinto SB, Blagrove MSC, Godfray HCJ, Sinden RE, Sinkins SP: ***Wolbachia* stimulates immune gene expression and inhibits plasmodium development in *Anopheles gambiae*.** *PLoS Pathog* 2010, **6**:e1001143.
95. Walker T, Moreira LA: **Can *Wolbachia* be used to control malaria?** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 2011, **106**(Suppl 1):212–217.
96. Glaser RL, Meola MA: **The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection.** *PLoS One* 2010, **5**:e11977.
97. Mousson L, Zouache K, Arias-Goeta C, Raquin V, Mavingui P, Failloux A-B: **The Native *Wolbachia* Symbionts Limit Transmission of Dengue Virus in *Aedes albopictus*.** *PLoS Negl Trop Dis* 2012, **6**:e1989.
98. Mideo N: **Parasite adaptations to within-host competition.** *Trends Parasitol* 2009, **25**:261–268.
99. Pan X, Zhou G, Wu J, Bian G, Lu P, Raikhel AS, Xi Z: ***Wolbachia* induces reactive oxygen species (ROS)-dependent activation of the Toll pathway to control dengue virus in the mosquito *Aedes aegypti*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2012, **109**:E23–E31.
100. Cirimotich CM, Ramirez JL, Dimopoulos G: **Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens.** *Cell Host Microbe* 2011, **10**:307–310.
101. Joyce JD, Nogueira JR, Bales AA, Pittman KE, Anderson JR: **Interactions between La Crosse virus and bacteria isolated from the digestive tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae).** *J Med Entomol* 2011, **48**:389–394.
102. González JM Jr, Brown BJ, Carlton BC: **Transfer of *Bacillus thuringiensis* plasmids coding for delta-endotoxin among strains of *B. thuringiensis* and *B. cereus*.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1982, **79**:6951–6955.
103. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH: ***Bacillus Thuringiensis* and Its Pesticidal Crystal Proteins.** *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**:775–806.
104. Bravo A, Gill SS, Soberón M: **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.** *Toxicon* 2007, **49**:423–435.
105. Berry C: **The bacterium, *Lysinibacillus sphaericus*, as an insect pathogen.** *J Invertebr Pathol* 2012, **109**:1–10.
106. Majambere S, Lindsay SW, Green C, Kandeh B, Fillinger U: **Microbial larvicides for malaria control in The Gambia.** *Malar J* 2007, **6**:76.
107. Nartey R, Owusu-Dabo E, Kruppa T, Baffour-Awuah S, Annan A, Oppong S, Becker N, Obiri-Danso K: **Use of *Bacillus thuringiensis* var israelensis as a viable option in an Integrated Malaria Vector Control Programme in the Kumasi Metropolis, Ghana.** *Parasites Vectors* 2013, **6**:116.
108. Yiallouros M, Storch V, Thiery I, Becker N: **Efficacy of *Clostridium bifermentans* serovar Malaysia on target and nontarget organisms.** *J Am Mosq Control Assoc* 1994, **10**:51–55.
109. Geetha I, Manonmani AM, Paily KP: **Identification and characterization of a mosquito pupicidal metabolite of a *Bacillus subtilis* subsp. subtilis strain.** *Appl Microbiol Biotechnol* 2010, **86**:1737–1744.

doi:10.1186/1756-3305-6-146
Cite this article as: Minard *et al.*: Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasites & Vectors* 2013 **6**:146.

Submit your next manuscript to BioMed Central and take full advantage of:

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

2.3.3. Le microbiote bactérien d'*Aedes albopictus*

Jusqu'à très récemment, la majorité des études sur le microbiote bactérien associé au moustique tigre *Ae. albopictus* a porté sur la bactérie intracellulaire *Wolbachia* et ses effets sur la reproduction et/ou l'interférence avec les pathogènes transmis. Toutefois, des études récentes ciblées sur d'autres symbiotes ont ouvert la voie à de nouvelles perspectives de recherche en biologie des interactions.

2.3.3.1. *Wolbachia*

Wolbachia est une bactérie endosymbiotique localisée dans le cytosol des cellules hôtes eucaryotes. Elle appartient à la famille des *Anaplasmataceae* au sein de laquelle on retrouve d'autres bactéries intracellulaires comme le genre *Anaplasma,* bactérie pathogène transmise par des tiques (Dumler et al., 2001; Garrity et al., 2006). *Wolbachia* a la capacité d'infecter différentes espèces d'arthropodes (>40% des espèces) et de nématodes avec lesquelles elle va entretenir des interactions variables allant du mutualisme au parasitisme (John H Werren et al., 2008; Zug and Hammerstein, 2012). Chez *Ae. albopictus*, elle est majoritairement localisée dans les organes reproducteurs (ovaires chez les femelles et testicules chez les mâles), mais est également capable de coloniser le corps gras (matière grasse qui s'apparente au foie des vertébrés) et en plus faible densité les glandes salivaires et l'intestin (Dobson et al., 1999; Zouache et al., 2009). Des études de phylogéographie ont démontré que *Wolbachia* atteignait des prévalences de ~100% dans les populations naturelles d'*Ae. albopictus* (revu par Bourtzis et al., 2014). Les souches de *Wolbachia* ont été regroupées en 10 clades (ou supergroupes), désignés de A à F et de H à K sur la base d'analyses multigéniques MLST (Multi Locus Sequence Typing) (Ros et al., 2009). A ce jour, les clades A, B ont été majoritairement trouvés chez les insectes (Bourtzis et al., 2014). Les clades A et B ont divergé il y a 60 millions d'années (Werren et al., 1995). Chez *Ae. albopictus,* les souches responsables de l'infection ont été nommées *w*AlbA et *w*AlbB en référence aux deux clades auxquels elles appartiennent (Sinkins et al., 1995; Zhou et al., 1998). Elles sont majoritairement retrouvées en co-infection (>99% des individus bi-infectés), on parle alors de « superinfection » (Werren et al., 1995; Kitrayapong et al., 2002; de Albuquerque et al., 2011; Zouache et al., 2011). La bactérie *Wolbachia* est capable d'induire divers phénotypes chez son hôte et d'impacter plus particulièrement son système de reproduction (John H Werren et al., 2008). Chez *Ae. albopictus*, elle induit le phénotype d'incompatibilité cytoplasmique : les mâles infectés par un clade de *Wolbachia* ne peuvent générer une descendance viable avec les femelles non infectées ou infectées par un clade différent comme décrit dans le chapitre 2.2.2. Dans le cas d'*Ae. albopictus*, la superinfection

complexifie le mécanisme car les deux clades peuvent infecter les mâles, et par conséquent, entraîner des incompatibilités cytoplasmiques lorsqu'ils se croiseront avec des femelles non infectées ou infectées par l'un des deux clades (Dobson et al., 2001). C'est pourquoi, les femelles possèdent un avantage sélectif à la superinfection puisque leur taux de reproduction sera augmenté (S. L. Dobson et al., 2004). Des études de terrain ont par ailleurs confirmé ces hypothèses en démontrant la forte prévalence de superinfection chez les individus femelles d'*Ae. albopictus* (Kittayapong et al., 2002a; Armbruster, W. E. Damsky Jr, et al., 2003; Tortosa et al., 2010; de Albuquerque et al., 2011; Zouache et al., 2011). De plus, ce phénomène semble avoir des effets positifs sur les traits d'histoire de vie des femelles. En effet, la superinfection augmente leur survie, leur fécondité et leur taux d'éclosion (Dobson et al., 2001; Dobson et al., 2004). Chez les mâles, l'effet de la superinfection donne des résultats plus mitigés. Les études réalisées ont notamment montré une plus forte mortalité dans les stades immatures ainsi qu'une légère diminution de leur compétitivité. Cependant, aucun changement dans la survie ou encore dans la capacité des spermatozoïdes à féconder l'ovocyte n'a été observé (Islam and Dobson, 2006; Calvitti et al., 2009; Gavotte et al., 2009).

Ces dernières années, un nouveau phénotype induit par *Wolbachia* a été décrit, appelé interférence microbienne, qui entraîne une résistance de l'hôte aux infections par des pathogènes (Lauren M. Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008). Chez *Ae. albopictus*, une telle interférence a précédemment été décrite dans les glandes salivaires entre le virus de la Dengue et les souches de *Wolbachia* *w*AlbA et *w*AlbB (Mousson et al., 2012). D'autres travaux indiquent que *Wolbachia* pourrait induire l'autophagie chez ce moustique (Voronin et al., 2012), fournissant ainsi des pistes potentielles pour expliquer son interaction avec les virus transmis (Mousson et al., 2010).

2.3.3.2. Autres symbiotes d'intérêt

Au sein des protéobactéries, trois genres bactériens ont été plus particulièrement étudiés chez *Ae. albopictus*, il s'agit des genres *Pantoea*, *Asaia* et *Acinetobacter*. Ces bactéries sont aussi fréquemment associées à d'autres insectes hématophages y compris certaines espèces de moustiques (Chouaia et al., 2010; Valiente Moro et al., 2013). De plus, ces bactéries possèdent l'avantage d'être cultivables, ce qui peut faciliter leur étude en laboratoire et offrir par conséquent des perspectives d'application de paratransgénèse dans le cadre de la lutte anti-vectorielle (Zouache et al., 2011).

La bactérie *Pantoea* est une Gammaprotéobactérie dont la présence a été reportée chez de nombreux insectes phytophages nectarivores (Valiente Moro et al., 2013). Cette bactérie a également été retrouvée chez d'autres espèces de moustiques dont *Culex*

quinquefasciatus et *Ae. aegypti* (Terenius et al., 2012; Chandel et al., 2013). L'analyse du gène *rrs* a montré que les souches de *Pantoea* sp. isolées d'*Ae. albopictus* étaient génétiquement proches des souches de *Cx. quinquefasciatus* (Valiente Moro et al., 2013). Ces études mettent ainsi en avant l'hypothèse d'une adaptation de certaines souches bactériennes à leur hôte moustique. La spécificité d'hôte et le statut cultivable ont fait de *Pantoea* un candidat potentiel au développement de techniques de paratransgénèse contre les *Plasmodium* (protozoaires responsable du paludisme qui tue plus 500 000 personnes par an) chez les moustiques vecteurs *Anopheles* (Bisi and Lampe, 2011; Dinparast Djadid et al., 2011). La transformation des bactéries par introduction de gènes anti-plasmodium suivi de leur inoculation aux moustiques *An. gambiae* et *An. stephensi* ont montré une forte activité antiparasitaire pouvant aller jusqu'à 83% d'inhibition (Wang et al., 2012).

Les Alphaprotéobactéries du genre *Asaia* ont été retrouvées chez différentes espèces de moustiques dont *Cx. quinquefasciatus, Ae. aegypti* et plusieurs espèces des genres *Mansonia* et *Anopheles* (Chouaia et al., 2010; Gusmão et al., 2010; Zouache et al., 2011; Boissière et al., 2012; Osei-Poku et al., 2012; Ramirez et al., 2012). Ces bactéries sont productrices d'acide acétique, et, à ce titre, elles font partie du groupe fonctionnel des AAB (Acetic Acid Bacteria). Ce groupe contient d'autres genres comme *Gluconobacter* ou *Acetobacter* qui sont également capables de coloniser le tube digestif de différents insectes dont *Ae. albopictus* (Chouaia et al., 2010; Crotti et al., 2010). L'un des points communs entre les AAB est l'acquisition d'une oxydase terminale ayant une forte affinité pour l'oxygène. Cette caractéristique aurait permis l'adaptation et la survie de ces bactéries au sein d'habitats contenant de fortes ou de faibles quantités en oxygène disponible, comme c'est le cas dans le tube digestif des insectes (Chouaia et al., 2014). L'origine de ces bactéries n'est pas clairement établie mais une acquisition de l'environnement via la nutrition est fortement probable car *Asaia*, tout comme *Pantoea*, sont retrouvées dans le nectar des plantes consommé par les moustiques (Pusey, 1999; Yamada et al., 2000; Tsavkelova et al., 2007; Chouaia et al., 2010; Valiente Moro et al., 2013). Cependant, on ne peut exclure la possibilité d'une transmission verticale des bactéries chez le moustique tigre car une étude réalisée chez *An. stephensi* a montré que la femelle pouvait transmettre *Asaia* sp. à sa descendance (Favia et al., 2007). D'autre part, des études menées chez ce moustique ont égamement démontré que la bactérie pouvait être transmise de manière horizontale entre individus au cours de la nutrition ou encore entre mâle et femelle par transmission vénérienne au cours de l'accouplement (Favia et al., 2008).

La bactérie *Acinetobacter,* quant à elle, est une Gammaprotéobactérie qui a fréquemment été retrouvée chez *Ae. albopictus* par des approches culturales (isolement) et moléculaires (Zouache et al., 2009). De plus, cette bactérie a été détectée en densité non négligeable dans l'intestin moyen ($3.3.10^{-1}$ bactéries/cellules) et les glandes salivaires (3.10^{-2}

bactéries/cellules) (Zouache et al., 2009). Ces deux organes étant des organes clefs dans le cycle de réplication des virus, les bactéries du genre *Acinetobacter* offrent également d'excellentes perspectives pour l'étude de l'interférence potentielle avec les pathogènes transmis. Ces observations posent donc la question de leur mode d'acquisition par le moustique tigre et leurs interactions réciproques.

2.3.3.3. Les autres membres du microbiote bactérien d'*Ae. albopictus*

Jusqu'à présent, les travaux visant à décrire les communautés bactériennes associées au moustique tigre ont été basées sur l'utilisation de méthodes cultivables (Zouache et al., 2011; Valiente Moro et al., 2013; Chouaia et al., 2014) et non cultivables à faible débit (Chouaia et al., 2010; Zouache et al., 2011, 2012). Sur moustiques entiers, toutes les méthodes ont révélé une dominance de bactéries appartenant aux phyla des Proteobactéries et des Firmicutes (Chouaia et al., 2010; Zouache et al., 2011, 2012; Valiente Moro et al., 2013). Plusieurs facteurs de variation ont été mis en avant pour expliquer la structuration des communautés bactériennes au sein des moustiques. Des études d'électrophorèse sur gel contenant un gradient de dénaturation (DGGE – Denaturating Grandient Gel Electrophoresis) de l'ADN ont montré que le microbiote bactérien des populations naturelles d'*Ae. albopictus* de Madagascar variait en fonction du site d'échantillonnage mais également du sexe du moustique (Zouache et al., 2011). De même, il a été montré que la diversité du microbiote des femelles était plus réduite que celle des mâles (Zouache et al., 2011). D'autre part, une étude effectuée par puce taxonomique a également démontrée que l'infection par le virus CHIKV était un facteur important de modulation du microbiote bactérien (Zouache et al., 2012). En effet, la densité de certaines bactéries appartenant aux classes des Bacteroidetes, Gamma et Alpha-Proteobactéries variait selon le statut d'infection virale des moustiques. Enfin, des méthodes d'empreinte génétique (PCR-DGGE) réalisées sur des moustiques d'Italie ont révélé une diversité du microbiote bactérien dominée par deux genres : *Burkholderia* et *Asaia* (Chouaia et al., 2010).

Mémoire expérimental

1. Introduction

Comme illustré dans la synthèse bibliographique, les bactéries symbiotiques jouent un rôle fondamental dans l'écologie, l'évolution et la physiologie des insectes; ces fonctions étant le plus souvent le fruit d'une évolution concertée entre les deux partenaires. Une meilleure compréhension de la biologie des insectes et de leur adaptation à l'environnement implique donc de prendre en compte l'évolution des interactions hôte-symbiotes. Jusque-là, la plupart des exemples d'interactions symbiotiques concernaient les insectes phytophages et en particulier les ravageurs des cultures. De façon surprenante, la diversité et le rôle des bactéries symbiotiques associées aux insectes hématophages, pourtant vecteurs de nombreux pathogènes humains et animaux, demeurent largement inexplorés.

Chez *Aedes albopictus*, des travaux préliminaires ont mis en avant certains genres bactériens pouvant être durablement associés avec le moustique tigre, en particulier les genres *Acinetobacter* et *Asaia* (voir chapitre 2.3.3.2. de la Synthèse Bibliographique). Une forte prévalence est l'une des caractéristiques majeure des interactions symbiotiques. C'est pourquoi, nous nous sommes attachés, dans un premier temps, à étudier la prévalence de ces deux taxons bactériens dans les populations naturelles du moustique. Afin de mieux comprendre les liens qui unissent ces bactéries au moustique, nous avons par la suite entrepris l'analyse de leur architecture génomique (nombre et taille des réplicons chromosomiques et plasmidiques) ainsi que de leur trait métabolique.

Au début de nos travaux, en dehors de la bactérie *Wolbachia*, peu de données existaient sur la composition des communautés bactériennes associées à *Ae. albopictus* et leurs facteurs de variation (voir chapitre 2.3.3.2. de la Synthèse Bibliographique). Or, la connaissance de ces communautés bactériennes est un préalable aux études de leur rôle dans la biologie du moustique. L'avènement récent des technologies de séquençage et des approches « omiques » permet aujourd'hui d'appréhender la complexité du vivant dans son ensemble et ainsi de déchiffrer la dynamique des associations insectes-symbiotes. Dans ce contexte, nous avons développé une approche de « Méta-taxogénomique » ou « Meta-barcoding » : un outil performant permettant une étude exhaustive et intégrée de la diversité bactérienne associée au moustique tigre. Pour cela, une étude pilote basée sur des populations de moustiques dont les communautés bactériennes avaient été précédemment étudiées par des méthodes classiques au sein de l'équipe, a été réalisée afin de définir les caractéristiques optimales pour le profilage à haut-débit des communautés bactériennes associées à *Ae. albopictus*. Par la suite, cette approche a permis de décrire et de comparer le microbiote bactérien de populations autochtones et invasives d'*Ae. albopictus*. Parallèlement, les données obtenues sur la diversité bactérienne ont été mises en regard

avec les données issues de la diversité génétique de l'hôte afin de mieux comprendre les relations qui unissent cet holobionte.

2. Etude des symbiotes secondaires : *Asaia* et *Acinetobacter*

2.1. Contexte et objectif général de l'étude

De par ses effets sur la reproduction et son interférence avec les pathogènes transmis, la bactérie endosymbiotique *Wolbachia* a été la bactérie le plus étudiée chez *Ae. albopictus*. Récemment, des études ont permis d'identifier la présence récurrente d'autres taxa bactériens, en particulier les bactéries du genre *Asaia* et *Acinetobacter* (Zouache et al., 2009, 2011; Chouaia et al., 2010). Outre leur caractère cultivable, ces bactéries offrent des perspectives d'étude intéressantes puisqu'elles ont été retrouvées à des densités relativement importantes au sein de différents organes du moustique (intestin, glandes salivaires), impliqués par ailleurs dans la réplication et la transmission virale (Zouache et al., 2009; Chouaia et al., 2010). De plus, en dehors d'*Ae. albopictus*, ces bactéries ont également été identifiées chez différents genres et espèces de moustiques comme *Aedes aegypti, Anopheles gambiae, Anopheles Stephensi, Culex pipiens pipiens, Culex pipiens quinquefascatus* (Pidiyar et al., 2004; Zayed and Bream, 2004; Crotti et al., 2009; Chouaia et al., 2010; Damiani et al., 2010; Cirimotich et al., 2011). Cependant, si ces deux bactéries ont été fréquemment identifiées au sein de populations naturelles ou de laboratoire, aucune étude n'a permis d'établir de manière précise leur prévalence au sein de populations naturelles de moustiques. Or, les symbiotes mutualistes sont souvent retrouvés à de fortes prévalences chez leur hôte puisque soumis à des pressions de sélection qui opèrent en faveur de leur maintien. De plus, si l'adaptation de microorganismes à un hôte peut se traduire par des acquisitions de gènes ou ilots génomiques favorisant le maintien de la bactérie au sein de cette niche écologique (Hacker and Carniel, 2001), elles peuvent également se traduire par des réductions génomiques lorsque l'interaction devient durable. Les éléments génétiques perdus dans le contexte des interactions durables sont souvent des gènes permettant la vie à l'état libre de la bactérie. Au sein de l'hôte, les fonctions des protéines codées par ces gènes deviennent non indispensables à la vie de la bactérie ou peuvent être compensées par des fonctions directement codées par l'hôte (Toft and Andersson, 2010).

Notre objectif a été d'étudier les caractéristiques de l'association entre le moustique *Ae. albopictus* et les bactéries *Acinetobacter* et *Asaia.* Pour cela, nous avons, dans un premier

temps, évalué la prévalence des deux bactéries dans les populations naturelles de moustiques. Puis nous nous sommes focalisés sur le genre *Acinetobacter* dont nous avons caractérisé l'architecture de génomes (nombre et taille des réplicons) ainsi que les capacités métaboliques de souches isolées d'*Ae. albopictus.*

2.2. **Publication n°2 : « Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* »**

Ces travaux ont été publiés en 2013 dans la revue ***FEMS Microbiology, Ecology*** - volume 83 p63-73.

FEMS MICROBIOLOGY ECOLOGY

RESEARCH ARTICLE

Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar

Guillaume Minard[1], Florence Hélène Tran[1], Fara Nantenaina Raharimalala[1,2], Eléonore Hellard[3], Pierre Ravelonandro[4], Patrick Mavingui[1] & Claire Valiente Moro[1]

[1]Université de Lyon, UMR5557 Ecologie Microbienne, CNRS, USC1190 INRA, VetAgro Sup, Université Lyon 1, Villeurbanne, France; [2]Département d'Entomologie de la Faculté des Sciences d'Antananarivo, Antananarivo, Madagascar; [3]Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, Université de Lyon, Université Lyon 1, CNRS, UMR 5558, Villeurbanne, France; and [4]Centre National de Recherche sur l'Environnement, Antananarivo, Madagascar

Correspondence: Claire Valiente Moro, UMR, CNRS 5557, Ecologie Microbienne, Université Lyon 1, 43 Boulevard du 11 Novembre 1918, 69622 Villeurbanne Cedex, France. Tel.: +33 472 433 565; fax: +33 472 431 223; e-mail: claire.valiente-moro@univ-lyon1.fr

Received 21 February 2012; revised 26 June 2012; accepted 6 July 2012.
Final version published online 9 August 2012.

DOI: 10.1111/j.1574-6941.2012.01455.x

Editor: Christoph Tebbe

Keywords
acetic bacteria; asian tiger mosquito; symbiosis; genomic diversity; metabolic repertoire.

Abstract

The presence of cultivable bacteria *Acinetobacter* and *Asaia* was recently demonstrated in the mosquito vector *Aedes albopictus*. However, it is not known how prevalent these bacteria are in field populations. Here, the presence of these bacteria in *Ae. albopictus* populations from Madagascar was diagnosed by amplification of 16S rRNA gene fragments. Both genera were detected at relatively high frequencies, 46% for *Asaia* and 74% for *Acinetobacter*. The prevalence of *Acinetobacter* correlated significantly with mosquito gender, and the prevalence of *Asaia* with the interaction between mosquito gender and the sampling site. For each bacterial genus, more male than female mosquitoes were infected. Using pulse field gel electrophoresis, no significant difference in genome size was found between *Acinetobacter* isolates from mosquitoes compared with free-living *Acinetobacter*. However, a great diversity was observed in plasmid numbers (from 1 to 12) and sizes (from < 8 to 690 kb). Mosquito isolates utilized fewer substrates than free-living isolates, but some substrates known as blood or plant components were specifically utilized by mosquito isolates. Therefore it is likely that a specific subpopulation of *Acinetobacter* is selected by *Ae. albopictus*. Overall, this study emphasizes the need to gain a global view on the bacterial partners in mosquito vectors.

Introduction

Mosquitoes are hematophagous insects that transmit many pathogens, such as those causing malaria, filariasis and arbovirosis, leading to millions of deaths every year (Christodoulou, 2011). Madagascar and its neighbouring islands have experienced severe epidemics of arboviruses, notably of chikungunya and dengue, and the mosquito species *Aedes albopictus* was identified as the primary vector responsible for these outbreaks (Ratsitorahina *et al.*, 2008). *Aedes albopictus* is able to transmit no fewer than 22 different viruses, so there have been many efforts to limit its expansion (Reiter, 1998) mainly by using chemical insecticides. However, negative consequences like the emergence of insecticide-resistant mosquitoes, environmental contamination and the extermination of non-target organisms have called chemical-based methods of control into question (David *et al.*, 2010). Alternative strategies of controlling insect-borne diseases have been proposed based on the use of symbiotic bacteria (Christodoulou, 2011; Hoffmann *et al.*, 2011). For a symbiont to be amenable as a biological control agent in this context, it needs to exhibit a certain level of prevalence, dominance and stability in the insect body (Riehle & Jacobs-Lorena, 2005).

Wolbachia is the most studied bacterial symbiont in *Ae. albopictus*, but recently two cultivable *Acinetobacter* and *Asaia* bacteria were found in this mosquito species (Crotti *et al.*, 2009; Zouache *et al.*, 2011), thus enlarging

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

the scope for research into possible biological control strategies. Members of the genus *Asaia* are *Alphaproteobacteria* able to produce acetic acid (Crotti *et al.*, 2010). The occurrence of *Asaia* was already reported in different insect species including the mosquitoes *Ae. albopictus* and *Aedes aegypti* (Crotti *et al.*, 2009; Chouaia *et al.*, 2010; Damiani *et al.*, 2010). In *Anopheles stephensi*, the Asian malaria mosquito vector, these bacteria are able rapidly to cross tissue barriers and disperse throughout the whole body of insect host (Favia *et al.*, 2007). Members of *Acinetobacter* are hosted by a number of insects (Dillon & Dillon, 2004), but their occurrence in hematophagous groups is poorly documented. Recently, different *Acinetobacter* species were found in natural populations of tsetse fly *Glossina* spp. (Geiger *et al.*, 2009) and *Ae. albopictus* (Zouache *et al.*, 2011). Both *Asaia* and *Acinetobacter* are found in the mosquito organs where viruses replicate (Crotti *et al.*, 2009; Zouache *et al.*, 2009) and they can be cultured and genetically transformed, so it may be possible to exploit these properties to study hematophagous insect-microorganism interactions in more depth.

The objective of this study was to survey the prevalence of *Asaia* and *Acinetobacter* in natural populations of *Ae. albopictus* from Madagascar with respect to insect gender and ecological behaviour. To discover possible bacterial signatures of genomic adaptation, *Acinetobacter* isolates obtained in the survey were compared by plasmid and metabolic profiling.

Materials and methods

Sampling areas and mosquito collection

The sampling areas and capture procedure were approved by Madagascar National Parks. Mosquito samples were collected in December 2010 at four sites in three regions of Madagascar: Analamanga, Antsinanana and Vatovavy-Fitovivany. Samples that had been collected from another site in the Diana region in December 2009 were also included in the survey. The main characteristics of the sampling sites are given in Table 1. Butterfly netting was used to collect both female and male mosquitoes flying just above grass or the ground. Some laboratory-reared insects that had been collected as pupae 1 year before at Tsimbazaza Park were also studied. *Aedes albopictus* males and females were identified using morphological characteristics keys (Ravaonjanahary, 1978). Only non-blooded mosquitoes were used for the analysis. Most mosquitoes were stored in tubes containing 70% ethanol while the remainder were kept alive and transported to the microbiology laboratory for bacterial isolation.

Genomic DNA extraction and diagnostic PCR of the *rrs* gene

DNA was extracted from 30 male and 30 female mosquitoes selected from the samples collected at each site as previously described (Zouache *et al.*, 2011). PCR amplification of bacterial 16S rRNA-encoding *rrs* genes was done using 30 ng of DNA template in 25 μL of reaction mixture containing 1× buffer (Roche, Switzerland), 40 μM of each deoxynucleoside triphosphate, 0.2 μM each of primers pA and pH (primer details in Supporting Information, Table S1), 0.06 mg mL^{-1} T4 gene protein 32 (Roche) and 0.028 U of Expand DNA polymerase (Roche, France). Nested PCR was then used to screen for the presence of *Asaia* and *Acinetobacter* DNA in positive *rrs* PCR products (1 μL). Reactions (25 μL) containing 1× polymerase reaction buffer (Invitrogen, France), 1.5 mM $MgCl_2$, 40 μM of each deoxynucleoside triphosphate,

Table 1. Ecoclimatic characteristics of mosquito *Aedes albopictus* sampling sites

Region	Site (GPS coordinates)	Zone	Climate	Vegetation	Potentially bitten hosts
Antsinanana	Toamasina (18°8′59.64″S, 49°24′8.312″E)	City on coast	Hot, humid	Bushes, fruit trees	Humans, chickens, ducks
Vatovavy-Fitovivany	Mananjary (21°13′52″S, 48°20′30.999″E)	City on coast	Hot, humid	Bushes, fruit trees	Humans, chickens, ducks
Analamanga	Tsimbazaza Park (18°55′40.395″S, 47°31′38.5″E)	City	Highland	Bushes, fruit trees	Humans, lemurs, reptiles, birds
	Ankazobe (18°18′58.1″S, 47°7′6.351″E)	Village outskirts	Wet, cool	Bamboo forest (with tyres on ground)	Humans, chickens
Diana	Diego-Suarez (12°16′51.24″S, 49°17′27.092″E)	City on coast	Hot, humid	Bushes, fruit trees	Humans, chickens, ducks

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

0.2 μM of each primer pair (Table S1) and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Invitrogen) were carried out in a T-Gradient Thermocycler (Biometra, France). *Acinetobacter* and *Asaia* DNA was amplified as previously described (Crotti *et al.*, 2009; Zouache *et al.*, 2009). For each set of PCR reactions, bacterial DNA extracts from reference strains *Acinetobacter* ATCC 23055 and *Asaia* ATCC BAA-21 were used as positive controls. Amplified DNA fragments were separated by electrophoresis through 1% or 1.5% agarose gels stained with ethidium bromide and visualized under ultraviolet illumination.

Sequencing bacterial *rrs* and mitochondrial genes and phylogenetic analyses

From the diagnostic PCR described above, five positive PCR products were randomly selected for both male and female mosquitoes from each bacterial genus and for each sampling site. Mitochondrial genes encoding cytochrome oxidase I (COI) and NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) were also sequenced from three males and three females per site, as previously described (Raharimalala *et al.*, 2012). PCR products were sequenced at Biofidal-DTAMB (FR Bio-Environment and Health, Lyon, France) and the sequences were analysed with the BLASTN program (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi). *Acinetobacter* sequences were used to construct phylogenetic trees, but *Asaia* sequences were too short to be analysed at the species level (Table S1). Sequences were aligned using CLUSTALW and then adjusted manually using BIOEDIT software (Tom Hall). The resulting alignment was used to construct a maximum-likelihood tree using SEAVIEW v.4.2.12. (http://pbil.univ-lyon1.fr/software/seaview.html). The tree topology was tested by bootstrap analysis with 1000 resamplings. The sequence of *Moraxella lacunata* (AF005160) was used as an outgroup.

Enrichment, isolation and identification of *Acinetobacter*

Field-caught live mosquito specimens were anaesthetized with ether. Six adult mosquitoes per site (three males and three females) were surface-disinfected and crushed individually in 150 μL sterile 0.8% NaCl. Homogenates (10 μL) were streaked directly on plates containing a modified rich solid Luria–Bertani medium containing NaCl at 5 mg mL^{-1} (LBm) then incubated at 26 °C. Homogenates (20 μL) were also added to 1 mL of enrichment medium (0.2% KNO_3, 0.02% $MgSO_4{\cdot}7H_2O$, 0.2% sodium acetate, 0.04 M KH_2PO_4, pH 6.0; Bouvet & Joly-Guillou, 2000) and incubated at 30 °C for 24–48 h with shaking. When microbial growth occurred, an 10-μL aliquot of the culture was streaked onto Herellea agar plates (Biolife, Italy; Mandel *et al.*, 1964) and incubated at 37 °C for 24–48 h. Single distinct colonies of different colours or shapes were selected and re-inoculated onto fresh agar plates of the corresponding medium. Resultant colonies were streaked out again to check for purity and samples were stored in 25% glycerol at −80 °C. All isolates were screened by colony PCR amplification of the *rrs* gene using specific primers for *Acinetobacter*. For this, a single colony was suspended in 25 μL sterile water and boiled for 2 min, then placed on ice for 2 min. The boiling and cooling steps were repeated followed by centrifugation at 16 100 ***g*** for 5 min. Each 50-μL reaction contained 2 μL supernatant, 1× PCR buffer, 2 mM $MgCl_2$, 0.5 mM dNTP, 0.5 μM of each primer Acin1 and Ac (Table S1) and 1 U Taq Polymerase (Invitrogen). PCR conditions, sequencing of positive PCR products and analysis were as described above. Complete *rrs* genes of *Acinetobacter* isolates were amplified by colony PCR using the universal bacterial primers pA and pH (Table S1).

Assays for carbon and nitrogen source utilization

The Biolog (Hayward, CA) Phenotype MicroArrays (PM) system and the Omnilog reader (Hayward, CA) were used to study the metabolic profiles of the different *Acinetobacter* isolates and reference strains (Table S2). Standard commercial microplates (PM1–3) were used to simultaneously test for the ability of the microorganism to oxidize a panel of 190 different carbon sources (PM1 and PM2) and 95 different nitrogen sources (PM3), following the manufacturer's standard operating conditions. The PM plates were placed in an aerobic OmniLog incubator at 28 °C to collect signal data every 15 min for 48 h. The signal data (conversion of pixel density to a signal value reflecting cell growth) were analysed using BIOLOG MICRO-LOG3 4.20 software (Biolog, Inc.) and the average signal value for each well was exported to MICROSOFT OFFICE EXCEL (Microsoft) to be compiled. Substrate utilization was scored as positive when its growth value was at least 20% of the growth value recorded on D-alanine, a substrate used by all the strains (i.e. growth value of 100%).

Plasmid content

Two different methods were used to search for the presence of plasmids in *Acinetobacter*. To identify high molecular-weight plasmids, the procedure of Eckhardt (1978) was used with the modifications previously described (Mavingui *et al.*, 2002). For this, *Acinetobacter* strains were grown in LBm until the optical density of the culture at 600 nm reached 0.5, then 300 μL of culture

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

was analysed. Electrophoresis was carried out at 10 V for 20 min and 85 V for 210 min. To identify lower molecular-weight plasmids, a second method described by Seifert *et al.* (1994) was used. The size of a plasmid was estimated by comparing its mobility in agarose gels to the mobility of plasmids from sequenced *Azospirillum* genomes (Caballero-Mellado *et al.*, 1999; Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011) and standard supercoiled plasmids (Life Technologies, Inc.).

Pulse field gel electrophoresis

The undigested genomes of *Acinetobacter* isolates were analysed by pulse field gel electrophoresis (PFGE) according to published protocols with some modifications (Schwartz & Cantor, 1984). Briefly, isolates were grown in LBm liquid medium for 18 h at 30 °C. Bacteria were subcultured to ensure they were pure. Cell cultures were centrifuged at 5000 ***g*** for 20 min at 4 °C. The pellet was washed once and resuspended in 1× Tris-EDTA buffer. The optical density of the suspension at 600 nm was adjusted to 1.8 and 2.0. An equal volume of a 1.6% low melting-point agarose (Bio-Rad) was mixed with cell suspensions and 150 μL of the mixture was placed in a plug mould (Bio-Rad). Cells were lysed using a lysis solution (2× Tris NaCl EDTA, 10% sodium lauroyl sarcosinate, 1.4 mg mL^{-1} lysozyme) at 37 °C for 24 h, then proteins digested with 0.5 mg mL^{-1} proteinase K (Euromedex) in 0.5 M EDTA pH 8 and 1% *N*-lauryl-sarcosine at 37 °C for 48 h. Electrophoresis was carried out in 0.8% chromosomal-grade agarose in 1× TAE buffer using a CHEF Mapper XA (Biorad, France) at 14 °C, a constant pulse of 500 ms and a field angle of 106° for 48 h at 3 V cm^{-1}.

Statistical analysis

To investigate the effect of sampling site and mosquito gender on the prevalence of each bacterial genus in the field populations, logistic regression models were built considering all possible combinations of additive effects and interactions. The most appropriate model was selected for each type of bacterium using the Akaike information criterion (AICc) adjusted for small sample size (Anderson *et al.*, 1994). The models were ranked according to the smallest AICc differences (denoted ΔAICc) between the focal model and the lowest AICc model. When ΔAICc was larger than 2, the model with the smallest AICc was selected. Parameter estimates were obtained by the method of maximum likelihood. Possible interactions between both bacteria were sought using the corrected chi-squared method (Hellard *et al.*, 2012). To take account of factors that could potentially create statistical associations (i.e. false interactions), both identified risk factors for the two bacteria (i.e. the mosquito sex and the sampling site) were included in the logistic regression model to estimate the expected frequencies. All analyses were performed in R software (R Development Core Team, 2009).

Nucleotide sequence accession numbers

The CO1 and ND5 gene sequences were submitted to GenBank under accession numbers JN406664–JN406666, JN406668–JN406670, JN406694, JN406697, JN406700–JN406705, JN406709–JN406711, JN406714, JN406715, JN406727–JN406732, JN406738–JN406740, JN406742–JN406744, JN406763–JN406767, JN406771–JN406776, JN406779–JN406783, JN406789–JN406794, JN406804–JN406809, and JN406840–JN406844. The rRNA gene sequences obtained from direct PCR amplification (JN379293–JN379351) and from *Acinetobacter* isolates (JQ408696–JQ408701 and JQ627634) are also available in GenBank.

Results

Prevalence of *Acinetobacter* and *Asaia* in *Ae. albopictus*

Alignment of all COI and ND5 gene sequences of *Ae. albopictus* showed polymorphism of only 0.01% and 0.004%, respectively (not shown), revealing a strong phylogenetic relationship between mosquito populations from the five sampling sites. Diagnostic PCR amplification of the 16S rRNA-encoding *rrs* gene was used to assess the prevalence of *Acinetobacter* and *Asaia* in field and laboratory-reared populations of *Ae. albopictus*. The overall infection frequencies were quite similar between field and laboratory populations (Table 2) with a higher infection frequency

Table 2. Prevalence of *Acinetobacter* and *Asaia* in *Aedes albopictus*

	Total		Male		Female	
	Acinetobacter	*Asaia*	*Acinetobacter*	*Asaia*	*Acinetobacter*	*Asaia*
Laboratory populations	70% (35/50)	46% (23/50)	59% (19/32)	28% (9/32)	89% (16/18)	78% (14/18)
Field populations	74% (184/249)	46% (117/252)	79% (96/121)	43% (53/122)	69% (88/128)	49% (64/130)

Number of infected mosquito individuals vs. number of mosquito individuals analysed is indicated in parentheses.

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

for *Acinetobacter* (around 70%) than for *Asaia* (46%). Infection frequencies were compared between field populations sampled in the same year, i.e. data from specimens from the Diego site in the Diana region were excluded from the statistical analysis. According to the AICc, the best logistic regression model to explain *Acinetobacter* prevalence included the gender effect (Table S3), which is in keeping with the statistical analysis showing a significant difference in infection frequencies according to the sex of the mosquito. Males are two times more infected than females ($P = 0.04$, Table S3), contrary to what was observed in laboratory populations. For *Asaia*, the selected model included the interaction between the sex and the sampling site ($P = 3.84 \times 10^{-11}$; Table S3). Males tended to be more infected than females except in Mananjary, where the opposite was true (Table S4). When the identified risk factors (i.e. mosquito sex and sampling site) were taken into account, a probable interaction between the two bacteria was also revealed ($\chi^2_{corr} = 6.45124$, $P = 0.001$). Double-infected mosquitoes account for 50% (119/237) of the total caught, with proportionally more double-infection of females (54%) than of males (47%). This interaction seems to be synergistic because more double-infected mosquitoes were observed than would be expected if the bacteria acted independently.

The partial sequences of *rrs* genes amplified from the *Acinetobacter*-positive mosquito samples allowed them to be presumptively assigned to seven species with percentages of identity ranging from 96% to 100%: *Acinetobacter baumanii*, *Acinetobacter junii*, *Acinetobacter johnsonii*, *Acinetobacter schindlerii*, *Acinetobacter calcoaceticus* and *Acinetobacter lwoffii*. A phylogenetic tree clusters the sequences of the different species of *Acinetobacter* with those obtained after colony isolation and those from corresponding reference strains (Fig. 1).

Molecular characterization of *Acinetobacter* isolates from *Ae. albopictus*

Attempts were made to culture bacteria from *Ae. albopictus* mosquito samples. Diagnostic PCR allowed to identify four isolates potentially affiliated with *Acinetobacter*. On the basis of the nearly complete *rrs* gene sequences obtained (1409–1467 bp long), two isolates cultured on Herellea agar plates were judged to be affiliated to *A. baumanii* and two isolates cultured on LBm to *A. lwoffii*. To further characterize these isolates from mosquitoes, they were compared to five additional strains: one from *A. calcoaceticus*, two from *A. johnsonii* that had been isolated from *Ae. albopictus* in our previous study (Zouache *et al.*, 2011), and two other *Acinetobacter* sp. isolates recovered from water in which *Ae. albopictus* larvae were breeding in the laboratory (Table S2).

PFGE was used to analyse the genetic material of isolates. All isolates contained a high molecular-weight replicon (*c.* 3 Mb) which considered alongside sequenced reference genomes probably corresponds to the bacterial chromosome (Fig. 2). A second replicon (*c.* 1 Mb) is also seen in the PFGE pattern from mosquito isolates 1b, 3a and 8 and reference strains Ref-1, Ref-3 and Ref-4. Intra-specific comparisons showed that mosquito isolates of *A. lwoffii* (2a and 2b) and *A. calcoaceticus* (3a) had a similar pattern to one of their corresponding reference strains. For *Acinetobacter baumannii*, only one of the two mosquito isolates (1b) had a similar PFGE pattern to that of the reference strain. By contrast, the PFGE patterns produced from mosquito isolates of *A. johnsonii* (4a and 4b) were similar to each other yet distinct from their reference strain. Isolates 8 and 9 from medium in which laboratory mosquitoes had been bred had PFGE profiles closely related to that of the *A. johnsonii* reference strain. A great diversity in both the number and size of plasmids was observed both between isolates and between isolates and their respective reference strains (Fig. 3). With the Eckhardt procedure for lysis and plasmid extraction it was possible to detect low molecular-weight (up to 75 kb) and high molecular-weight (up to 690 kb) plasmids (Fig. 3). The mosquito isolates of *A. lwoffii* contained the most plasmids (> 12 replicons).

Metabolic characteristics of *Acinetobacter* isolates

The metabolic capabilities of *Acinetobacter* isolates were explored using BIOLOG assays. Two independent experiments were done giving similar results. The bacterial strains were found to have different capacities for substrate utilization with both broad and narrow spectra suggesting variability in endogenous enzymatic activities (Table S5). The reference strains tend to utilize a broader spectrum of substrates than isolates from mosquitoes: 36.3% vs. 28.5% for *A. calcoaceticus*, 20.7% vs. 18.8% for *A. johnsonii*, 22.2% vs. 15.1% for *A. lwoffii* and 28.5% vs. 29.1% for *A. baumannii*, respectively. At the intra-species level, some substrates were specifically used by reference strains whereas others were catabolized only by mosquito isolates (Table 3).

Discussion

This study provides an estimate of the prevalence of *Acinetobacter* and *Asaia* in natural populations of the mosquito *Ae. albopictus* in Madagascar. The overall infection frequency of *Acinetobacter* (*c.* 70%) was higher than that of *Asaia* (*c.* 46%). High prevalence is one of the criteria that may indicate there is an intimate symbiotic

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

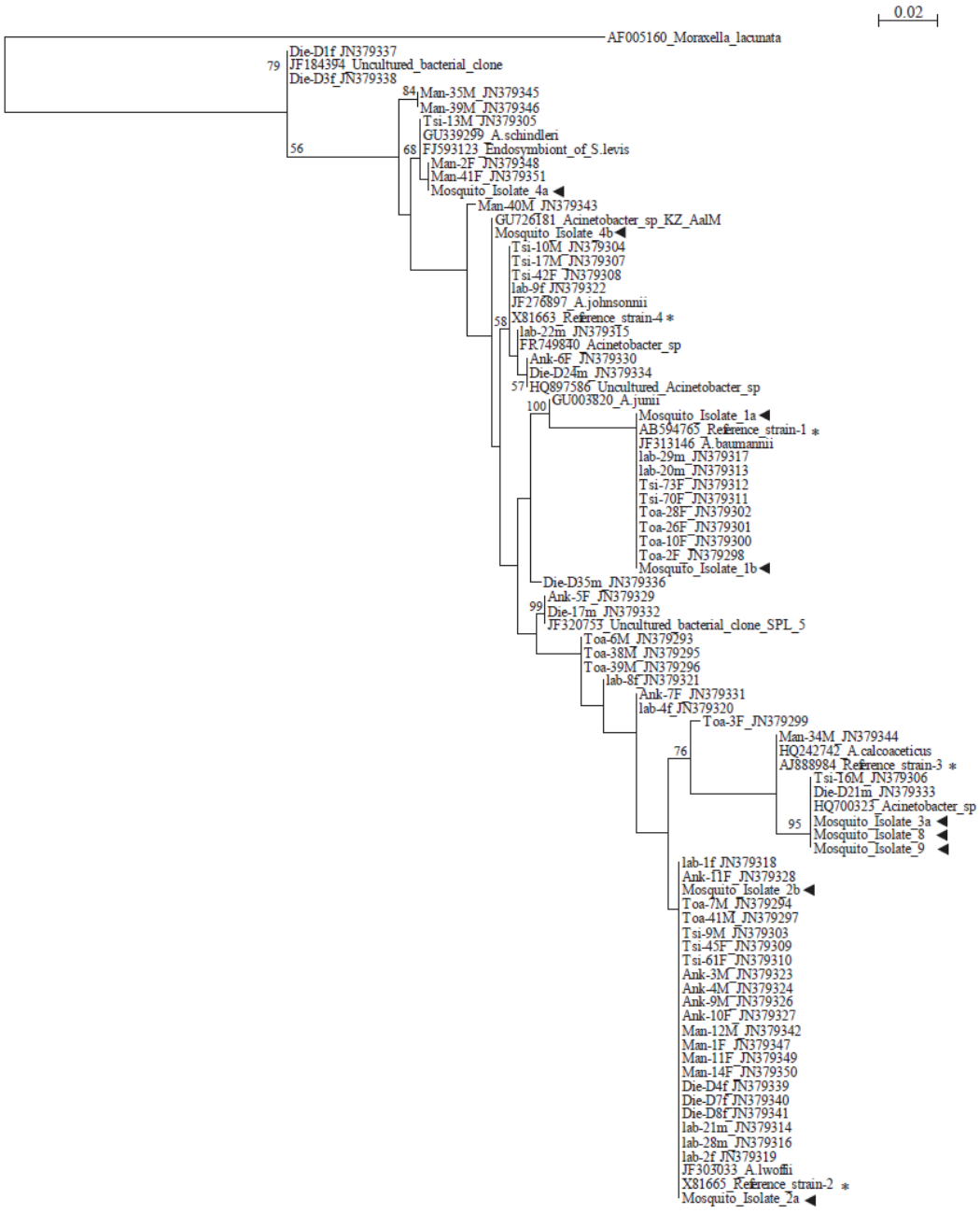


Fig. 1. Maximum-likelihood phylogenetic tree comparing a region of bacterial 16S rRNA gene sequences. Samples are named according to the sampling site (Man, Mananjary; Ank, Ankazobe; Tsi, Tsimbazaza; Toa, Toamasina; Die, Diego; lab, laboratory-reared populations) followed by the number of the sample and the sex of the mosquito (M, male; F, female). Sequence accession numbers are indicated next to the sequence name. The sequence of *Moraxella lacunata* (AF005160) was used as an outgroup and bootstrap values (1000 tree replications) higher than 50% are indicated at the nodes of the tree. Mosquito isolates 1a, 1b, 2a, 2b, 3a, 4a, 4c are indicated by arrows and reference strains are indicated by asterisks.

relationship between a given bacterium and its host. Previous studies demonstrated that the *Asaia* genus was 100% prevalent in laboratory populations of *Ae. albopictus* (Chouaia *et al.*, 2010). Here we report the much lower prevalence of *Asaia* in natural populations of *Ae. albopictus* from Madagascar. This difference suggests that environmental factors strongly influence prevalence. Members of the genus *Asaia* are widely distributed in nectar-bearing flowers (Yamada & Yukphan, 2008), whereas *Acinetobacter* are mostly free-living saprophytes

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

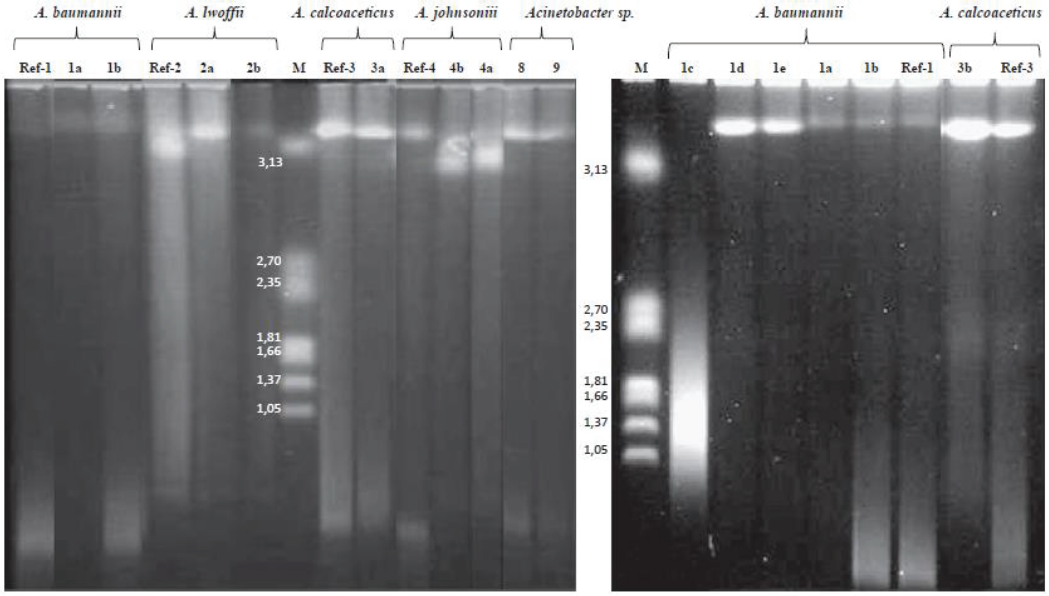


Fig. 2. PFGE of undigested genomic DNA of *Acinetobacter* mosquito isolates and their reference strains. Chromosomal DNA from *Hansenula wingei* (M) was used as a reference (BioRad). Characteristics of the samples are given in Table S2.

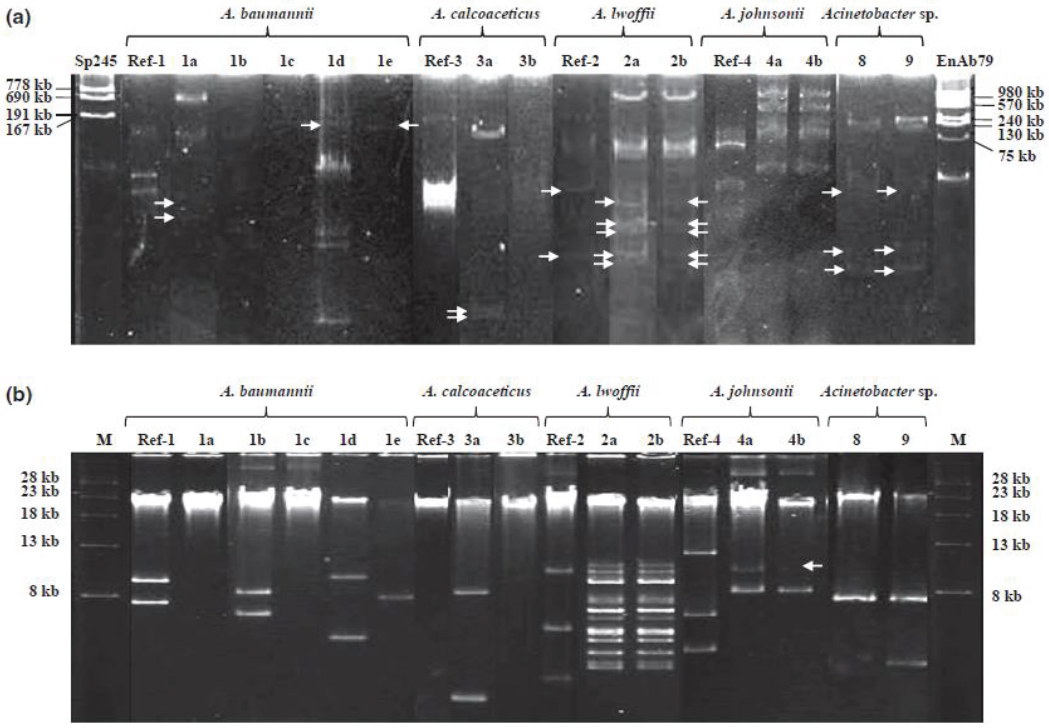


Fig. 3. Electrophoretic profiles of plasmids from *Acinetobacter*. Characteristics of the samples are given in Table S2. (a) Electrophoretic profiles of high molecular-weight plasmids obtained by a modified Eckhardt procedure. Plasmids from *Azospirillum brazilense* strains En-Ab79 and Sp245 were used as references (Caballero-Mellado *et al.*, 1999; Wisniewski-Dyé *et al.*, 2011). (b) Electrophoretic profiles of low molecular-weight plasmids obtained by the procedure of Seifert *et al.* (1994). Standard supercoiled plasmids (Life Technologies, Inc.) were used as references (M). Photograph quality was improved using ADOBE PHOTOSHOP ELEMENTS 6.0 (Adobe).

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

Table 3. Differential substrate utilization between *Acinetobacter* mosquito isolates and their reference strains

	Acinetobacter calcoaceticus	*Acinetobacter baumannii*	*Acinetobacter johnsonii*	*Acinetobacter* sp.
Carbohydrates	D-galactose, D-mannose, D-melibiose, L-lyxose, glucuronamide, β-D-allose, D-fucose, gentiobiose, D-glucosamine, D-hydroxyacétone, D-saccharic acid, mucic acid dextrin, D-ribono-1,4-lactone	α-D-glucose	L-arabinose, D,L-lactamide	L-arabinose, D-xylose
Carboxylates	Formic acid, oxalomalic acid D-L carnitine	D-malic acid, α-keto valeric acid, D- L carnitine	γ-amino butyric acid capric acid, β-hydoxy butyric acid 4-hydroxy-benzoic acid sebacic acid	Mono-methyl-succinate, β-hydroxy-butyric acid acetoacetic acid
Amino acids	D-aspartic acid, glycyl-L-aspartic acid, glycyl-L-glutamic acid, L-threonine, L-alanyl-glycyl, glycyl-L-proline, L-isoleucine, L-leucine, L-valine, alanine-asparagine, alanine-glutamine, alanine-glycine, glycine-asparagine, glycine-glutamine, glycine-methionine alanine-threonine	L-isoleucine, L-ornithine, glycine, D-asparagine	L-aspartic acid, L-glutamic acid, L-asparagine, L-glutamine, L-pyroglutamic acid, L-citrulline, D,L-α-amino-N-butyric acid, γ-amino-N-butyric acid, δ-amino-N-valeric acid tyramine	δ-amino-N-valeric acid, alanine-glutamine, methionine-alanine D,L-α-amino-caprylic acid
Alcohol	2,3-butanediol			
Amide			Formamide	
Amine	Ethalonamine		Methylamine	
Nitrogen				Nitrate
Nucleic acids	Adenine, guanine, xanthine, inosine		Biuret guanosine, xanthine	Biuret, guanine, guanosine, uracil

Not underlined, substrates only used by the reference strain.
Underlined, substrates only used by *Acinetobacter* mosquito isolates.

often present in the rhizosphere, in water, or on the skin of vertebrates (Doughari *et al.*, 2011). Interestingly, these ecological niches can also all be used by mosquitoes as food sources or for laying eggs, hatching larvae, or resting. Sharing such environments may thus favour encounters between mosquitoes and these bacteria. Sex effects on the composition and diversity of mosquito-associated bacteria have already been reported in natural populations of *Ae. albopictus* (Zouache *et al.*, 2011). Both intrinsic genetic characteristics and ecological behaviour may account for such differences. In particular, only females are hematophagous. Previous studies reported that members of *Asaia* and *Acinetobacter* may cause opportunistic infections in humans (Alauzet *et al.*, 2010; Doughari *et al.*, 2011), raising the possibility that cross-infection could occur when mosquitoes bite hosts. In addition, females scatter over a wider area than males when looking for a breeding site, increasing the chance of encountering these bacteria. Our findings revealed a possible synergy between the two types of bacteria, although we cannot exclude the possibility that they share an unknown risk factor that could create a statistical association between the bacteria or that some mosquito individuals are particularly sensitive to multiple infections.

The high prevalence of *Acinetobacter* found in our study raises questions as to how the bacterium is acquired and transmitted. Using fluorescent *in situ* hybridization, *Acinetobacter* has been localized in the midgut but not in the ovaries of *Ae. albopictus* (Zouache *et al.*, 2009), so the bacteria are likely to be acquired from the environment. However, this does not exclude the possibility of vertical transmission by other mechanisms such as coprophagy, paternal transmission or egg-smearing (Kikuchi, 2009). Experimental infection showed that *Asaia* could be transmitted both vertically and horizontally from parents to offspring (Crotti *et al.*, 2009). Surprisingly, the *Asaia* infection prevalence reported here does not strongly support the assumption of a high vertical transmission rate. On the contrary, the high prevalence of *Acinetobacter* suggests efficient transmission and maintenance within host populations, indicating a possible role in the biology of the mosquito in nature. As yet, the role of *Acinetobacter* in insect biology has only been demonstrated in *Stomoxys calcitrans*, which need these bacteria to ensure complete

© 2012 Federation of European Microbiological Societies

development of the fly larvae (Lysyk *et al.*, 1999). It has already been shown that some *Acinetobacter* species are efficient pollutant degraders (Lal & Khanna, 1996). As *Ae. albopictus* is able to invade suburban areas and survive in polluted zones (Mousson *et al.*, 2005), it is possible that *Acinetobacter*-associated mosquitoes have an improved capacity to colonize and adapt to anthropized environments. A potential role for *Asaia* in the biosynthesis of vitamins in the mosquito species *Anopheles stephensi* was suggested by Crotti *et al.* (2009).

To gain more insight into the mosquito–bacteria interactions, the genetic contents and metabolic capabilities of *Acinetobacter* mosquito isolates and their free-living relatives were compared. Despite considerable effort, only a few *Acinetobacter* were isolated from field-caught *Ae. albopictus*, contradicting somewhat the high prevalence of *Acinetobacter* detected by molecular methods. The seven *Acinetobacter* isolated from *Ae. albopictus* were phylogenetically closely related to the species *A. calcoaceticus*, *A. baumanii*, *A. lwoffii* and *A. johnsonii*. The estimated genome sizes of *Acinetobacter* isolates (*c.* 3 Mb) were similar to those of *Acinetobacter* strains reported in published databases ranging from 3.59 to 4.05 Mb (Fondi *et al.*, 2010). It is well known that plasmids are among the most important elements in the evolution of prokaryotes and their adaptation to fluctuating environmental conditions (Eberhard, 1990). The presence and wide diversity of plasmids in *Acinetobacter* isolates may suggest these genetic elements have a biological role. The functions of many plasmids of *Acinetobacter* isolates have yet to be identified but some have been associated with metabolic activities or metal resistance (Winstanley *et al.*, 1987; Schembri *et al.*, 1994; Mengoni *et al.*, 2007). Information on phenotypic traits is a useful complement to genomic data (Bochner *et al.*, 2010), so substrate utilization assays were performed to investigate whether the variation observed at the DNA level also reflected variation in the metabolic potential of *Acinetobacter* isolates. Fairly large metabolic differences were found between the *Acinetobacter* isolates, and this may related to their phylogenetic relationships given that the nine isolates belonged to distinct genotypes (Geiger *et al.*, 2011). Some *Acinetobacter* isolates from mosquitoes were unable to utilize certain substrates metabolized by the reference strains, suggesting that substantial changes in gene content or regulation or both had occurred. Conversely, some substrates were only used by mosquito-associated strains. For example, amino acids α-keto valeric acid and glycine, which are blood components, were only metabolized by the isolates of *A. baumannii* from mosquitoes, whereas 4-hydroxybenzoic acid and xylose, which are common constituents of plants, were only metabolized by *A. johnsonii* isolates from mosquitoes. Possibly these bacterial isolates improve blood digestion and nectar assimilation respectively by the insect host. Using this approach, a phenotypic or genotypic subpopulation of *Acinetobacter* from mosquitoes appears to be selected from the surrounding environment.

In conclusion, this study demonstrated the relatively high occurrence of *Acinetobacter* and *Asaia* within the mosquito *Ae. albopictus*. This bacterial prevalence significantly correlated with the sex of the mosquito and environmental factors, notably the climate and ecology. The variability observed emphasizes the need to gain a global view of the diversity and genetic potential of bacterial partners in mosquito vectors.

Acknowledgements

We are grateful to Madagascar National Parks for authorizing the collection of wild mosquitoes under ethical approval. We thank Sylvie Nazaret for providing *Acinetobacter* reference strain isolates from patients. Guillaume Minard was a Masters student supported by the Centre National de la Recherche Scientifique and a grant from La Région Rhône-Alpes. This work was partially funded by the grant FRB-CD-AOOI-07-10, and was carried out within the frameworks of GDRI 'Biodiversité et Développement Durable à Madagascar' and COST action F0701 'Arthropod Symbioses: from fundamental to pest disease management'.

References

Alauzet C, Teyssier C, Jumas-Bilak E, Gouby A, Chiron R, Rabaud C, Counil F, Lozniewski A & Marchandin H (2010) *Gluconobacter* as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. *J Clin Microbiol* **48**: 3935–3942.

Anderson DR, Burnham KP & White GC (1994) AIC model selection in overdispersed capture-recapture data. *Ecology* **75**: 1780–1793.

Bochner B, Gomez V, Ziman M, Yang S & Brown SD (2010) Phenotype microarray profiling of *Zymomonas mobilis* ZM4. *Appl Biochem Biotechnol* **161**: 116–123.

Bouvet PJM & Joly-Guillou ML (2000) *Acinetobacter* (Freney J, Renaud F, Hansen W & Bollet C, eds), pp. 1239–1258. Précis de bactériologie Clinique, Editions ESKA, Paris.

Caballero-Mellado J, López-Reyes L & Bustillos R (1999) Presence of 16S rRNA genes in multiple replicons in *Azospirillum brasilense*. *FEMS Microbiol Lett* **178**: 283–288.

Chouaia B, Rossi P, Montagna M *et al.* (2010) Molecular evidence for multiple infections as revealed by typing of *Asaia* bacterial symbionts of four mosquito species. *Appl Environ Microbiol* **76**: 7444–7450.

Christodoulou M (2011) Biological vector control of mosquito-borne diseases. *Lancet Infect Dis* **11**: 84–85.

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

Crotti E, Damiani C, Pajoro M *et al.* (2009) *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environ Microbiol* **11**: 3252–3264.

Crotti E, Rizzi A, Chouaia B *et al.* (2010) Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Appl Environ Microbiol* **76**: 6963–6970.

Damiani C, Ricci I, Crotti E *et al.* (2010) Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microb Ecol* **60**: 644–654.

David J-P, Coissac E, Melodelima C, Poupardin R, Riaz MA, Chandor-Proust A & Reynaud S (2010) Transcriptome response to pollutants and insecticides in the dengue vector *Aedes aegypti* using next-generation sequencing technology. *BMC Genomics* **11**: 216.

Dillon RJ & Dillon VM (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu Rev Entomol* **49**: 71–92.

Doughari HJ, Ndakidemi PA, Human IS & Benade S (2011) The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: an overview. *Microbes Environ* **26**: 101–112.

Eberhard WG (1990) Evolution in bacterial plasmids and levels of selection. *Q Rev Biol* **65**: 3–22.

Eckhardt T (1978) A rapid method for the identification of plasmid desoxyribonucleic acid in bacteria. *Plasmid* **1**: 584–588.

Favia G, Ricci I, Damiani C *et al.* (2007) Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc Natl Acad Sci U.S.A* **104**: 9047–9051.

Fondi M, Bacci G, Brilli M, Papaleo MC, Mengoni A, Vaneechoutte M, Dijkshoorn L & Fani R (2010) Exploring the evolutionary dynamics of plasmids: the *Acinetobacter* pan-plasmidome. *BMC Evol Biol* **10**: 59.

Geiger A, Fardeau M-L, Grebaut P, Vatunga G, Josénando T, Herder S, Cuny G, Truc P & Ollivier B (2009) First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis palpalis*) midgut. *Infect Genet Evol* **9**: 1364–1370.

Geiger A, Fardeau M-L, Njiokou F, Joseph M, Asonganyi T, Ollivier B & Cuny G (2011) Bacterial diversity associated with populations of *Glossina* spp. from Cameroon and distribution within the Campo sleeping sickness focus. *Microb Ecol* **62**: 632–643.

Hellard E, Pontier D, Sauvage F, Poulet H & Fouchet D (2012) True versus false parasite interactions: a robust method to take risk factors into account and its application to feline viruses. *PLoS ONE* **7**: e29618.

Hoffmann AA, Montgomery BL, Popovici J *et al.* (2011) Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* **476**: 454–457.

Kikuchi Y (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes Environ* **24**: 195–204.

Lal B & Khanna S (1996) Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *J Appl Bacteriol* **81**: 355–362.

Lysyk TJ, Kalischuk-Tymensen L, Selinger LB, Lancaster RC, Wever L & Cheng KJ (1999) Rearing stable fly larvae (Diptera: Muscidae) on an egg yolk medium. *J Med Entomol* **36**: 382–388.

Mandel AD, Wright K & McKinnon JM (1964) Selective medium for isolation of mima and herellea organisms. *J Bacteriol* **88**: 1524–1525.

Mavingui P, Flores M, Guo X, Dávila G, Perret X, Broughton WJ & Palacios R (2002) Dynamics of genome architecture in *Rhizobium* sp. strain NGR234. *J Bacteriol* **184**: 171–176.

Mengoni A, Ricci S, Brilli M, Baldi F & Fani R (2007) Sequencing and analysis of plasmids pAV1 and pAV2 of *Acinetobacter venetianus* VE-C3 involved in diesel fuel degradation. *Ann Microbiol* **57**: 521–526.

Mousson L, Dauga C, Garrigues T, Schaffner F, Vazeille M & Failloux A-B (2005) Phylogeography of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (L.) and *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet Res* **86**: 1–11.

R Development Core Team (2009) *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna. Available at: http://www.R-project.org.

Raharimalala FN, Ravaomanarivo LH, Ravelonandro P *et al.* (2012) Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasit Vectors* **20**: 56.

Ratsitorahina M, Harisoa J, Ratovonjato J, Biacabe S, Reynes JM, Zeller H, Raoelina Y, Talarmin A, Richard V & Soares JL (2008) Outbreak of dengue and Chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg Infect Dis* **14**: 1135–1137.

Ravaonjanahary C (1978) *Les Aedes* de Madagascar. Travaux et documents de l'ORSTOM, France.

Reiter P (1998) *Aedes albopictus* and the world trade in used tires, 1988–1995: the shape of things to come? *J Am Mosq Control Assoc* **14**: 83–94.

Riehle MA & Jacobs-Lorena M (2005) Using bacteria to express and display anti-parasite molecules in mosquitoes: current and future strategies. *Insect Biochem Mol Biol* **35**: 699–707.

Schembri MA, Bayly RC & Davies JK (1994) Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from an *Acinetobacter* sp.: evidence that the gene is both plasmid and chromosomally located. *FEMS Microbiol Lett* **118**: 145–152.

Schwartz DC & Cantor CR (1984) Separation of yeast chromosome-sized DNAs by pulsed field gradient gel electrophoresis. *Cell* **37**: 67–75.

Seifert H, Boullion B, Schulze A & Pulverer G (1994) Plasmid DNA profiles of *Acinetobacter baumannii*: clinical application in a complex endemic setting. *Infect Control Hosp Epidemiol* **15**: 520–528.

Winstanley C, Taylor SC & Williams PA (1987) pWW174: a large plasmid from *Acinetobacter calcoaceticus* encoding

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

benzene catabolism by the beta-ketoadipate pathway. *Mol Microbiol* **1**: 219–227.

Wisniewski-Dyé F, Borziak K, Khalsa-Moyers G *et al.* (2011) *Azospirillum* genomes reveal transition of bacteria from aquatic to terrestrial environments. *PLoS Genet* **7**: e1002430.

Yamada Y & Yukphan P (2008) Genera and species in acetic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* **125**: 15–24.

Zouache K, Voronin D, Tran-Van V, Mousson L, Failloux A-B & Mavingui P (2009) Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS ONE* **4**: e6388.

Zouache K, Raharimalala FN, Raquin V, Tran-Van V, Raveloson LHR, Ravelonandro P & Mavingui P (2011) Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol* **75**: 377–389.

Supporting Information

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article:

Table S1. Primers used in this study.
Table S2. Characteristics of *Acinetobacter* isolates and reference strains used in this study.
Table S3. Best logistic regression models for *Acinetobacter* and *Asaia* prevalence data according to Akaike information criterion (AICc).
Table S4. Final logistic-regression models of mosquito infection risk factors for the two bacteria: variables and variable categories.
Table S5. Substrate utilization profiles of the *Acinetobacter* mosquito isolates and their reference strains.

Please note: Wiley-Blackwell is not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

© 2012 Federation of European Microbiological Societies
Published by Blackwell Publishing Ltd. All rights reserved

Table S1. Primers used in this study

Organism	Gene	Primer name	Primer sequence (5' – 3')	Amplicon size (bp) /Tm (°C)	References
Eubacteria	*rrs*	pA	5' - AGAGTTTGATCCTGGCTCAG - 3'	1500 / 55	Bruce *et al.*, 1992
		pH	5' - AAGGAGGTGATCCAGCCGCA - 3'		
Acinetobacter	*rrs*	Acin1	5'- ACTTTAAGCGAGGAGGAGGCT - 3'	426 / 58	Sanguin *et al.,* 2006
		Ac	5' - GCGCCACTAAAGCCTCAAAGGCC - 3'		Kenzaka *et al.*, 1998
Asaia	*rrs*	Asarev	5' - AGCGTCAGTAATGAGCCAGGTT - 3'	180 / 60	Crotti *et al.*, 2009
		Asafor	5' - GCGCGTAGGCGGTTTACAC - 3'		
Ae. albopictus	*ND5*	ND5FOR	5' - TCCTTAGAATAAAATCCCGC - 3'	450 / 45 and 46	Mousson *et al.*, 2005
Ae. albopictus		ND5REV	5'- GTTTCTGCTTTAGTTCATTCTTC - 3'		
Ae. albopictus	*COI*	CI-J-1632	5' - TGATCAAATTTATAAT - 3'	597 / 40	Mousson *et al.*, 2005
Ae. albopictus		CI-N-2191	5' - GGTAAAATTAAAATATAAACTTC - 3'		

Table S2: Characteristics of *Acinetobacter* isolates and reference strains used in this study

	Name	Origin	Species	Similarity of *rrs* gene sequence to reference gene (%)	Accession Number
Reference strains	Ref-1	Strain Bank ref. LMG 1041	*A. baumannii*		AB594765.1
	Ref-2	Strain Bank ref. LMG 1029	*A. lwoffii*		X81665.1
	Ref-3	Strain Bank ref. ATCC 23055	*A. calcoaceticus*		AJ888984.1
	Ref-4	Strain Bank ref. LMG 999	*A. johnsonii*		X81663.1
Isolates from *Ae. albopictus*	1a	Female, Madagascar, Toamasina	*A. baumannii*	100%	JQ408698
	1b	Female, Madagascar, Toamasina	*A. baumannii*	100%	JQ408699
	2a	Male, Madagascar, Ambohidratrimo	*A. lwoffii*	99%	JQ408696
	2b	Male, Madagascar, Ambohidratrimo	*A. lwoffii*	99%	JQ408697
	3a	Male, Reunion island	*A. calcoaceticus*	99%	FJ688379.1
	4a	Male, Madagascar, Mahajanga	*A. johnsonii*	99%	GU726178.1
	4b	Male, Madagascar, Mahajanga	*A. johnsonii*	98%	GU726181.1
Isolates from environment and patients	8	Water of mosquito breeding larvae	*Acinetobacter* sp.	99%	JQ408700
	9	Water of mosquito breeding larvae	*Acinetobacter* sp.	99%	JQ408701
	1c	from patient ref. 1349	*A. baumannii*	99%	FN563420
	1d	from patient ref. 1350	*A. baumannii*	98%	FN563421
	1e	from patient ref. 1353	*A. baumannii*	98%	FN563424
	3b	from environment ref. 1556	*A. calcoaceticus*	98%	JQ627634

Table S3. Best logistic regression models for *Acinetobacter* and *Asaia* prevalence data according to Akaike Information Criterion (AICc). The retained models are in bold. The symbol + shows an additive effect, the symbol * an interaction between two factors (i.e., site*sex means site + sex + site x sex). n, number of samples; k, the number of parameters in the model.

Bacteria	Model	n	k	AICc	ΔAICc
Acinetobacter	**Sex**	**205**	**2**	**215.64**	**0**
	Site+Sex	205	5	220.39	4.75
	Site * Sex	205	8	221.63	5.99
	Site	205	4	221.79	6.15
Asaia	**Site * Sex**	**208**	**8**	**218.31**	**0**
	Site	208	4	262.20	43.90
	Site + Sex	208	5	263.37	45.07
	Sex	208	2	291.65	73.34

Table S4. Final logistic-regression models of mosquito infection risk factors for the two bacteria: variables and variable categories. In the model (see material and methods), the symbol + is used for an additive effect and * for the interaction between two factors, so here 'sex*site' means sex + site + sex x site.

Bacteria	Model	Variable	Category	p	β[a]	se[b]	95%CI[c](β)		OR[d]	95%CI[c] (OR)	
							min	max		min	max
Acinetobacter	*Acineto*~sex	Intercept		$2.23x10^{-5}$	0.94	0.22					
		Sex	male	0.04	0.70	0.35	0.02	1.38	2.01	1.02	3,97
Asaia	*Asaia*~sex*site	Intercept		0.03	-2.30	1.05	-4.36	-0.25	0.10	0.01	0,78
		Sex	male	0.73	0.51	1.51	-2.44	3.46	1.67	0.09	31,87
		Site	Manhanjary	$1.73x10^{-3}$	3.52	1.12	1.32	5.72	33.75	3.73	305,17
			Toamasina	0.02	2.68	1.12	0.48	4.87	14.55	1.62	130,54
			Tsimbazaza	0.53	0.73	1.16	-1.54	3.00	2.08	0.22	20,17
		Manhanjary x male		0.01	-5.06	1.86	-8.71	-1.41	0.01	$1.65x10^{-4}$	0.24
		Toamasina x male		0.69	0.63	1.61	-2.52	3.79	1.89	0.08	44.30
		Tsimbazaza x male		0.54	0.99	1.62	-2.19	4.18	2.70	0.11	65.13

[a] Parameter estimate ; [b]Standard error ; [c]Confidence interval ;[d]Odds ratio

Table S5. Substrate utilization profiles of the *Acinetobacter* mosquito isolates and their reference strains

		A. calcoaceticus			*A. baumannii*		*A. johnsonii*			*A. lwoffii*		*Acinetobacter* sp.		
		Ref-3	3a	Ref-1	1a	1b	Ref-4	4a	4b	Ref-2	2a	2b	8	9
Carbohydrates	L-Arabinose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+
	D-Saccharic Acid	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	D-Galactose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D-Mannose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	D-Gluconic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	D-Xylose	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-
	D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	a-D-Glucose	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-
	D-Melibiose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mucic Acid	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	L-Lyxose	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	Glucuronamide	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Dextrin	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	β-D-Allose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
	2-Deoxy-D-Ribose	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
	D-Fucose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gentiobiose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D-Glucosamine	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	5-Keto-D-gluconic Acid	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-
	D-Ribono-1,4-Lactone	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	Dihydroxy Acetone	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-
	D,L-Lactamide	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
Carboxylates	Succinic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	L-Lactic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Formic Acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	D,L-Malic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	Acetic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	a-Keto-Glutaric Acid	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+
	a-Keto-Butyric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	a-Hydroxy Butyric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	Citric Acid	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	Fumaric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	Bromo Succinic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
	Propionic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tricarballylic Acid	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
	Acetoacetic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	Mono Methyl Succinate	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	Methyl Pyruvate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-Malic Acid	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	L-Malic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
	Pyruvic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

	γ-Amino Butyric Acid	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+
	Butyric Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Capric Acid	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+
	Caproic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Citraconic Acid	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Citramalic Acid	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4-Hydroxy Benzoic Acid	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
	β-Hydroxy Butyric Acid	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+
	α-Keto Valeric Acid	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	D-Lactic Acid Methyl Ester	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
	Malonic Acid	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	Oxalomalic Acid	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	Quinic Acid	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	Sebacic Acid	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
	Sorbic Acid	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-Tartaric Acid	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	D,L-Carnitine	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Amino acids	L-Aspartic Acid	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
	L-Proline	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	D-Sérine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	L-Glutamic Acid	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
	L-Asparagine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
	D-Aspartic Acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L-Glutamine	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
	Glycyl-L-Aspartic Acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Glycyl-L-Glutamic Acid	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L-Serine	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	L-Threonine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L-Alanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-Alanyl-Glycine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	Glycyl-L-Proline	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L-Arginine	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+
	L-Histidine	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	Hydroxy-L-Proline	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	L-Isoleucine	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L-Leucine	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	L-Ornithine	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	L-Phenylalanine	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	L-Pyroglutamic Acid	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+
	L-Valine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Putrescine	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	L-Cysteine	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
	Glycine	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	L-Leucine	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
	L-Tryptophan	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+
	L-Tyrosine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
	D-Asparagine	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
	L-Citrulline	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-

	Agmatine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	β-Phenylethylamine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	Tyramine	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	D,L-α-Amino-N-butyric Acid	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	γ-Amino-N-butyric Acid	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+
	D,L-α-Amino-Caprylic Acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
	δ-Amino-N-valeric Acid	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	Ala-Asp	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Ala-Gln	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+
	Ala-Glu	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	Ala-Gly	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Ala-His	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
	Ala-Leu	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+
	Ala-Thr	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	Gly-Asn	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	Gly-Gln	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
	Gly-Glu	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Gly-Met	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Met-Ala	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Alcohol	**2-Aminoethanol**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	2,3-Butanediol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Miscellaneous	**Tween-20**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tween 40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Tween 80	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	L-Alaninamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Amide	**Formamide**	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
	Glucuronamide	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Amine	**Methylamine**	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	Ethanolamine	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Nitrogen	**Ammonia**	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
	Nitrite	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
	Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	Urea	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
Nucleic acids	**Biuret**	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
	Adenine	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	Adenosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Guanine	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
	Guanosine	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+
	Uracil	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
	Inosine	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
	Xanthine	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
	Xanthosine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
	Uric Acid	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
	Allantoin	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+

Substrates which were not utilized by any isolate were not listed.

2.3. Discussion et conclusions

Au cours de cette étude, nous avons estimé, pour la première fois, la prévalence des genres *Acinetobacter* et *Asaia* au sein de populations naturelles de moustique *Ae. albopictus* sur l'île de Madagascar. La fréquence d'infection du genre bactérien *Acinetobacter* a été de 70%. Ce genre s'est révélé être plus fréquemment retrouvé que le genre *Asaia* (46%). Concernant la bactérie *Asaia*, des études préliminaires avaient montré une prévalence de 100% au sein de lignées de laboratoire d'*Ae. albopictus* (Chouaia et al., 2010). Notre étude a permis de mettre en évidence une prévalence moindre de la bactérie dans les populations naturelles, suggèrant un effet des facteurs environnementaux sur la probabilité d'acquisition et la persistance de la bactérie chez le moustique. En effet, les espèces membres du genre *Asaia* sont très fréquemment retrouvées au sein du nectar des fleurs (Yamada and Yukphan, 2008) tandis que les bactéries du genre *Acinetobacter* sont ubiquistes et retrouvées à l'état libre au sein de la rhizosphère, de l'eau, ainsi que la peau des vertébrés (Doughari et al., 2011). Certains de ces habitats peuvent être également utilisés par les moustiques à différentes étapes de leur cycle de vie. Ainsi, le partage de ces niches écologiques pourrait être la source d'un premier contact entre bactéries et moustiques. Au cours de cette étude, nous avons également mis en évidence un effet du sexe du moustique et du site d'échantillonnage sur la prévalence des deux bactéries. *Acinetobacter* a été plus fréquemment retrouvée chez les mâles tandis qu'un effet d'interaction entre le facteur sexe et le site d'échantillonnage a été mis en évidence pour la bactérie *Asaia.* Des travaux antérieurs avaient déjà montré une influence du sexe du moustique et de la niche écologique sur la richesse et la diversité bactérienne associée aux populations naturelles d'*Ae. albopictus* (Zouache et al., 2011). Ces effets pourraient s'expliquer par des facteurs génétiques et/ou écologiques. En effet, l'une des différences majeures entre mâles et femelles provient du fait que seules les femelles sont hématophages. Or, des études ont démontré que les deux genres bactériens *Asaia* et *Acinetobacter* pouvaient causer des infections opportunistes chez l'homme (Alauzet et al., 2010; Doughari et al., 2011). Ces observations posent ainsi l'hypothèse de l'existence d'infections croisées entre le moustique et l'homme ou d'autres animaux. Nos résultats ont également montré que les deux bactéries étaient plus souvent retrouvées ensemble qu'isolément témoignant ainsi d'une possible synergie entre les deux genres bactériens. Cependant, nous ne pouvons pas exclure l'hypothèse de facteurs de risques communs qui pourraient entrainer une association statistique.

Les valeurs de prévalence retrouvées dans notre étude soulèvent également la question du mode d'acquisition et de transmission des bactéries chez le moustique. Concernant la bactérie *Asaia*, des infections expérimentales ont permis de démontrer que la bactérie

pouvait être transmise de manière horizontale ou verticale des parents à la descendance (Crotti et al., 2009). De manière surprenante, la prévalence modérée de la bactérie *Asaia* rapportée dans notre étude ne soutient pas l'hypothèse d'une transmission interindividuelle ou transgénérationnelle forte. Concernant *Acinetobacter*, des études antérieures ont déjà permis de détecter, par méthode d'hybridation fluorescente *in situ* (FISH), la présence de la bactérie dans le tube digestif et les glandes salivaires du moustique mais jamais au sein des ovaires (Zouache et al., 2009). Compte tenu de ces observations, l'hypothèse d'une transmission verticale semble peu probable. Cependant, même si les symbiotes transmis verticalement sont souvent retrouvés au sein des ovaires, d'autres modes de transmission verticale restent envisageables comme par exemple la coprophagie, la transmission paternelle, ou le « egg-smearing » (étalement de la bactérie à la surface des œufs) (Kikuchi, 2009). La forte prévalence d'*Acinetobacter* retrouvée chez le moustique suggère une interaction durable avec celui-ci. Jusqu'à présent, dans la littérature, seul un exemple témoigne du rôle joué par les bactéries *Acinetobacter* dans la biologie des insectes. Il s'agit de la mouche charbonneuse *Stomoxys calcitrans* pour laquelle il a été montré que la bactérie était nécessaire à l'accomplissement du développement complet des larves (Lysyk et al., 1999).

Des isolats bactériens du genre *Acinetobacter* appartenant aux espèces *A. calcoaceticus, A. baumanii, A. lwoffii* et *A. johnsonii* ont été obtenus puis soumis à une analyse génomique (nombre et taille des réplicons chromosomiques et plasmidiques) et un profilage métabolique. Nous avons montré que la taille de leurs génomes chromosomiques (>3Mb) était similaire à celle des génomes disponibles dans les bases de données (3.59 – 4.05 Mb) (Fondi et al., 2010). Nous avons également mis en évidence une diversité importante de plasmides dans les isolats de moustiques en comparaison de souches d'origine environnementale. Les fonctions de ces plasmides chez les isolats de moustiques restent encore à déterminer mais des études ont d'ores et déjà établi que les bactéries du genre *Acinetobacter* pouvaient héberger des plasmides portant des gènes codant des voies métaboliques nouvelles comme l'utilsation d'hydrocarbures et des dérivés organiques complexes (Winstanley et al., 1987; Schembri et al., 1994; Mengoni et al., 2007). Le moustique tigre étant capable de coloniser des habitats pollués, il serait intéressant d'investiguer la contribution de tels plasmides dans l'adaptation du moustique aux environnements anthropisés (Mousson et al., 2005). Parallèlement, le profilage métabolique a révélé un métabolisme plus réduit chez les isolats de moustiques, en comparaison des souches d'origine environnementale. Plus remarquable encore, les souches associées aux moustiques utiliseraient spécifiquement des composés contenus dans le sang (acide α-kéto valérique, glycine) et certains végétaux (acide 4-hydroxybenzoique) alors les souches

environnementales sembleraient dépourvues de cette capacité métabolique. Ces observations suggèrent des différences en contenu et/ou régulation génique.

En conclusion, cette étude a permis de montrer une forte occurrence des bactéries *Acinetobacter* et *Asaia* au sein des populations naturelles du moustique *Ae. albopictus.* Ces fortes valeurs de prévalence peuvent être considérées comme un indice d'interaction durable entre les bactéries et le moustique. Cependant, concernant le genre *Acinetobacter*, la comparaison de l'architecture génomique des isolats de moustiques avec celle des souches d'origine environnementale n'a pas montré de réduction génomique significative, phénomène qui accompagne généralement la domestication d'un symbiote par son hôte (endosymbiose ancienne), confortant ainsi le statut de symbiote secondaire de ce genre bactérien et donc d'une association relativement récente. L'étude du rôle de ces bactéries mérite d'être poursuivie puisque les symbiotes secondaires peuvent avoir un impact tout aussi important dans la biologie des hôtes que les symbiotes primaires.

3. Développement et validation d'une approche de séquençage haut-débit pour l'étude de la diversité bactérienne du moustique tigre

3.1. Contexte et objectif général de l'étude

Comme évoqué précédemment, une part importante des travaux sur le microbiote bactérien associé au moustique *Ae. albopictus* a souvent porté sur l'étude de symbiotes modèles (Ricci et al., 2012; Minard, Mavingui, et al., 2013). Cependant, il est tout aussi important d'avoir une vue d'ensemble de leur communauté bactérienne afin de mettre en évidence des liens possibles entre composition, diversité et facteurs de variation.

L'application de méthodes classiques de typage bactérien et d'empreinte moléculaire a d'ores et déjà permis de dresser un inventaire significatif mais non exhaustif des taxons bactériens présents chez *Ae. albopictus* (Zouache et al., 2009, 2011; Chouaia et al., 2010; Valiente Moro et al., 2013). Récemment, le développement des technologies de séquençage à haut débit (NGS – Next Generation Sequencing) a ouvert la voie vers des méthodes d'analyse plus exhaustives de la diversité bactérienne (Petrosino et al., 2009; Schloss et al., 2009; Metzker, 2010; Shi et al., 2010; Caporaso et al., 2011). En particulier, les approches métagénomique et méta-taxogénomique (séquençage massif et non ciblé de séquences d'ADN ou d'ARN contenues au sein d'une matrice donnée ou amplification-séquençage massif d'un gène de ménage) ont permis de mettre à jour la très grande diversité fonctionnelle et taxonomique microbienne associée à des environnements divers et variés (Morales and Holben, 2011). En entomologie, ces approches ont été à l'origine d'avancées considérables avec notamment la découverte de nombreux gènes impliqués dans la

dégradation de la cellulose et du xylane chez les termites supérieurs (Warnecke et al., 2007), d'un virus pathogène impliqué dans le syndrome d'effondrement des colonies d'abeilles (Cox-Foster et al., 2007), ou encore d'une zone anaérobie dédiée à la symbiose bactérienne au sein du tube digestif des gendarmes (Sudakaran et al., 2012).

Dans ce contexte, nous avons analysé la diversité bactérienne associée au moustique tigre par amplification et séquençage haut débit d'une région hypervariable du gène *rrs* codant l'ARNr 16S. En effet, ce gène de ménage est fréquemment utilisé comme horloge moléculaire de par (i) son ubiquité chez les procaryotes, (ii) la présence de régions conservées permettant son amplification et (iii) le taux de mutations dans les régions variables, relativement constant au cours de l'évolution. Ces caractéristiques garantissent une assignation taxonomique fidèle (Baker et al., 2003; Goris et al., 2007). Dans le but de définir les paramètres optimaux pour l'analyse, nous avons tout d'abord réalisé un essai pilote sur des populations de moustiques tigre échantillonnés sur l'île de Madagascar pour lesquelles nous avions déjà analysé la diversité bactérienne par des méthodes moléculaires classiques, nous permettant ainsi de disposer d'un référentiel d'étude (Zouache et al., 2011; Minard, Mavingui, et al., 2013). Au moment où ces travaux ont débuté, le pyroséquençage 454 offrait une taille de fragments (ou lecture) de 500 pb compatible avec le séquençage de plusieurs régions variables du gène *rrs* sur un même fragment. Cependant, la profondeur (nombre de lectures) necessaire pour obtenir une estimation optimale de la diversité restait à définir. En effet, des études préliminaires basées sur des approches comparables chez divers arthropodes avaient soulevé le problème de la conception d'une méthodologie optimale et uniforme (Köhler et al., 2012; Moran et al., 2012; Osei-Poku et al., 2012; Ridley et al., 2012). Dans l'éventualité où les échantillons présenteraient une faible variabilité intra site, il aurait été nécessaire d'assembler les séquences de ces échantillons de manière à augmenter le nombre de sites à comparer. Dans ces conditions, nous avons cherché à savoir si une profondeur de l'ordre de 3 500 lectures était suffisante pour couvrir la diversité associée aux individus ou si il fallait augmenter cette profondeur d'analyse jusqu'à 16 000 lectures par individu. Nous avons également défini la méthodologie optimale permettant d'assembler différents échantillons d'un même site sans en biaiser la diversité.

3.2. Publication n°3 : « Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus* : a pilot study»

Ces travaux ont été publiés en 2014 dans la revue ***Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*** – volume 4 – doi : 10.3389/fcimb.2014.00059.

frontiers in
CELLULAR AND INFECTION MICROBIOLOGY

ORIGINAL RESEARCH ARTICLE
published: 14 May 2014
doi: 10.3389/fcimb.2014.00059

Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: a pilot study

Guillaume Minard, Florence-Hélène Tran, Audrey Dubost, Van Tran-Van, Patrick Mavingui* and Claire Valiente Moro*

Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, USC INRA 1364, VetAgro Sup, FR41 BioEnvironment and Health, Université de Lyon 1, Villeurbanne, France

Edited by:
Muriel Vayssier-Taussat, INRA, France

Reviewed by:
Fadi Bittar, Aix-Marseille Université, URMITE, UM63, CNRS 7278, IRD 198, Inserm 1095, France
Damien F. Meyer, CIRAD, France

***Correspondence:**
Patrick Mavingui and Claire Valiente Moro, Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, Université de Lyon 1, Bâtiment Lwoff, 10, rue Raphaël Dubois, 69100 Villeurbanne, France
e-mail: patrick.mavingui@univ-lyon1.fr; claire.valiente-moro@univ-lyon1.fr

The Asian tiger mosquito *Aedes* (Stegomya) *albopictus* is an invasive species that has spread across the world in the last two decades, showing a great capacity to adapt to contrasting climates and environments. While demonstrated in many insects, the contribution of bacterial symbionts in *Aedes* ecology is a challenging aspect that needs to be investigated. Also some bacterial species have already been identified in *Ae. albopictus* using classical methods, but a more accurate survey of mosquito-associated bacterial diversity is needed to decipher the potential biological functions of bacterial symbionts in mediating or constraining insect adaptation. We surveyed the bacteria associated with field populations of *Ae. albopictus* from Madagascar by pyrosequencing 16S rRNA gene amplicons. Different aspects of amplicon preparation and sequencing depth were tested to optimize the breadth of bacterial diversity identified. The results revealed that all mosquitoes collected from different sites have a bacterial microbiota dominated by a single taxon, *Wolbachia pipientis*, which accounted for about 99% of all 92,615 sequences obtained. As *Ae. albopictus* is known to harbor two *Wolbachia* strains (*w*AlbA and *w*AlbB), a quantitative PCR was used to estimate the relative densities, (i.e., the bacteria-to-host gene ratios) of each strains in individual mosquitoes. Relative densities were between $6.25 \times 10^{0.01}$ and $5.47 \times 10^{0.1}$ for *w*AlbA and between $2.03 \times 10^{0.1}$ and 1.4×10^{1} for *w*AlbB. Apart from *Wolbachia*, a total of 31 bacterial taxa were identified at the genus level using different method variations. Diversity index values were low and probably underestimated the true diversity due to the high abundance of *Wolbachia* sequences vastly outnumbering sequences from other taxa. Further studies should implement alternative strategies to specifically discard from analysis any sequences from *Wolbachia*, the dominant endosymbiotic bacterium in *Ae. albopictus* from this area.

Keywords: high-throughput sequencing, 16S rDNA, bacterial diversity, *Wolbachia*, field-caught mosquitoes

INTRODUCTION

Invasive mosquitoes give cause for worldwide concern not only because of their potential ecological impact, but also they are vectors of a wide range of pathogens affecting both humans and animals (Medlock et al., 2012). In particular, the tiger mosquito *Aedes albopictus* has rapidly spread across the world from its native South-East Asia and is considered as one of the world's 100 most dangerous invasive species (Benedict et al., 2007). *Ae. albopictus* was found to be competent for more than 20 arboviruses (Gratz, 2004). *Ae. albopictus* was involved in the transmission of the Chikungunya and Dengue viruses worldwide, including to Europe (Bonilauri et al., 2008; Grandadam et al., 2011; Caron et al., 2012), and was also implicated as a vector of the parasitic nematode *Dirofilaria* (Cancrini et al., 2007).

In light of the recent theory of the holobiont unit, it is now necessary to enlarge our view of how commensal host-bacterial relationships function in insects (Feldhaar, 2011; Minard et al., 2013a). Insects establish numerous types of symbiotic associations ranging from parasitism to mutualism with their microbial communities (Toft and Andersson, 2010). Recent studies have highlighted how bacterial endosymbioses influence evolutionary and ecological processes through effects on insect host biology (Douglas, 2011). However, most examples demonstrate how symbiotic microbiota are essential to phytophagous insect functions such as host plant specialization (Tsuchida et al., 2004), reproduction (Simon et al., 2011), protection against natural enemies (Oliver et al., 2003), and tolerance to environmental stress (Brumin et al., 2011; Feldhaar, 2011). It is therefore necessary to assess how the bacterial microbiota contributes to the biology of hematophagous insects, particularly invasive mosquitoes.

Until now the composition of bacterial communities associated with *Ae. albopictus* has mainly been investigated using classical microbiological and molecular techniques. Various culture-dependent isolation methods were used to identify cultivable bacteria (Zouache et al., 2009; Chouaia et al., 2010; Minard et al., 2013a,b; Valiente Moro et al., 2013). In parallel, non-culture-based methods such as DGGE fingerprinting (Chouaia et al., 2010; Zouache et al., 2011) or taxonomic microarray hybridization (Zouache et al., 2012) were employed. Together these approaches have unraveled some of the bacterial diversity present in both laboratory-reared and field-caught *Ae. albopictus*

mosquitoes. However, these relatively low-throughput techniques cannot provide comprehensive coverage of the microbial composition and diversity in mosquito hosts. The recent rapid development of high-throughput sequencing methods has made it possible to detect a deeper level of microbial diversity in animal hosts, it has been demonstrated for symbiotic microbiotas of insect guts (Shi et al., 2010; Fukatsu, 2012). To date very few studies have used Next-Generation Sequencing technologies to explore bacterial microbiota in mosquitoes. Osei-Poku et al. (2012) successfully used pyrosequencing of 16S rRNA genes to investigate the diversity of gut bacterial communities in field-caught mosquitoes and showed that bacterial composition varies greatly between populations. When pyrosequencing was used to determine the composition of the midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae*, much richer information was obtained than from low-throughout methods (Wang et al., 2011; Boissière et al., 2012).

The goal of the present study was to survey the bacterial diversity associated with *Ae. albopictus* mosquitoes by pyrosequencing 16S rDNA genes. The effect of varying different methodological parameters like those for amplicon preparation and sequencing depth on the bacterial diversity results was assessed.

MATERIALS AND METHODS

MOSQUITO COLLECTION

The sampling area and mosquito capture procedure were approved by Madagascar National Parks. Mosquito specimens were collected from various natural breeding sites on the east coast of Madagascar (Toamasina) in the Antsinanana region (18° 8′ 59.64″ S) in December 2010. Butterfly nets were used to catch adult mosquitoes flying near the grass or around the capturers. *Aedes albopictus* specimens were identified using morphological characteristics and pictorial keys (Rueda, 2004) and then female and male mosquitoes were separated. Only non-blooded female mosquitoes were used for the analysis, as previous studies have demonstrated that blood meals have a dynamic effect on bacterial diversity (Wang et al., 2011; Boissière et al., 2012). Mosquitoes were stored in 70% ethanol at −80°C until use.

GENOMIC DNA EXTRACTION

All DNA extractions were performed in a sterile environment under a laminar hood to avoid contamination. Mosquitoes were surface-disinfected with 70% ethanol and rinsed with sterile water, as previously described (Minard et al., 2013b). Each mosquito was individually crushed using a Bioblock Scientific MM 2000 mill (Retsch, France) in an Eppendorf tube with 5-mm diameter inox beads and 200 µl of extraction buffer (2% hexadecyltrimethyl ammonium bromide, 1.4 M NaCl, 0.02 M EDTA, 0.1 M Tris pH 8.0, 0.2% 2-β-mercaptoethanol) and heated at 60°C for 2 h. Lipids and proteins were extracted with phenol-chloroform-isoamyl alcohol (25:24:1; v/v/v) and then chloroform:isoamyl alcohol (24:1; v/v). DNA was precipitated with isopropyl alcohol and centrifugation at 16,100 g for 30 min at 4°C. DNA pellets were washed with cold ethanol, air-dried, and resuspended in 20 µl TE buffer (2 mM Tris, 1 mM EDTA).

PRIMERS AND PCR AMPLIFICATION

Hypervariable *rrs* gene V5-V6 regions of about 280 bp were amplified with 784F 5′-AGGATTAGATACCCTGGTA-3′ and 1061R 5′-CRRCACGAGCTGACGAC-3′ primers (Andersson et al., 2008). These primers were selected *in silico* with the RDP Probe Match tool according to the following criteria (Cole et al., 2009): hybridization with 94% of sequences belonging to the RDP Bacteria domain database with good quality and ≥1200 bp long with 2 mismatches allowed in primer sequences. In addition, Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) was used to check that the chosen primers did not match *Ae. albopictus* 18S and mitochondrial 16S rDNA gene sequences. PCR amplification was performed using 1.75 U of Expand High Fidelity Enzyme Mix (Roche, Switzerland) with 1× Expand High Fidelity Buffer (Roche, Switzerland), 0.06 mg mL^{-1} of T4 gene 32 protein (Roche, France), 0.06 mg mL^{-1} of bovine serum albumin (New England Biolabs, France), 40 µM of dNTP mix, 200 nM of each primer (Invitrogen, France) and 30 ng of template DNA. PCR products were purified with QiaAmp purification kit (Qiagen, France) following the manufacturer's recommendations.

PREPARATION OF SAMPLES FOR 454 PYROSEQUENCING AND BIOINFORMATIC PROCESSING

Amplicon tagging and pyrosequencing were performed by a commercial laboratory (DNAvision, Belgium) using the Roche 454 FLX Titanium platform (Roche, Switzerland). Various modalities were tested for in-depth exploration of bacterial diversity (**Figure 1**) including: (i) constituting a pool of DNA then performing PCR amplification vs. pooling PCR of several amplicons generated from different individual samples; (ii) sequencing a single amplicon vs. a pool of amplicons; and (iii) evaluating the depth of sequencing (number of reads) necessary for the most complete examination of the bacterial diversity. A total of eight *rrs* V5-V6 amplicon libraries were sequenced at two different ranges of about 3200 reads per sample (S1, S2, S3, S4, S5) and 16,000 reads per sample (S3′, P1, P2) (**Figure 1**). Data were analyzed by first trimming sequence quality with different cutoffs using standard filtering tools in the Mothur package (Schloss et al., 2009). Two errors on primer sequence and one error on barcode sequence were allowed. Sequences shorter than 250 bp were discarded and chimeric sequences were removed using UCHIME and manual analysis (Edgar et al., 2011). Sequences were grouped into operational taxonomic units (OTUs) by clustering at 97% similarity. Singleton reads assigned to OTUs were discarded from the analysis if they were not found in at least two different samples as singletons are likely to be sequencing errors which can lead to an overestimation of diversity. Rarefaction curves were built to estimate sample coverage. Richness, α diversity and β diversity were calculated to compare samples with respectively richness estimators (Chao, Jackknife, Abundance Coverage Estimator), diversity indices (Simpson, Shannon) and Bray–Curtis dissimilarity. Bray–Curtis dissimilarity values were used to construct a neighbor joining tree with the BIONJ algorithm (Gascuel, 1997) using R software (R Development Core Team, 2009). OTU consensus sequences were screened against the SILVA database (release 111) with a 5% dissimilarity cut-off and an *e*-value of 10^{-12}. Taxonomic assignment of sequence clusters

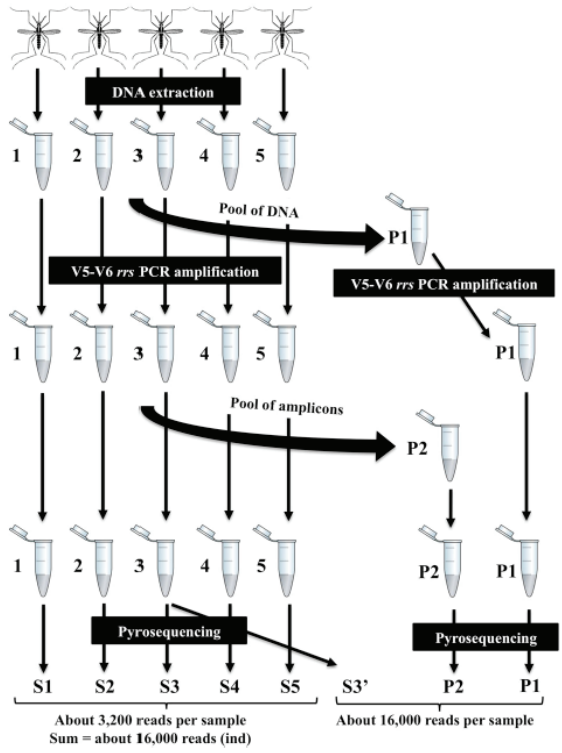


FIGURE 1 | Experimental approach to test various methods for in-depth exploration of the bacterial diversity associated with *Ae. albopictus* mosquitoes. Different steps include (1) DNA extraction from individuals, (2) V5-V6 *rrs* PCR amplification by constituting a pool of DNA before amplification (or not), (3) pyrosequencing by pooling PCR amplicons from several individuals (or not). A total of eight V5-V6 *rrs* amplicon libraries were sequenced at two different ranges of about 3200 reads per sample (S1, S2, S3, S4, S5) and 16,000 reads per sample (S3′, P1, P2).

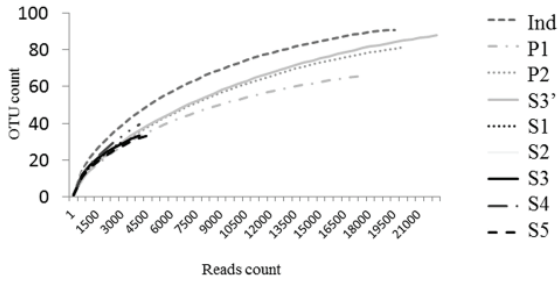


FIGURE 2 | Rarefaction analysis of bacterial microbiota discovery. Operational taxonomic units (OTUs) were grouped with a 97% similarity. Rarefaction curves represent the number of new OTUs discovered by sampling without being recaught.

was performed with local BLASTALL searches. A new sample, named ind, was added to the analysis. This sample was generated by pooling all the reads from each individual sample (S1 to S5) (**Figure 1**). All sff files were deposited at EMBL European Nucleotide Archive (www.ebi.ac.uk/ena/) under project accession number PRJEB4976.

QUANTIFICATION OF *WOLBACHIA*

The relative density of *Wolbachia pipientis* was measured by real-time quantitative PCR specifically targeting the *wsp* genes for each of the *Wolbachia* strains *w*AlbA and *w*AlbB (Zouache et al., 2011). Amplification using the LightCycler LC480 apparatus (Roche) was performed using 5 ng of DNA from a single female mosquito (10 females in total), as previously described (Zouache et al., 2011). Standard curves were constructed using a dilution series (10^1–10^8 molecules) of the pQuantAlb plasmid containing *wsp* and *actin* fragments (Tortosa et al., 2008). For each gene, three technical replicates were processed per DNA sample.

RESULTS

BACTERIAL SPECIES RICHNESS AND DIVERSITY IN MOSQUITOES

The V5-V6 regions of bacterial *rrs* genes amplified from female *Ae. albopictus* adults were sequenced by high-throughput pyrosequencing. From the total of 92,615 reads obtained, approximately 79,895 were judged to be of good quality. For samples from individual mosquitoes (S1, S2, S3, S4, S5), read numbers varied from 1583 (S2) to 5048 (S5). For P1, P2, Ind, and S3′, read numbers were 17,584, 20,447, 19,132, and 22,199, respectively. Sequences clustered at 97% similarity into 417 OTUs. The coverage of the sequencing was determined by using rarefaction analysis. The rarefaction curves of samples from single mosquitoes did not reach saturation (**Figure 2**). On the contrary, saturation was almost attained for the ind pool of individual sample sequences (S1–S5), P1 sequences obtained from amplicons generated from a pool of DNA and P2 sequences obtained from a pool of amplicons (i.e., after amplification of a single sample). The comparison of rarefaction curves between S3 (4276 reads) and S3′ (22,296 reads) clearly indicated that for a single mosquito individual a minimal sequence number close to 16,000 reads is sufficient for a good estimation of sample richness. Indeed, diversity indices Chao1, ACE1, Jackknife for S3 are about half of the respective S3′ values (**Table 1**). However, the Simpson and Shannon diversity indices of S3 and S3′ were similar. In addition, analyses of Bray–Curtis distances showed a low level of dissimilarity ($BC = 0.03939$) between S3 and S3′. Other dissimilarity scores revealed that overall the P2 and ind pools ($BC = 0.059085$) are more similar to each other than to P1 (**Figure 3**).

WOLBACHIA SEQUENCES ARE THE PREDOMINANT 16S rDNA AMPLICONS

A total of 417 OTUs were assigned to 4 phyla and 32 genera (**Figure 4**). Sequences from Proteobacteria are the predominant sequences found in all samples with all the experimental modalities tested (>99% of reads). About 96 to 99% of reads belonged to the *Wolbachia* genus and this largely explains the low diversity values obtained in each condition (**Table 1**). To confirm sequences assignment to *Wolbachia*, a local alignment of the two most abundant OTUs (Wolb G1 and Wolb G2) was performed against the non-redundant NCBI database to allow the

Table 1 | Richness and diversity index.

	Richness	Chao1	ACE1	Jackknife	λ	H′
S1	32	44.0000	94.3809	48.0000	0.5537	0.8149
S2	23	36.7500	48.4876	34.8822	0.4548	0.9647
S3	34	43.7500	60.0596	47.0000	0.5092	0.8708
S4	44	69.3000	133.3393	68.9360	0.6461	0.7645
S5	35	42.8000	48.1620	48.0000	0.8159	0.4642
S3′	88	99.3226	112.2252	115.0000	0.5159	0.8063
P1	66	75.5000	85.8432	86.0000	0.6802	0.6256
P2	82	94.0370	107.1057	108.0000	0.6039	0.7106
ind	91	99.5556	106.7494	113.0000	0.5967	0.8214

Indexes were calculated for each sample with 3% distant OTUs.

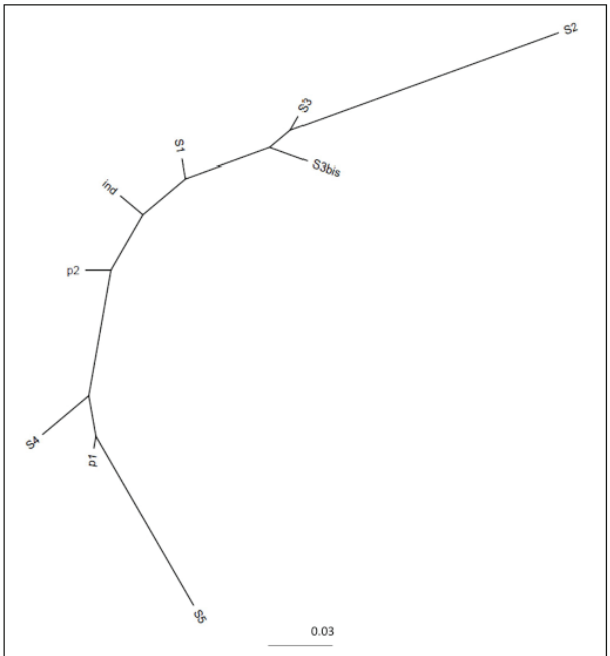


FIGURE 3 | Dissimilarity distances tree. The neighbor joining tree represents dissimilarity percentages between samples. It was computed with the Bray–Curtis dissimilarity index using R software.

selection of sequences from the most closely related taxa. The latter sequences were then aligned with Wolb G1 and Wolb G2 sequences and with 15 *Wolbachia* sequences retrieved from GenBank. This alignment highlighted the presence of a specific 25-bp sequence in the *Wolbachia rrs* gene (**Figure S1**). The alignment of this region with public databases was also performed using the SeqMatch tool (http://rdp.cme.msu.edu). The sequence showed 100% similarity and query coverage with other *Wolbachia* sequences but only 57% query coverage and 100% similarity with the nearest neighbor sequence from different taxa including *Candidatus mikurensis*, *Ehrlichia ruminantium*, and *Anaplasma platys*. This confirmed that the 25-bp sequence was specific to *Wolbachia*.

The numbers of *Wolbachia* wAlbA and wAlbB strains present in 10 mosquito individuals were quantified by clade-specific quantitative PCR of *wsp*, a gene encoding for *Wolbachia* surface protein, normalized to *actin*, a mosquito housekeeping gene. For each strain a relatively high gene copy number was found in all individuals tested (**Figure 5**). The *wsp*/*actin* ratios were between $6.25 \times 10^{0.01}$ and $5.47 \times 10^{0.1}$ for wAlbA and between $2.03 \times 10^{0.1}$ and 1.4×10^{1} for wAlbB. Significant bacterial density differences were found between individual mosquitoes for both wAlbA (p-value $= 8.499 \times 10^{-15}$, Kruskall–Wallis test) and wAlbB (p-value $= 3.616 \times 10^{-14}$, Kruskall–Wallis).

TAXONOMIC ANALYSIS AND RELATIVE ABUNDANCE OF OTHER BACTERIAL TAXA

Apart from *Wolbachia*, a total of 31 bacterial taxa were identified at the genus level from less than 1% of all the sequences (**Figure 4**). Firmicutes bacteria were found to be the dominant group (67%), followed by Actinobacteria (4%), Bacteroidetes (3%), and Proteobacteria (2%). In terms of OTU richness and genus content, ind and P2 were the most diverse with 22 and 19 genera identified, respectively (**Tables 1**, **2**). Sequences corresponding to *Blautia*, a Firmicutes genus, were found in all the datasets from individual and pooled samples, ranging from 3.2% (for P1) to 89.2% (for S4) of sequences (**Table 2**). Moreover, 88 sequences from a single OTU were assigned to *Lachnospiaceae* family with no similarity at genus level. Overall, the proportion of sequences affiliated to known or unclassified bacterial genera varied among samples.

DISCUSSION

The application of next-generation sequencing techniques to insect microbiota research makes it possible to gain a deeper knowledge of its microbial diversity. The goal of the present study was to assess the diversity of bacteria associated with the Asian tiger mosquito using high-throughput sequencing. Previous studies of bacterial diversity in various arthropods using a similar approach gave rise to different methodological parameters (Khöler et al., 2012; Moran et al., 2012; Osei-Poku et al., 2012; Ridley et al., 2012), so we chose to carry out a pilot study using pyrosequencing on a hypervariable region of 16S rRNA genes. Various experimental modalities were tested by varying the sample preparation (processing DNA samples from

Table 2 | Relative abundance of different genera without *Wolbachia*.

		S1	S2	S3	S4	S5	S3'	P1	P2	ind
Actinobacteria	*Corynebacterium*	-	-	-	-	1.6	-	-	1.9	0.3
	Janibacter	-	-	-	-	-	1.6	2.1	-	-
	*Tetrasphaera**	-	-	-	-	-	1.6	-	-	-
	*Frigoribacterium**	-	-	-	0.5	-	0.8	-	-	0.3
	*Leifsonia**	-	-	-	0.5	-	-	-	-	0.3
	Microbacterium	-	-	-	0.5	-	-	-	1.9	0.3
	Arthrobacter	-	-	4.8	-	-	-	-	1.0	0.3
	Kocuria	-	-	-	0.5	-	0.8	-	-	0.3
	Micrococcus	-	-	4.8	0.5	-	4.9	-	6.8	0.6
	*Rothia**	-	-	-	-	-	-	1.1	2.9	-
	Propionibacterium	-	5.9	-	-	-	0.8	-	-	0.7
Bacteroidetes	*Dysgonomonas*	-	-	-	-	3.3	1.6	-	5.8	0.5
	*Porphyromonas**	-	-	4.8	-	-	-	-	-	0.3
	Prevotella	-	-	-	-	1.6	-	-	3.9	0.3
	*Bergeyella**	-	-	-	-	-	1.6	-	1.9	-
	Chryseobacterium	-	5.9	-	-	-	1.6	-	2.9	0.7
	*Cloacibacterium**	10.5	-	-	-	-	-	-	-	0.8
	*Hymenobacter**	-	-	-	-	-	0.8	-	1.9	-
Firmicutes	*Staphylococcus*	-	-	9.5	1.0	-	3.3	-	3.9	1.2
	*Weissella**	5.3	-	-	-	-	-	-	-	0.4
	Streptococcus	-	-	-	-	-	-	-	1.9	-
	*Anaerostipes**	-	-	4.8	-	-	-	-	-	0.3
	*Blautia**	26.3	70.6	19.0	89.8	11.3	5.7	3.2	1.9	64,8
	*Coprococcus**	-	-	-	1.0	-	-	1.1	-	0.5
	*Faecalibacterium**	-	-	9.5	-	67.7	-	4.3	1.9	12
	*Ruminococcus**	-	5.9	-	-	1.6	-	1.1	-	1.0
Proteobacteria	*Blastobacter**	-	-	-	-	-	-	-	2.9	-
	Sphingomonas	-	-	-	-	-	-	-	1.9	-
	Pantoea	-	-	-	-	-	-	-	1.9	-
	*Enhydrobacter**	-	-	-	-	-	-	4.3	-	-
	Pseudomonas	-	5.9	-	-	-	2.5	1.1	2.9	0.7
	Unclassified	57.9	5.9	42.9	5.8	12.9	72.1	81.9	49.5	13.4

The asterisks (*) represent newly identified genera in mosquitoes according to Minard et al., 2013a,b.

individuals or mixing several 16S amplicons either before or after PCR amplification) and depth of sequencing (number of reads). The primers chosen targeted the V5-V6 hypervariable region of 16S rRNA which allows a large number of bacterial taxa to be detected from sequences available in databases (94% of RDP database) and takes into account other limiting factors such as amplicon size and a lack of hybridization with host DNA.

The results obtained show first that a depth of at least 16,000 reads was necessary to accurately reach the saturation of richness discovery curves. Indeed, the observed richness was made to approach the estimated richness by increasing the depth of sequencing as demonstrated by comparing S3 (4276 reads) and S3′ (22,296 reads). In addition, as these two datasets originated from the same amplicon sample sequenced independently, the low Bray–Curtis dissimilarity levels between them reflects experimental reproducibility. Another factor evaluated was whether the pooling of samples would prove a cost-effective way to compare a huge number of samples. The drawback is that pooling may hide variability

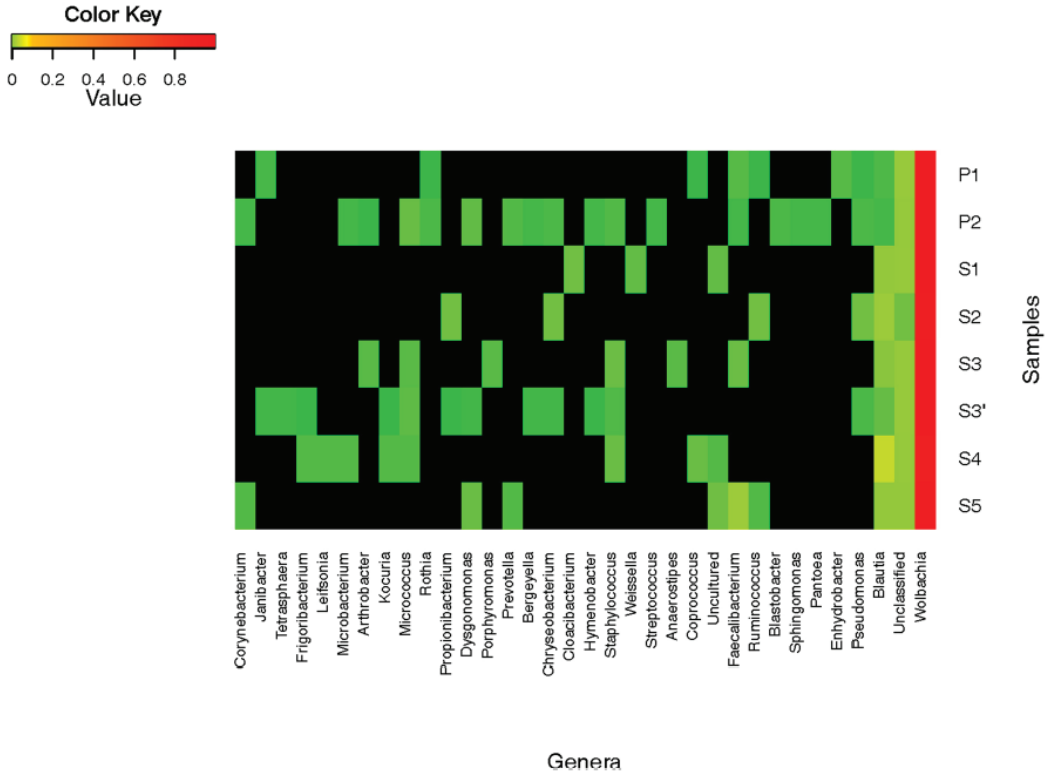


FIGURE 4 | Relative abundance of bacterial genera in *Aedes albopictus*. Heatmap represent the proportions of OTUs at the genus level.

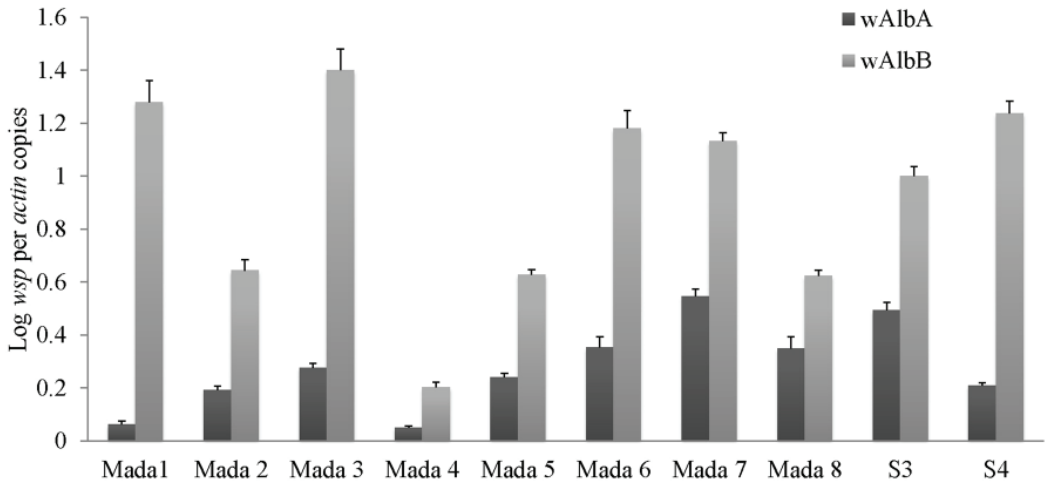


FIGURE 5 | *Wolbachia* titers in *Aedes albopictus* individuals. The ratio of *Wolbachia wsp* gene to *Aedes albopictus actin* gene copies is reported for *w*AlbA and *w*AlbB strains in S3 and S4 samples and for 8 other samples from the same site (Mada1 to Mada 8).

in the bacterial composition among samples. Here, we showed that it is preferable to pool amplicons rather than DNA before amplification as the latter method clearly failed to detect rare sequences.

In this study, pyrosequencing amplicons from *Ae. albopictus* bacterial microbiota revealed a lower Simpson diversity index than previously obtained with fingerprint methods (Zouache et al., 2011). However, using 454 pyrosequencing of 16S rRNA

fragments, Osei-Poku et al. (2012) found that 23 genera occurred at a frequency of more than 1% in the guts of at least one individual of different mosquito species. They also reported very low bacterial diversity within individuals, with a single OTU typically making up two-thirds of all the bacteria in all field-caught individuals from seven species studied, which is similar to our results. Interestingly, the results presented here reveal the highest genus richness that we have yet found in *Ae. albopictus* using various methods (Zouache et al., 2011, 2012; Valiente Moro et al., 2013). The results show that high throughput sequencing is an efficient way to deeply investigate microbiota composition in mosquitoes.

We conclude that *Wolbachia* was the principle component of *Ae. albopictus* microbiota in different individuals as surprisingly about 99% of reads were *Wolbachia* sequences independent of the experimental method used. The relative densities of *Wolbachia* *w*AlbA and *w*AlbB in both field-caught and lab-reared *Ae. albopictus* have been measured by quantitative PCR and the values we report here are similar to those previously found in field-caught populations (Tortosa et al., 2010; Zouache et al., 2011, 2012). All mosquito samples analyzed here were positive for both strains. Possibly the abundance of *Wolbachia* and strain bi-infection confers a fitness advantage like that described in *Wolbachia*-superinfected mosquitoes (Dobson et al., 2002, 2004). This selective pressure that acts on hatching rates and lifespan in laboratory conditions could be a reason for the predominance of *Wolbachia* in field populations mitigating the metabolic cost of symbiosis. Cytoplasmic incompatibility induced by *Wolbachia* is also responsible for a high prevalence of superinfected females (Kittayapong et al., 2002; Dobson et al., 2004; Zouache et al., 2011).

Sequences affiliated to *Blautia* were the second most abundant after those from *Wolbachia*. This is the first report of the presence of this genus in *Ae. albopictus* and even in mosquitoes. *Blautia* are anaerobic acetogenic members of Firmicutes and some have been isolated from mammal guts (Bernalier et al., 1996; Gagen et al., 2010). In addition to *Blautia*, we discovered other anaerobic bacteria in *Ae. albopictus*, including *Faecalibacterium*, *Ruminococcus*, and *Coprococcus*. Some of these are thought to be involved in the metabolism of organic compounds such as acetic acid in the human gut (Tsai et al., 1976; Wrzosek et al., 2013). Of the 32 bacterial genera identified overall, 9 had been previously found in *Ae. albopictus* and 8 others had already been described in other mosquito species using low throughput molecular techniques (reviewed in Minard et al., 2013a). Among these bacteria, the genus *Pantoea* is one of the most prevalent bacterial cultivable groups identified in field-caught *Ae. albopictus* from Madagascar (Valiente Moro et al., 2013). The confirmation of the presence of these bacterial taxa in *Ae. albopictus* highlights the urgency of characterizing the metabolic aspects of these host-microbe interactions in relation to habitat specialization. Stinkingly, some human opportunistic pathogens belong to genera that were identified in mosquitoes such as *Pseudomonas*, *Staphylococcus*, *Chryseobacterium*, and *Dysgonomonas* (Hironaga et al., 2008; Asaad et al., 2013; Dettman et al., 2013; Ozcan et al., 2013; Coates et al., 2014). Linked to the contact between mosquito proboscis and human circulation during females' blood feeding, these observations argue the possibility of a mosquito-mediated bacterial transmission. Finally, a number of sequences were not assigned to any bacterial family but sequencing longer amplicons might improve their identification rate.

CONCLUSION

Here we developed a high-throughput sequencing protocol to phylotype bacterial communities associated with *Ae. albopictus* mosquitoes. To our knowledge, this is the first time that such an approach has been used to explore *Ae. albopictus* microbiota. Although the results reveal the most complete picture of the bacterial microbiota in any given insect, they also show the limits of the high-throughput sequencing approach when there is a dominant endosymbiotic species. Alternative strategies such as the use of blocking primers (Vestheim et al., 2011) will be implemented to specifically discard sequences of the particularly abundant *Wolbachia* endosymbiont. The NGS approach developed in this study will be helpful to perform a large scale analysis of mosquito-associated microbiota from different geographic locations and would allow exploring the role of bacteria in invasive capacities of mosquitoes.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Guillaume Minard, Claire Valiente Moro, and Patrick Mavingui conceived and designed the work. Guillaume Minard, Florence-Hélène Tran, and Van Tran-Van performed the experiments. Guillaume Minard and Audrey Dubost managed the data mining. Guillaume Minard, Claire Valiente Moro, and Patrick Mavingui analyzed and interpreted the data, and drafted the manuscript and the final version was approved by all the authors.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Maxime Bruto for his help in phylogeny analysis. Funding for this project was provided by grants from EC2CO CNRS and CMIRA Région Rhône-Alpes. This research was also partially funded by the ERA-NET BiodivERsA, with the national funders FRB France, FWF Austria, and DFG Germany, part of the 2012-2013 BiodivERsA call for research proposals, and was carried out within the frameworks of GDRIs "Biodiversité et Développement Durable à Madagascar" and "Biodiversity and Infectious Diseases in Southeast Asia."

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: http://www.frontiersin.org/journal/10.3389/fcimb.2014.00059/abstract

Figure S1 | Alignment of *Wolbachia* reads. *Wolbachia* reads Wolb G1 and Wolb G2 were aligned with sequences from most closely related taxa (based on V5-V6 *rrs* sequences) and other *Wolbachia* sequences retrieved from GenBank, using Jalview software. A 25-bp *Wolbachia* specific region is highlighted.

REFERENCES

Andersson, A. F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Nyrén, P., and Engstrand, L. (2008). Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* 3:e2836. doi: 10.1371/journal.pone.0002836

Asaad, M. A., Al-Ayed, M. S., and Quresh, M. A. (2013). Emergence of unusual nonfermenting gram-negative nosocomial pathogens in a Saudi hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.* 66, 507–511. doi: 10.7883/yoken.66.507

Benedict, M. Q., Levine, R. S., Hawley, W. A., and Lounibos, L. P. (2007). Spread of the tiger: global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 7, 76–85. doi: 10.1089/vbz.2006.0562

Bernalier, A., Willems, A., Leclerc, M., Rochet, V., and Collins, M. D. (1996). *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sp. nov., a new H2/CO2-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces. *Arch. Microbiol.* 166, 176–183. doi: 10.1007/s002030050373

Boissière, A., Tchioffo, M. T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S. E., et al. (2012). Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLOS Pathog.* 8:e1002742. doi: 10.1371/journal.ppat.1002742

Bonilauri, P., Bellini, R., Calzolari, M., Angelini, R., Venturi, L., Fallacara, F., et al. (2008). Chikungunya virus in *Aedes albopictus*, Italy. *Emerg. Infect. Dis.* 14, 852–854. doi: 10.3201/eid1405.071144

Brumin, M., Kontsedalov, S., and Ghanim, M. (2011). Rickettsia influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Sci.* 18, 57–56. doi: 10.1111/j.1744-7917.2010.01396.x

Cancrini, G., Scaramozzino, P., Gabrielli, S., Di Paolo, M., Toma, L., and Romi, R. (2007). *Aedes albopictus* and *Culex pipiens* implicated as natural vectors of *Dirofilaria repens* in central Italy. *J. Med. Entomol.* 44, 1064–1066. doi: 10.1603/0022-2585(2007)44[1064:AAACPI]2.0.CO;2

Caron, M., Paupy, C., Grard, G., Becquart, P., Mombo, I., Nso, B. B., et al. (2012). Recent introduction and rapid dissemination of Chikungunya virus and Dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in Gabon, central Africa. *Clin. Infect. Dis.* 55, e45–e53. doi: 10.1093/cid/cis530

Chouaia, B., Rossi, P., Montagna, M., Ricci, I., Crotti, E., Damiani, C., et al. (2010). Molecular evidence for multiple infections as revealed by typing of *Asaia* bacterial symbionts of four mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7444–7450. doi: 10.1128/AEM.01747-10

Coates, R., Moran, J., and Horsbugh, M. J. (2014). Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol.* 9, 75–91. doi: 10.2217/fmb.13.145

Cole, J. R., Wang, Q., Cardenas, E., Fish, J., Chai, B., Farris, R. J., et al. (2009). The Ribosomal Database Project: improved alignments and new tools for rRNA analysis. Nucleic Acids Res. 37, D141–D145. doi: 10.1093/nar/gkn879

Dettman, J. R., Rodrigue, N., Aaron, S. D., and Kassen, R. (2013). Evolutionary genomics of epidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 21065–21070. doi: 10.1073/pnas.1307862110

Dobson, S. L., Marsland, E. J., and Rattanadechakul, W. (2002). Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* 160, 1087–1094.

Dobson, S. L., Rattanadechakul, W., and Marsland, E. J. (2004). Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* 93, 135–142. doi: 10.1038/sj.hdy.6800458

Douglas, A. E. (2011). Lessons from studying insect symbioses. *Cell Host Microbe* 10, 359–367. doi: 10.1016/j.chom.2011.09.001

Edgar, R. C., Haas, B. J., Clemente, J. C., Quince, C., and Knight, R. (2011). UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection. *Bioinformatics* 27, 2194–2200. doi: 10.1093/bioinformatics/btr381

Feldhaar, H. (2011). Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecol. Entomol.* 36, 533–543. doi: 10.1111/j.1365-2311.2011.01318.x

Fukatsu, T. (2012). Next-generation sequencing sheds light on intricate regulation of insect gut microbiota. Mol. Ecol. 21, 5908–5910. doi: 10.1111/mec.12090

Gagen, E. J., Denman, S. E., Padmanabha, J., Zadbuke, S., Al Jassim, R., Morrison, M., et al. (2010). Functional gene analysis suggests different acetogen populations in the bovine rumen and tammar wallaby forestomach. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 7785–7795. doi: 10.1128/AEM.01679-10

Gascuel, O. (1997). BIONJ: an improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Mol. Biol. Evol.* 14, 685–695. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a025808

Grandadam, M., Caro, V., Plumet, S., Thiberge, J. M., Souarès, Y., Failloux, A. B., et al. (2011). Chikungunya virus, southeastern France. *Emerg. Infect. Dis.* 17, 910–913. doi: 10.3201/eid1705.101873

Gratz, N. G. (2004). Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. Med. Vet. Entomol. 18, 215–227. doi: 10.1111/j.0269-283X.2004.00513.x

Hironaga, M., Yamane, K., Inaba, M., Haga, Y., and Arakawa, Y. (2008). Characterization and antimicrobial succeptibility of *Dysgonomonas capnocytophagoides* isolated from human blood sampe. *Jpn. J. Infect. Dis.* 61, 212–213.

Kittayapong, P., Baisley, K. J., Sharpe, R. G., Baimai, V., and O'Neill, S. L. (2002). Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 66, 103–107.

Köhler, T., Dietrich, C., Scheffrahn, R. H., and Brune, A. (2012). High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.). *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 4691–4701. doi: 10.1128/AEM.00683-12

Medlock, J. M., Hansford, K. M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., et al. (2012). A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 435–447. doi: 10.1089/vbz.2011.0814

Minard, G., Mavingui, P., and Moro, C. V. (2013a). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit. Vectors* 6, 146. doi: 10.1186/1756-3305-6-146

Minard, G., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Hellard, E., Ravelonandro, P., Mavingui, P., et al. (2013b). Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS Microbiol. Ecol.* 83, 63–73. doi: 10.1111/j.1574-6941.2012.01455.x

Moran, N. A., Hansen, A. K., Powell, J. E., and Sabree, Z. L. (2012). Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PLoS ONE* 7:e36393. doi: 10.1371/journal.pone.0036393

Oliver, K. M., Russell, J. A., Moran, N. A., and Hunter, M. S. (2003). Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 1803–1807. doi: 10.1073/pnas.0335320100

Osei-Poku, J., Mbogo, C. M., Palmer, W. J., and Jiggins, F. M. (2012). Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol. Ecol.* 21, 5138–5150. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05759.x

Ozcan, N., Tuba, D., Tekin, A., Kelekci, S., Can, S., Ezin, O., et al. (2013). Is *Chryseobacterium indologenes* a shunt-lover bacterium? A case report and review of the literature. *Infez. Med.* 4, 312–316.

R Development Core Team. (2009). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna: R Foundation for Statistical Computing. Available online at: http://www.R-project.org

Ridley, E. V., Wong, A. C., Westmiller, S., and Douglas, A. E. (2012). Impact of the resident microbiota on the nutritional phenotype of *Drosophila melanogaster*. *PLoS ONE* 7:e36765. doi: 10.1371/journal.pone.0036765

Rueda, L. M. (2004). Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with Dengue Virus Transmission. *Zootaxa* 589, 33–41.

Schloss, P. D., Westcott, S. L., Ryabin, T., Hall, J. R., Hartmann, M., Hollister, E. B., et al. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 7537–7541. doi: 10.1128/AEM.01541-09

Shi, W., Syrenne, R., Sun, J. Z., and Yuan J. S. (2010). Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the "omics" age. *Insect Sci.* 17, 199–219. doi: 10.1111/j.1744-7917.2010.01340.x

Simon, J. C., Boutin, S., Tsuchida, T., Koga, R., Le Gallic, J. F., Frantz, A., et al. (2011). Facultative symbiont infections affect aphid reproduction. *PLoS ONE* 6:e21831. doi: 10.1371/journal.pone.0021831

Toft, C., and Andersson, S. G. (2010). Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nat. Rev. Genetics.* 11, 465–475. doi: 10.1038/nrg2798

Tortosa, P., Charlat, S., Labbé, P., Dehecq, J. S., Barré, H., and Weill, M. (2010). *Wolbachia* age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: a host evolutionary response to cytoplasmic incompatibility? *PLoS ONE* 5:e9700. doi: 10.1371/journal.pone.0009700

Tortosa, P., Courtiol, A., Moutailler, S., Failloux, A. B., and Weill, M. (2008). Chikungunya-*Wolbachia* interplay in *Aedes albopictus*. *Insect. Mol. Biol.* 17, 677–684. doi: 10.1111/j.1365-2583.2008.00842.x

Tsai, C. G., Gates, D. M., Indledew, W. M., and Jones, G. A. (1976). Products of anaerobic phloroglucinol degradation by *Coprococcus* sp. Pe15. *Can. J. Microbiol.* 22, 159–164. doi: 10.1139/m76-022

Tsuchida, T., Koga, R., and Fukatsu, T. (2004). Host plant specialization governed by facultative symbiont. *Science* 303, 1989. doi: 10.1126/science.1094611

Valiente Moro, C., Tran, F. H., Raharimalala, F. N., Ravelonandro, P., and Mavingui, P. (2013). Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiol.* 13:70. doi: 10.1186/1471-2180-13-70

Vestheim, H., Deagle, B. E., and Jarman, S. N. (2011). Application of blocking oligonucleotides to improve signal-to-noise ratio in a PCR. *Methods Mol. Biol.* 687, 265–274. doi: 10.1007/978-1-60761-944-4_19

Wang, Y., Gilbreath, T. M. III., Kukutla, P., Yan, G., and Xu, J. (2011). Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito Anopheles gambiae in Kenya. *PLoS ONE* 6:e24767. doi: 10.1371/journal.pone.0024767

Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M. L., Bouet, S., Joncquel Chevalier-Curt, M., Robert, V., et al. (2013). *Bacteroides thetaiotaomicron* and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* 11:61. doi: 10.1186/1741-7007-11-61

Zouache, K., Michelland, R. J., Failloux, A. B., Grundmann, G. L., and Mavingui, P. (2012). Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Mol. Ecol.* 21, 2297–2309. doi: 10.1111/j.1365-294X.2012.05526.x

Zouache, K., Raharimalala, F. N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L. H., Ravelonandro, P. et al. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol. Ecol.* 75, 377–389. doi: 10.1111/j.1574-6941.2010.01012.x

Zouache, K., Voronin, D., Tran-Van, V., Mousson, L., Failloux, A. B., and Mavingui, P. (2009). Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PLoS ONE* 4:e6388. doi: 10.1371/journal.pone.0006388

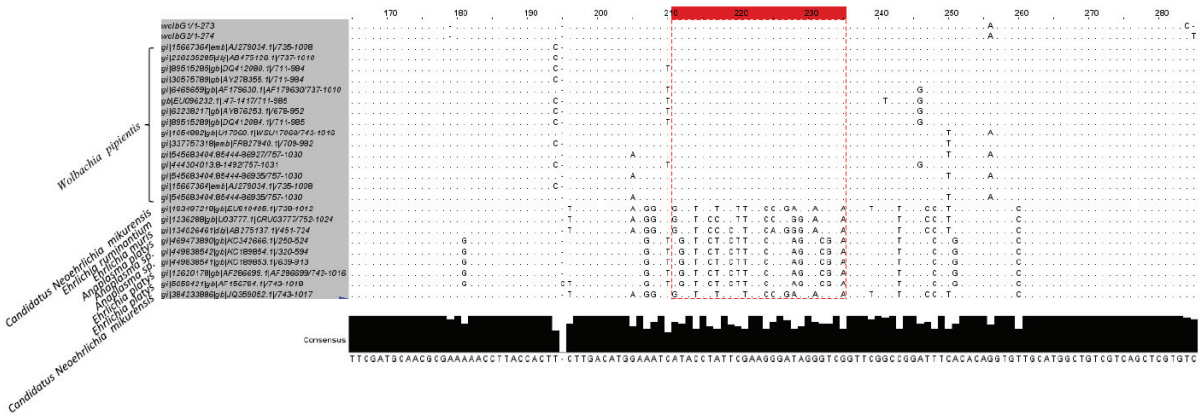
Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Received: 27 January 2014; paper pending published: 13 April 2014; accepted: 21 April 2014; published online: 14 May 2014.

Citation: Minard G, Tran F-H, Dubost A, Tran-Van V, Mavingui P and Valiente Moro C (2014) Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito Aedes albopictus: a pilot study. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4:59. doi: 10.3389/fcimb.2014.00059

This article was submitted to the journal Frontiers in Cellular and Infection Microbiology.

Copyright © 2014 Minard, Tran, Dubost, Tran-Van, Mavingui and Valiente Moro. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) or licensor are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.



FigureS1 | Alignment of *Wolbachia* reads. *Wolbachia* reads WolbG1 and WolbG2 were aligned with sequences from most closely related taxa (based on V5-V6 *rrs* sequences) and other *Wolbachia* sequences retrieved from GenBank, using Jalview software. A 25-bp *Wolbachia* specific region is highlighted.

3.3. Discussion et conclusions

Nous avons choisi de mener un projet pilote pour décrire la diversité bactérienne associée au moustique tigre en utilisant la technique de pyroséquençage. Différentes modalités de préparation des échantillons (analyse individuelle ou constitution de pools avant ou après l'étape d'amplification) et de profondeur de séquençage (nombre de lectures) ont été testées. Au préalable, une analyse *in silico* a permis de définir les amorces ciblant la région V5-V6 du gène *rrs* comme celle permettant de recouvrer la diversité de taxons bactériens la plus large (94% de la base de données du *Ribosomal Database Project*) tout en amplifiant un fragment ayant une taille compatible avec la technologie de séquençage et en ne s'hybridant pas sur l'ADN de l'hôte.

Les résultats obtenus ont tout d'abord permis de montrer qu'une profondeur d'environ 16 000 lectures était suffisante pour atteindre la saturation des courbes de raréfaction de la richesse spécifique. En effet, l'augmentation du nombre de lectures entre S3 (4 276 lectures) et S3' (22 296 lectures) s'est traduite par une proximité entre la richesse observée et la richesse estimée. La faible dissimilarité, estimée par l'indice de Bray-Curtis, entre ces deux jeux de données issus du même échantillon a, par ailleurs, permis de valider la reproductibilité des résultats obtenus. Un autre facteur testé lors de cette étude était l'assemblage des ADNs individuels au sein d'un même échantillon permettant d'effectuer à moindre coût l'étude d'un plus grand nombre d'échantillons. Cependant, un inconvénient majeur à ce type d'approche résidait en la perte d'informations sur la variabilité inter-individuelle. Toutefois, nous avons montré qu'il était préférable d'assembler les échantillons individuels à partir d'amplicons respectifs plutôt qu'à partir de leurs ADNs avant ampification. En effet, un pool d'ADNs suivi d'amplification pouvait entrainer une diminution de la richesse observée par des biais d'amplification de séquences associées aux taxons rares.

Le pyroséquençage des amplicons issus du microbiote bactérien d'*Ae. albopictus* a révélé une plus faible diversité α que lors de précédentes études effectuées sur le même site par une méthode d'empreinte moléculaire (Zouache et al., 2011). De plus, les résultats ont révélé une plus grande richesse (91 taxons pour le mélange ind) en comparaison de ce qui avait été précédement décrit chez *Ae. albopictus* par différentes méthodes (Chouaia et al., 2010; Zouache et al., 2011, 2012; Valiente Moro et al., 2013). De façon surprenante et inattendue, nous avons également démontré que *Wolbachia* composait la majeure partie du microbiote bactérien avec près de 99% des lectures indépendament du protocole expérimental utilisé. Les mesures de densités relatives de *Wolbachia w*AlbA et *w*AlbB n'ont pas montré de différence significative avec celles précédement évaluées au sein de populations naturelles ou de laboratoire (Tortosa et al., 2010; Zouache et al., 2011). Tous les moustiques femelles se sont révélés positifs pour les deux clades de *Wolbachia*. Différents

facteurs pourraient expliquer la forte proportion de ces bactéries chez le moustique. Des expériences en laboratoire ont ainsi montré que la bi-infection confèrait un avantage sélectif aux femelles en augmentant leur taux de fécondité et leur durée de vie (Dobson et al., 2002; Dobson et al., 2004). De même, il a été montré que l'incompatibilité cytoplasmique induite par la bactérie serait reponsable de la forte prévalence de femelles bi-infectées (Kittayapong et al., 2002; Dobson et al., 2004; Zouache et al., 2011).

Parmi les 32 genres identifiés, 9 ont déjà été décrits chez *Ae. albopictus* tandis que 8 autres ont déjà été retrouvés chez d'autres espèces de moustiques (Minard, Mavingui, et al., 2013). Les analyses ont permis de révéler que les séquences assignées au genre *Blautia* étaient les plus abondantes après *Wolbachia.* Il s'agit de la première identification de ce genre chez *Ae. albopictus* ou les moustiques en général. *Blautia* est une bactérie anaérobie, acétogène, appartenant au phylum des Firmicutes et dont certaines souches ont été isolées du tube digestif de mammifères (Bernalier et al., 1996; Gagen et al., 2010). En plus de *Blautia*, d'autres bactéries anaérobies ont été identifiées dont les genres *Faecalibacterium, Ruminococcus* et *Coprococcus.* Certaines d'entre elles ont déjà été impliquées dans le métabolisme de composés organiques tel que l'acide acétique dans l'intestin humain (Tsai et al., 1976; Wrzosek et al., 2013). Parmi les bactéries identifiées, le genre *Pantoea* avait été récemment montré comme étant la bactérie cultivable la plus prévalente au sein des populations malgaches d'*Ae. albopictus* (Valiente Moro et al., 2013). La confirmation de sa détection pose la question de son rôle éventuel chez le moustique. De manière intéressante, certains genres contenant des pathogènes opportunistes de l'homme ont également été identifiés tels que *Pseudomonas, Staphylococcus, Chryseobacterium* et *Dysgonomonas* (Hironaga et al., 2008; Asaad et al., 2013; Dettman et al., 2013; Ozcan et al., 2013; Coates et al., 2014). Ces observations soulèvent, une fois de plus, la possibilité d'infections bactériennes transmises par les moustiques.

En conclusion, nous avons développé un protocole de phylotypage haut débit des communautés bactériennes associées à *Ae. albopictus*. Il s'agit de la première application de ce type d'analyse chez le moustique tigre. Si ces résultats ont permis d'obtenir une vue d'ensemble de la composition du microbiote bactérien du moustique, ils ont également permis de soulever le problème de l'étude du microbiote en présence d'un endosymbiote dominant. Dans le but d'accéder à une diversité plus importante et non biaisée du microbiote bactérien associé au moustique, la prochaine étape a donc été de mettre au point une stratégie alternative permettant d'éliminer spécifiquement les séquences associées au genre *Wolbachia*.

3.4. Mise en place d'une stratégie alternative pour l'étude de la diversité bactérienne du moustique tigre

3.4.1. Stratégie 1 : Elimination des séquences de *Wolbachia*

3.4.1.1. Introduction

L'essai pilote décrit au cours du chapitre précèdent a permis de révéler la très forte abondance relative de *Wolbachia* au sein des communautés bactériennes associées au moustique *Ae. albopictus*. Cette diminution de l'équitabilité (régularité de l'abondance relative des taxons) est un problème inhérent à l'analyse de la diversité bactérienne d'échantillons environnementaux et va avoir pour effet de masquer la diversité des groupes bactériens rares (von Wintzingerode et al., 1997). Pourtant, ceux-ci pourraient également être susceptibles d'interagir avec l'hôte. L'abondance de *Wolbachia* est d'autant plus problématique que de précédentes études de prévalence effectuées sur différentes populations naturelles ou de laboratoire ont démontré qu'elle était systématiquement retrouvée au sein des individus d'*Ae. albopictus* (Bourtzis et al., 2014). Ce biais rencontré dans l'analyse de la diversité bactérienne associée aux populations de Madagascar est donc succeptible de se retrouver quelle que soit l'origine des populations de moustique tigre. L'objectif suivant a donc été de déterminer et de valider l'approche la plus pertinente nous permettant de réduire le biais induit par l'abondance de *Wolbachia* et ainsi de répondre aux questions biologiques posées. L'une des stratégies pouvant être adoptée est l'élimination spécifique des séquences associées à *Wolbachia.* Les analyses de diversité bactérienne ne sont cependant pas les seuls exemples dans lesquels il peut être nécessaire de se soustraire de séquences dominantes connues. En effet, l'élimination de séquences non cibles a également montré son efficacité à partir de matrices variées comme par exemple la détection de parasites dans des échantillons sanguins ou de mutations rares dans des échantillons cliniques, ou encore l'analyse du contenu en ADN du bol alimentaire d'un hôte (revu par Vestheim et al., 2011). Dans ce contexte, l'une des méthodologies les plus abouties reste l'utilisation de sondes bloquantes. Cette méthode a été utilisée à plusieurs reprises et avec succès pour éliminer des séquences humaines lors de l'amplification du gène codant l'ARNr 16S de mammifères anciens (Boessenkool et al., 2012) ou encore pour éliminer des séquences de l'hôte ou de symbiotes lors de l'amplification du gène codant l'ARNr 18S du bol alimentaire de crevettes, de copépodes et même du moustique tigre *Ae. albopictus* (Vestheim and Jarman, 2008; Egizi et al., 2013; Hu et al., 2014). Cette méthode est basée sur l'ajout, dans le mélange de PCR d'une sonde couplée à un groupement qui va

masquer son extêmité 3'-OH qui ne pourra alors plus être reconnue par la polymérase, entraînant ainsi l'arrêt de l'élongation du brin de 5' en 3' (Vestheim et al., 2011) (Figure 15).

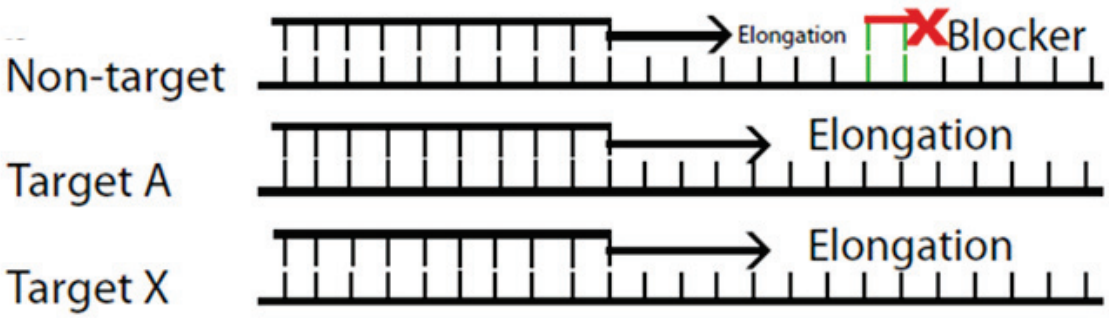


Figure 15. Principe des sondes bloquant l'élongation. La sonde en rouge couplée à un groupement bloquant (Blocker, Tableau 3) va stopper l'élongation de la polymérase sur les séquences spécifiques sur lesquelles elle s'hybridera (Non-target). Les séquences sur lesquelles les sondes ne se seront pas fixées pourront être amplifiées (Target A, Target X). (adapté de (Vestheim and Jarman, 2008).

3.4.1.2. Matériel et méthodes

Choix de la sonde bloquante

Différents critères doivent être respectés dans la conception de sondes bloquantes. Elles doivent (i) s'hybrider sur la séquence non cible, (ii) ne pas s'hybrider sur les séquences cibles, (iii) être situées à proximité d'une amorce d'amplification et si possible à cheval sur le site de fixation pour entrer en compétition avec l'amorce lors de l'hybridation, (iv) être orientées dans le même sens que l'amorce la plus proche, (v) avoir une plus grande taille que les amorces d'amplification pour s'hybrider à plus haute température (donc en premier) sur la matrice au cours de la PCR, (vi) ne pas faire plus de 25 pb pour réduire le risque d'hybridation aspécifique, (vii) ne pas s'hybrider avec les amorces d'amplification et (viii) ne pas présenter de structures secondaires. Les séquences UTOs *Wolb*G1 et *Wolb*G2 précédemment obtenues par séquençage haut débit de la région V5-V6 du gène *rrs* des bactéries associées à *Ae. albopictus* (Minard et al., 2014) ont été confrontées par alignement local aux bases de données nucléotidiques non redondantes (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/).

Afin d'identifier des régions spécifiques de *Wolbachia*, les séquences *Wolb*G1 et *Wolb*G2 ont été alignées avec 15 séquences représentatives de *Wolbachia* et 9 séquences orthologues représentatives des taxons les plus proches (>80% de similarité) sur la base de la région V5-V6 du gène *rrs*. L'alignement des séquences a permis d'identifier une région conservée au sein du genre *Wolbachia*, mais différente des séquences, et proche de l'amorce reverse 1061 R (voir (Minard et al., 2014) Figure|S1). Une sonde de 24pb nommée W- (5'-GACCCTATCCCTTCGAATAGGTAT-3') et complémentaire de cette région a été générée avec un écart minimal de 33 bases depuis la fin de l'amorce 1061R. L'alignement local réalisé avec le logiciel *blastall* de la sonde W- sur le jeu de données généré au cours de l'essai pilote (en autorisant un maximum de 2 bases de différences) a permis de montrer une spécificité et une sensibilité de 100% pour la reconnaissance des séquences associées à *Wolbachia.* Un test d'hybridation *in silico* (2 erreurs autorisées) a également été effectué avec l'outil *probematch* sur la base de données de séquences de référence *rrs* du SILVA mise à jour 115 (http://www.arb-silva.de/) et permis de confirmer la spécificité de la sonde.

Materiel biologique et extraction d'ADN

Les moustiques *Ae. albopictus* femelles sont issus de populations naturelles chantillonnées à Madagascar et naturellement infectées par *Wolbachia* (Minard et al., 2014). La souche d'*Acinetobacter calcoaceticus* 3a utilisée comme témoin négatif de blocage de l'amplification a été précédemment isolée d'*Ae. albopictus* (Minard, Tran, et al., 2013). La lignée cellulaire C6/36 d'*Ae. albopictus* infectée par la souche *Wolbachia pipientis w*AlbB, désignée C6/36_wAlbB (Thèse de Vincent Raquin), a servi de témoin positif de blocage de l'amplification. Les ADNs de la souche *A. calcoaceticus* 3a et des cellules C6/36_*w*AlbB ont été extraits à l'aide du kit DNeasy Blood & Tissue en suivant les recommandations du frabriquant concernant les bactéries à Gram-négatif (Qiagen, USA). Les ADNs de moustiques ont été extraits comme précédemment décrit (Minard et al., 2014).

Contrôle de pureté des sondes

La région hypervariable V5-V6 du gène rrs a été amplifiée avec les amorces 784F 5'-AGGATTAGATACCCTGGTA-3' et 1061R 5'-CRRCACGAGCTGACGAC-3' comme précédemment décrit (Andersson et al., 2008; Minard et al., 2014). Les différentes sondes testées sont présentées dans le Tableau 3. Chaque sonde a été couplée à un groupement bloquant l'amplification en position terminale 3' et les essais préliminaires de PCR ont été effectués avec un ratio sonde : amorce de 10 : 1, en présence ou non de matrice ADN (Vestheim et al., 2011) (Tableau 3). Le protocole optimal d'amplification de la région V5-V6

précédemment décrit a tout d'abord été suivi dans le but de tester le taux de contamination apporté par les sondes (Minard et al., 2014). Une amplification positive indique une contamination (non pureté des sondes). Afin de connaître l'identité des séquences contaminantes, les produits d'amplification ont été alors purifiés grâce au kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, USA) en suivant les recommandations du fabriquant puis séquencés (Biofidal-DTAMB, France).

Tableau 3. Caractéristiques des différentes sondes bloquantes

Nom de la sonde	modification en position 3'	fournisseur
W-1	groupement C3 spacer CpG	LifeTechnologies Inc. (USA)
W-2	groupement Phosphate	LifeTechnologies Inc. (USA)
W-3	groupement C3 spacer CpG	Thermoscientific (Allemagne)
W-4	groupement C6 Amine	Thermoscientific (Allemagne)

Digestion enzymatique des contaminants

La concentration de la sonde a été mesurée par spectrophotométrie (SAFAS, Monaco). Pour identifier des sites de restriction d'intérêt dans les séquences contaminantes afin de les éliminer par action d'endonucléases, les séquences obtenues ont été analysées avec l'outil Restriction Mapper v3.0. Des essais de digestion ont été réalisés avec 14 µg d'ADN de sonde, 20 unités d'enzyme de restricition et 1X de tampon (NewEngland Biolabs, USA) dans 250 µL de volume réactionnel. Le mélange a été incubé 1h à 37°C, puis l'enzyme a été inactivée 20 min à 65°C. Selon les protocoles (A ou B), le mélange a été (A) dosé par spectrophotométrie (SAFAS, Monaco) et dilué à 10 µM, (B) purifié avec le kit QIAquick PCR Purification (Qiagen, USA) puis dosé par spectrophotométrie et dilué à 10 µM.

Blocage de l'amplification

Différents essais d'amplification par PCR ou PCR quantitative ont été réalisés dans le but de tester l'efficacité de la sonde bloquante W-4. Le mélange PCR a été réalisé avec 200 nM de chaque amorce, 2 mM ou 1 mM de sonde bloquante W-3, 1 Unité de Taq polymerase (Life Technologies, USA) ou de aTaq recombinante sans activité exonucléasique (Promega, France), 1X de Tampon Tris et 0,06 $mg.mL^{-1}$ d'enzyme T4 gene32 (Roche, Suisse), 0,06 $mg.mL^{-1}$ d'albumine de sérum bovin (New England Biolabs, France) et 30 ng d'ADN. L'amplification a été réalisée selon le programme suivant : 5 min de dénaturation initiale à 95°C suivis de 25 cycles composés d'une dénaturation de 40 sec à 95°C, d'une hybridation de 40 sec à 54,2°C et d'une étape d'élongation de 30 sec à 72°C. Le blocage de l'amplification a ensuite été testé par PCR quantitative en utilisant des concentrations

décroissantes de rapports sondes : amorces allant de 8 : 1 à 0 : 1 (Boessenkool et al., 2012). La PCR quantitative a été réalisée avec 5 ng d'ADN, 300 nM d'amorce et 1X de mélange Lightcycler 480 SYBR Green I Master (Roche, Suisse). Les PCRs ont été réalisées selon le programme suivant : 5 min de dénaturation initiale à 95°C suivis de 25 cycles composés d'une dénaturation de 40s à 95°C, d'une phase palier optionnelle d'hybridation de la sonde de 20s à 63°C, d'une hybridation de 40s à 54,2°C et d'une étape d'élongation de 30s à 72°C.

3.4.1.3. Résultats et discussion

Essais de contamination des sondes

Pour un blocage optimal de l'élongation, il est recommandé d'utiliser les sondes bloquantes à un ratio sonde : amorce de 10 : 1. L'utilisation d'un tel ratio permet le blocage d'une séquence non cible 1000 fois plus concentrée que les séquences cibles (Vestheim et al., 2011). Cependant, les sondes, apportées à fortes concentrations dans le mélange, pouvaient également générer une contamination exogène lors de la mise au point du protocole d'élimination de séquences de *Wolbachia*, induisant alors des biais dans l'analyse de diveristé bactérienne des échantillons. Des tests PCR ont été préalablement effectués afin de détecter la présence d'éventuelles contaminations. Les résultats obtenus ont révélé une contamination visible pour chacune des quatre sondes testées (W-1, W-2, W-3, W-4) comme en témoigne la présence d'un signal d'amplification dans les échantillons ne contenant pas de matrice ADN (Figure 16). Ces amplifiats présentaient une intensité relative variable selon les sondes, allant de très intense (W-1) à faiblement intense (W-2, W-3, W-4). Les amplifiats de ces contrôles ont été purifiés et séquencés. L'analyse des séquences a révélé un mélange de séquences pour les protocoles utilisant les sondes W-2, W-3 et W-4 et une séquence contaminante unique pour la sonde W-1. Cette séquence présentait une forte similarité (99%) avec la bactérie *Ralstonia* sp. (N° d'accession KM054580.1). Afin d'éliminer cette contamination, nous avons entrepris la digestion de la portion V5-V6 du gène *rrs* de ce contaminant. Les tests de digestion *in silico* de la séquence avaient révélé la présence du site de restriction palyndromique GATC reconnu par l'enzyme Sau3AI. De façon intéressante, ce site était absent de la séquence de la sonde ainsi que des séquences *Wolb*G1 et *Wolb*G2 de *Wolbachia*. Le mélange contenant la sonde W-1 a donc été digéré par l'enzyme Sau3AI, puis testé en PCR avant ou après purification (Figure 17). Quelles que soient les modalités, les résultats ont montré la présence d'une contamination résiduelle pouvant être expliquée soit par une digestion incomplète des fragments contaminants, soit par l'apport d'une nouvelle contamination exogène émanant de l'enzyme utilisée. Pour contourner ce problème, deux alternatives ont été envisagées : diminuer le nombre de cycles

PCR pour empêcher l'amplification de la contamination et/ou réduire la concentration de sonde utilisée. L'utilisation conjointe de ces deux stratégies (25 cycles de PCR avec un ratio sonde : amorce de 8 : 1) a finalement permis d'éliminer toute contamination visible des produits d'amplification (Figure 18).

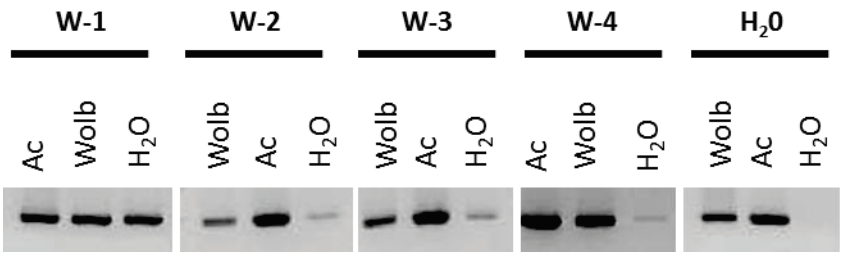


Figure 16. Test de contamination des sondes. Chaque sonde a été testée avec ajout de trois matrices: 30 ng d'ADN d'*A. calcoaceticus* 3b (Ac), 30 ng d'ADN de cellules C6/36 _*w*AlbB (Wolb) ou un volume équivalent d'eau (H_2O). Les différentes sondes bloquantes (**W-1, W-2, W-3, W-4**) ont été ajoutées aux mélanges selon un ratio sonde : amorces de 5 : 1. Pour la modalité contrôle (**H_2O**), un volume équivalent d'eau de dilution des amorces a été ajouté dans le mélange. Les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium puis séparés par migration électrophorétique et révélés par exposition aux Ultras Violets.

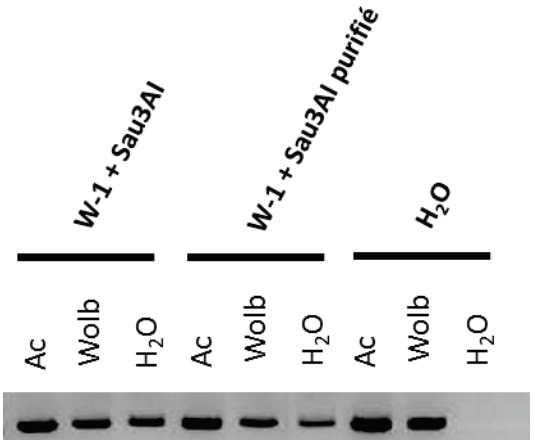


Figure 17. Essais de digestion des séquences contaminantes de la sonde W-1. Les digestions des séquences V5-V6 du gène *rrs* de *Ralstonia* ont été réalisées selon différents protocoles : digestion du mélange (**W-1 + Sau3AI**), digestion du mélange avec purification de la sonde (**W-1 + Sau3AI purifié**) ou ajout d'un volume équivalent d'eau de dilution de la sonde (**H_2O**). Des amplifications PCR de la région V5-V6 du gène *rrs* ont été réalisées avec différentes matrices : 30 ng d'ADN d'*A. calcoaceticus* 3b (Ac), 30 ng d'ADN de cellules C6/36_*w*AlbB (Wolb) ou un volume équivalent d'eau (H_2O). Les produits de PCR ont été déposés sur gel d'agarose 2% contenant du bromure d'éthidium, puis séparés par migration électrophorétique et révélés par exposition aux Ultras Violets.

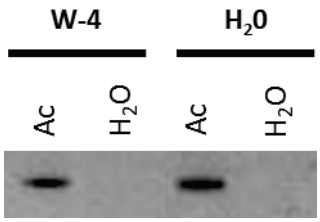


Figure 18. Optimisation du protocole de blocage de l'amplification avec la sonde W-4. Un total de 25 cycles de PCR de la région V5-V6 du gène *rrs* a été réalisé en présence de la sonde W-4 selon un ratio sonde : amorce de 8 : 1 (**W-4**) ou avec un volume d'eau équivalent (**H_2O).** Pour chaque modalité (**W-4** ou **H_2O)**, des tests ont été effectués en présence de 30ng d'ADN d'*A. calcoaceticus* 3b (Ac) ou d'un volume équivalent d'eau (H_2O).

Evaluation de l'efficacité du blocage de la sonde

Afin d'évaluer l'activité bloquante de la sonde W-4, différents ratios sonde: amorce (8 : 1, 5 : 1, 2.5 : 1, 1 : 1) ont été testés par PCR en temps réel sur la région V5-V6 du gène *rrs* (Figure 19). En effet, lors de l'amplification en présence de la sonde, un décalage du Ct (Crossing threshold) par rapport à la condition témoin sans sonde bloquante permet de quantifier l'activité de la sonde. Le Ct correspond au nombre de cycles nécessaires pour la détection d'une intensité de fluorescence significative représentant l'accumulation d'ADN double brin synthétisé par PCR. Cette valeur est inversement proportionnelle à la concentration de matrice initiale. Des tests réalisés lors d'études visant à bloquer l'amplification de gène *rrs* humain ont montré qu'un ratio sonde : amorce de 5 : 1 ou de 10 : 1 sur une matrice non cible présentait un écart de 1 Ct (Boessenkool et al., 2012). Ce décalage se traduisait par un écart Ct_{H2O} (en absence de la sonde) – Ct_{sonde} (en présence de la sonde) négatif impliquant une amplification tardive de l'échantillon en présence de la sonde. Les résultats obtenus sur une matrice d'ADN de cellules C6/36_*w*AlbB ou d'ADN d'*Ae. albopictus* naturellement infecté par *Wolbachia*, n'ont pas permis de mettre en évidence un décalage du Ct ou Ct tardif et ce pour aucune des concentrations de sonde utilisées. A l'inverse, le Ct apparaissait plus précocemment avec l'augmentation de la concentration de sonde (Figure 19). Ce résultat pourrait s'expliquer par l'apport d'ADN contaminant lié à la sonde qui a pour effet d'augmenter la concentration d'ADNr 16S bactérien. En effet, les contrôles effectués en présence d'ADN d'*A. calcoaceticus* 3b non ciblé par la sonde ont également montré un Ct précoce pour les fortes concentrations de sonde (Figure 19). De plus, l'apport de sonde à toutes les concentrations testées a également entraîné la détection d'un Ct précoce en l'absence de matrice ADN.

Pour améliorer l'hybridation de la sonde bloquante lors de la PCR en temps réel, un palier de température a été réalisé préalablement à l'hybridation des amorces. Le test a été effectué à la température d'hybridation de la sonde (63°C) pour un ratio sonde : amorce de 5 : 1 (Figure 20). L'utilisation de ce protocole n'a pas permis d'induire un décalage tardif du Ct, au contraire un Ct précoce a été obtenu pour toutes les modalités en présence de la sonde. Le blocage de l'élongation pouvant parfois être contourné par l'activité exonucleasique 5'-3' de la Taq polymerase, des amplifications de la région V5-V6 de *Wolbachia* ont été réalisés en PCR semi-quantitative à l'aide d'une polymérase recombinante (aTaq) sans activité exonucléasique. Ces essais n'ont pas révélé de différence d'intensité entre l'essai contenant la sonde et le témoin sans sonde.

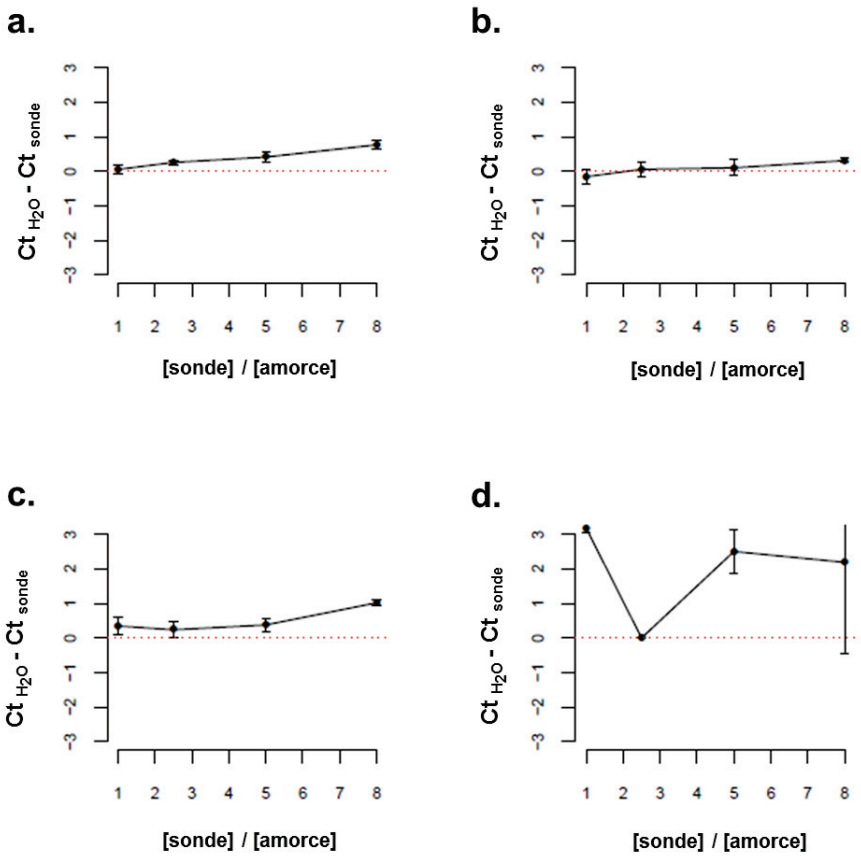


Figure 19. Evaluation de l'efficacité de l'amorce bloquante W-4 par PCR en temps réel. Les PCRs en temps réel de la région V5-V6 du gène *rrs* ont été réalisées avec 5 ng d'ADN de différentes matrices : (a) cellules C6/36_*w*AlbB, (b) *A. calcoaceticus* 3b, (c) *Ae. albopictus* ou (d) un volume équivalent d'eau. L'axe des abscisses représente le ratio de la concentration de sondes ([sonde]) par rapport à celle des amorces ([amorce]) tandis que l'axe des ordonnées représente la différence de Ct (Crossing threshold) entre l'amplification avec un volume d'eau (Ct_{H2O}) et celle avec la sonde W-4 (Ct_{sonde}). La droite Y=0 correspondant à l'égalité des deux valeurs de Ct est représentée en pointillés rouges.

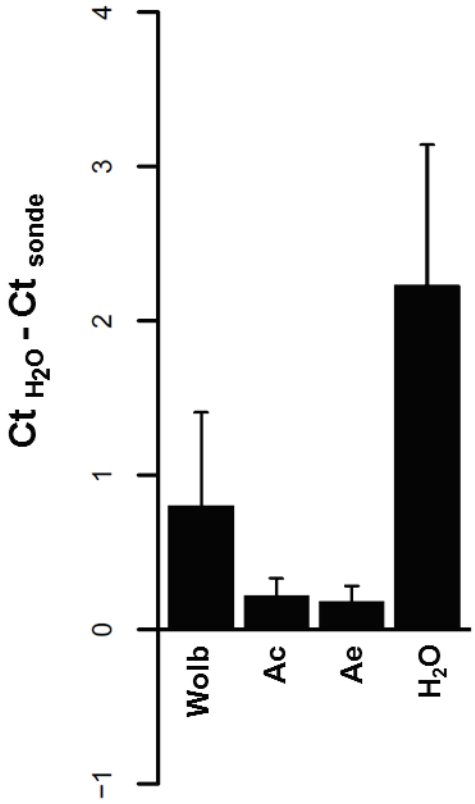


Figure 20. Evaluation de l'efficacité de l'amorce bloquante W-4 par PCR en temps réel avec paliers d'hybridation. Les PCR quantitatives de la région V5-V6 du gène *rrs* ont été réalisées, en présence de la sonde, avec 5ng d'ADN de différentes matrices : cellules C6/36_*w*AlbB (Wolb), *A. calcoaceticus* 3b (Ac), *Ae. albopictus* (Ae) ou un volume équivalent d'eau (H_2O). Les valeurs représentées correspondent à l'écart de Ct entre l'amplification réalisée avec un volume d'eau (Ct_{H2O}) et celle avec la sonde W-4 (Ct_{sonde}) selon un ratio sonde : amorce de 5 : 1.

3.4.1.4. Conclusions et perspectives

En conclusion, les différents essais effectués n'ont pas permis de valider l'utilisation d'une sonde avec une activité bloquante significative et à une concentration minimisant les contaminations exogènes. Le manque d'efficacité pourrait être expliqué par la présence d'une densité de *Wolbachia* trop importante pour un blocage optimal. Une alternative possible aurait été de dessiner des sondes s'hybridant partiellement sur le site de fixation

des amorces ; en effet, ces sondes sont jugées plus efficaces car elles entrent directement en compétition avec les amorces lors de l'hybridation en bloquant l'élongation (Vestheim et al., 2011). Cependant, la région V5-V6 du gène *rrs* ne présentant pas de régions spécifiques du genre *Wolbachia* à proximité des amorces, il n'a pas été possible de concevoir de telles sondes.

La stratégie de l'amorce bloquante n'ayant pas montré son efficacité pour éliminer les séquences du symbiote majoritaire *Wolbachia*, il nous fallait concevoir une nouvelle stratégie pour répondre à nos objectifs d'étude. *Wolbachia* étant majoritairement retrouvée au sein des ovaires (Zouache et al., 2012), l'alternative retenue a été de cibler l'intestin moyen du moustique, connu par ailleurs pour héberger une large part du microbiote bactérien. De plus, au même moment, une nouvelle technologie de séquençage haut-débit, le Miseq (Illumina) était disponible sur le marché, offrant une taille de lecture compatible avec le fragment V5-V6 du gène *rrs* mais avec un nombre de lectures dix fois plus conséquent que celui généré par le pyroséquençage 454 (Roche).

3.4.2. Stratégie 2 : Etude du microbiote intestinal du moustique tigre par séquençage Miseq.

3.4.2.1. Contexte et objectif général de l'étude

Pour la suite des travaux, nous avons choisi de cibler notre analyse sur le microbiote intestinal d'*Ae. albopictus.* En effet, des études ont montré que la bactérie *Wolbachia* était faiblement représentée au sein de l'intestin moyen d'*Ae. albopictus* avec des densités 10 fois inférieures à celles retrouvées au sein des ovaires (Zouache et al., 2009). De plus, le tube digestif des insectes a souvent été étudié car il constitue une interface clef pour l'interaction entre l'insecte et son milieu extérieur. Cet organe abrite par ailleurs une part importante du microbiote qui va bénéficier d'un apport régulier en composés organiques (source de carbone et d'azote) via le bol alimentaire tout en étant en permanence sous l'influence des contraintes biotiques (enzymes digestives, système immunitaire) et abiotiques (flux régulier, pH basique, faible taux d'oxygène) (Clements, 1992; Dillon and Dillon, 2004; Shi et al., 2010; Engel and Moran, 2013; Pernice et al., 2014). Chez le moustique, la digestion est réalisée dans la portion médiane de l'intestin et c'est donc sur celle-ci que nous avons choisi de porter notre attention pour l'étude du microbiote d'*Ae. albopictus* (Clements, 1992). Cette région est également un lieu de réplication privilégiée pour les pathogènes transmis, ces derniers doivent traverser la membrane épithéliale de l'intestin moyen pour ensuite atteindre l'hémolymphe du moustique (Clements, 2011). De plus, il a été montré que le microbiote

intestinal du moustique jouerait un rôle fondamental dans la transmission des pathogènes avec lesquels il peut interférer de manière directe ou indirecte (Cirimotich, Ramirez, et al., 2011). Des études menées chez les moustiques *Anopheles gambiae* ont notamment démontré que la présence des bactéries intestinales du genre *Enterobacter* pouvait inhiber le développement des parasites *Plasmodium falciparum* avant même qu'ils n'interagissent avec la membrane épithéliale de l'hôte (Cirimotich et al., 2011). De telles bactéries pourraient être utilisées dans un contexte de lutte antivectorielle.

Parallèlement, la mise à disposition sur le marché d'une nouvelle approche de séquençage, la technologie Miseq, nous offrait la possibilité d'atteindre une profondeur d'analyse supérieure à celle obtenue avec le pyroséquençage 454 et donc une meilleure saturation de la diversité (~15 millions de séquences). Au début de nos travaux, peu d'études basées sur le séquençage Miseq de régions hypervariables du gène *rrs* avaient été publiées, mais toutes avaient montré l'intérêt de l'utilisation de cette nouvelle approche pour l'étude de la diversité microbienne (Caporaso et al., 2012). Pour la suite de notre étude, nous avons donc expérimenté un protocole pour l'analyse de la diversité bactérienne des intestins moyens des moustiques *Ae. albopictus*, en utilisant la technologie Miseq d'Illumina. En plus du microbiote intestinal, une analyse des carcasses (qui contient les ovaires, les glandes salivaires et d'autres tissus de l'insecte) ainsi que d'individus entiers a été réalisée et les données obtenues comparées entre elles ainsi qu'à celles précédemment obtenues via l'approche de pyroséquençage.

3.4.2.2. Matériel et méthodes

Matériel Biologique et préparation des échantillons

Les femelles *Ae. albopictus* proviennent d'une population capturée en 2010 dans la ville de Toamasina sur la côte est de l'île de Madagascar, conservées dans de l'alcool à 70% au congélateur -80°C. La diversité bactérienne des individus de cette population avait été précédemment étudiée par une technique d'empreinte moléculaire, la PCR-DGGE (Zouache et al., 2011; Minard et al., 2014). L'étude a été réalisée à partir de 10 individus sélectionnés aléatoirement. L'ensemble des manipulations a été effectué en conditions aseptiques sous hôte à flux laminaire avec du matériel et des solutions stériles. Chaque moustique a subi une stérilisation de surface à l'alcool et lavages externes comme décrit précédemment (Minard, Tran, et al., 2013). Les intestins moyens des 5 premiers individus (Mada1, 2, 3, 4, 5) ont été disséqués sous loupe binoculaire (grossissement X10) dans une solution de PBS 1X. L'intestin moyen (TD) a ensuite été étudié séparément du reste de la carcasse (C). Les 5 individus suivants (Mada6, 7, 8, 9, 10) ont été étudiés entiers. Les différents échantillons ont

été broyés dans une solution de tampon de lyse ATL (Qiagen, Allemagne) contenant 20 $mg.ml^{-1}$ de lyzozyme (Euromedex, France) en présence de billes de 1 mm (intestins moyens) ou de 5 mm (carcasses, individus entiers) de diamètre, à l'aide du broyeur Bioblock Scientific MM2000 mill (Retsch, France) à une vitesse de 100 $tours.min^{-1}$ pendant 2 x 1min. L'ADN contenu dans les broyats a été extrait avec le kit Qiagen DNeasy Blood & Tissue (Qiagen, Allemagne) en suivant les instructions du fabricant concernant les bactéries à Gram-positif et négatif. Quatre témoins négatifs ont été réalisés correspondant à des extractions sans matrice suivies d'une amplification et d'un mélange des 4 amplifiats après concentration. Les amplifications de la région hypervariable V5-V6 du gène *rrs* ont été réalisées avec 30 ng d'ADN matriciel en utilisant les amorces 784F (5'-AGGATTAGATACCCTGGTA-3') et 1061R (5'-CRRCACGAGCTGACGAC-3') contenant un index de multiplexage de 8pb ainsi que des adaptateurs et amorces de séquençage Illumina (Andersson et al., 2008). Tous les échantillons ont été amplifiés en triplicats, puis regroupés et purifiés avec un kit Agencourt AMPure XP PCR purification (Beckman Coulter, France). L'ADN ainsi purifié a été quantifié avec le kit Quant-iT Picogreen dsDNA Assay (Life Technologies, USA). Un échantillon supplémentaire a été ajouté correspondant au mélange équimolaire des 5 échantillons de carcasses (CP) amplifiés selon les conditions précédemment décrites. Un total de 16 banques d'échantillons (Tableau 4) et une banque de témoin négatif ont été séquencés selon la technologie Illumina MiSeq (2 x 250-pb, lectures paired-end) sur la plateforme ProfileXpert – ViroScan 3D (Lyon, France).

Analyse des séquences

Les séquences paired-end ont été alignées avec PandaSeq (Masella et al., 2012) puis filtrées en utilisant le logiciel Mothur v1.33.3 (Schloss et al., 2009). Les filtres utilisés ont été les suivants : deux erreurs autorisées sur la séquence des amorces, aucune base ambiguë et sélection des séquences sur la base d'une fenêtre de taille allant de 200pb à 350pb. Les séquences chimériques ont été éliminées avec le logiciel Perseus implémenté dans Mothur. Les séquences ont été regroupées à 97% de similarité sur la base de l'algorithme *median neighbor* et d'un gradient de distance allant de 92% à 99%. L'assignation des séquences a ensuite été réalisée par classification Bayesienne sur la base de données SILVA mise à jour 115 avec un seuil minimal de 80% de Bootstrap (Wang et al., 2007). Les indices de richesse, d'équitabilité et de diversités α et β ont été calculés en utilisant un sous échantillonnage du même nombre de séquences pour tous les échantillons. Les analyses de heatmap et de positionnement multidimensionnel non métrique ont été réalisées avec le logiciel R v.2.15.2 (R Development Core Team, 2009) en utilisant le package vegan (Oksanen et al., 2013).

3.4.2.3. Résultats et discussion

Richesse et diversité α

L'estimation des indices de richesse et de diversité, pour chaque échantillon, est présentée dans le Tableau 4. De manière générale, on observe que la richesse estimée est près de 10 fois supérieure à la richesse observée. Cependant, il est important de modérer ces estimations par le fait que l'indice de Chao1 utilisé ici est directement impacté par la proportion de séquences rares. Or, ces séquences rares sont très majoritaires du fait de la présence (i) de taxons rares au sein des échantillons, (ii) de taxons contaminants rares apportés par les réactifs et/ou lors de la manipulation des échantillons et (iii) d'erreurs de séquençage et/ou d'indexage aléatoires. Toutefois, les taux de contamination et d'erreurs de séquençage étant sensiblement identiques pour chaque échantillon, il a été possible de créer un sous échantillonnage aléatoire composé d'un nombre de séquences équivalent pour chaque échantillon. Ainsi, une comparaison de la diversité entre échantillons a pu être réalisée sans considérer l'impact des erreurs. Les résultats ont montré que la richesse observée des échantillons d'intestins moyens était systématiquement supérieure à celle des carcasses du même individu (Tableau 4, Figure 21). En effet, tous les intestins moyens ont présenté un indice de diversité de shannon (*H'*) plus fort que celui observé dans les carcasses. Ces fortes valeurs de diversité pourraient s'expliquer par une plus forte équitabilité au sein des échantillons d'intestin moyen, en effet, 3 des 5 échantillons de TD ont montré une abondance relative de *Wolbachia* inférieure à 20% tandis que tous les échantillons de carcasses et deux échantillons de tube digestif ont montré une abondance relative de *Wolbachia* supérieure à 40% (Figure 22). La forte abondance de *Wolbachia* au sein des carcasses pourrait s'expliquer par une localisation ciblée de la bactérie au sein des ovaires comme cela a déjà été montré (Zouache et al., 2009). Cependant, il est surprenant d'observer une forte colonisation de l'intestin moyen dans deux cas. Cela pourrait s'expliquer par une infection occasionnelle des cellules épithéliales. Cette hypothèse ouvre la voie vers une possible transmission horizontale de la bactérie. En effet, celle-ci pourrait être acquise via la nutrition, notamment chez les larves qui font preuve de coprophagie, de prédation et de cannibalisme. Même si de tels évènements n'ont jamais été détectés chez le moustique tigre, certains exemples chez d'autres arthropodes ont déjà fait état de transmission horizontale de *Wolbachia* via la nutrition (Vavre et al., 1999; Le Clec'h et al., 2013). Les carcasses ont montré des valeurs de diversité (H') plus faibles que les intestins moyens alors que les valeurs de richesse estimée (Chao1) se sont avérées équivalentes pour les deux catégories. Ces résultats sont cohérents car la faible équitabilité (J') des échantillons de carcasses a impliqué une plus forte proportion de taxons rares au sein de ces échantillons et

donc une moins bonne saturation de la richesse à quantité équivalente de séquences. Enfin, on ne peut pas exclure la présence d'erreurs de séquençage qui pourrait également être à l'origine d'une surestimation de la diversité.

Tableau 4. Indices de richesse et de diversité

Echantillons de moustiques	Type	sobs	Chao1	J'	H'
Mada1	C	601	6400	0.25	1.62
	TD	991	4950	0.53	3.65
Mada2	C	553	3953	0.21	1.34
	TD	612	3888	0.24	1.53
Mada3	C	575	4442	0.19	1.23
	TD	610	3327	0.22	1.44
Mada4	C	508	3808	0.20	1.22
	TD	959	5174	0.52	3.55
Mada5	C	1621	23694	0.36	2.64
	TD	2749	22550	0.50	3.99
Mada1,2,3,4,5	CP	655	6810	0.24	1.58
Mada6	E	512	2768	0.20	1.27
Mada7	E	543	6797	0.17	1.07
Mada8	E	461	3913	0.19	1.18
Mada9	E	497	5720	0.15	0.93
Mada10	E	462	3794	0.19	1.16

Les indices de richesse observée (sobs) ou estimée (Chao1) ainsi que les indices d'équitabilité de Pielou (J') et de diversité de Shannon (H') ont été rapportés. Différents échantillons ont été analysés : carcasses individuelles (C) ou regroupées après PCR (CP), intestins moyens (TD), individus entiers (E).

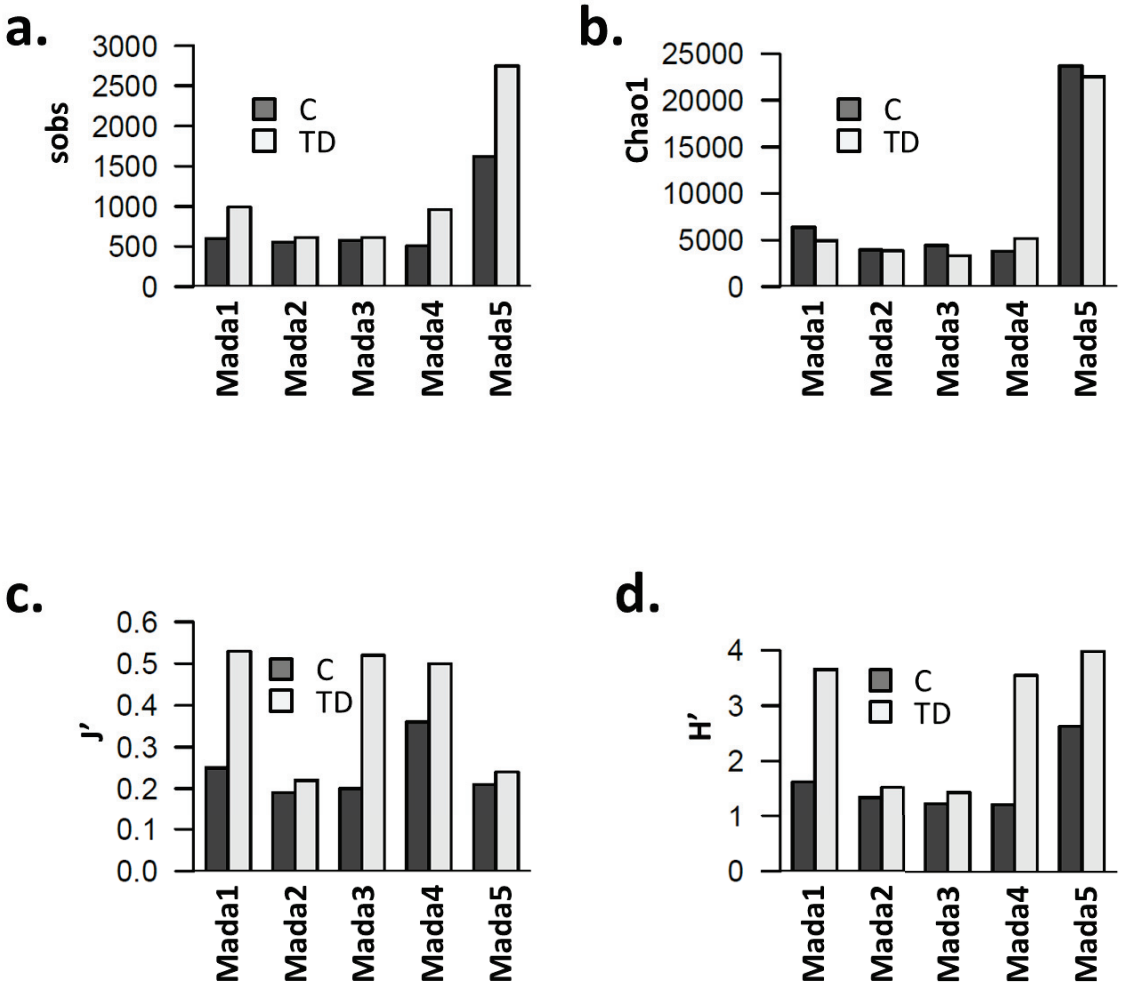


Figure 21. Analyse comparative des indices de richesse et de diversité entre les carcasses et les intestins moyens. (a) : indice de richesse observée (sobs), (b) : indice de richesse estimée (Chao1), (c) : équitabilité (J') et (d) : indice de diversité α estimée avec l'indice de shannon. Les indices ont été calculés avec le logiciel Mothur v1.33.3 sur la base d'un sous échantillonnage de 13 367 séquences par échantillon. Les carcasses et les intestins moyens de 5 échantillons ont été étudiés (Mada1, 2, 3, 4 et 5).

L'intestin moyen : un microhabitat diversifié.

Les échantillons ont été regroupés par groupe de similarité sur la base de l'indice de diversité de Bray-Curtis. Cet indice mesure le pourcentage de dissimilarité entre échantillons selon les différents taxons retrouvés et leur abondance relative. Les résultats obtenus ont montré que les échantillons de carcasses regroupés (CP) ou non (C) et ceux d'individus entiers (E) présentaient une forte similarité entre eux (Figure 23). Comme précédemment observé lors de l'analyse par pyroséquençage, ces échantillons sont très largement dominés par la bactérie *Wolbachia* (Minard et al., 2014). Conformément à cela, les analyses de positionnement multidimensionnel ont mis en évidence une similitude de structure des diversités bactériennes entre moustiques entiers et carcasses (regroupées ou non) (Figure 23). En revanche, comme le laissait présager leurs fortes valeurs de richesse et d'équitabilité, les intestins moyens ont présenté des profils plus hétérogènes, caractérisées par une proportion importante d'UTOs et une abondance relative de *Wolbachia* très variable, allant de 0,006 (Mada1 TD) à plus de 0,93 (Mada3 TD et Mada2 TD) (Figure 22). Deux d'entre eux (Mada1 et 5) ont également montré plus de 10% de leurs séquences affiliées à *Asaia* avec une plus faible abondance relative de *Wolbachia* comparé aux autres échantillons de carcasses. De façon intéressante, des études menées chez les moustiques *Anopheles gambiae* et *Anopheles stephensi* ont montré que la bactérie *Asaia* pouvait fortement impacter la transmission verticale de *Wolbachia* lorsque les moustiques étaient trans-infectés par la bactérie (Hughes, 2014). Les auteurs avaient alors conclu que l'élimination d'*Asaia* était un pré-requis obligatoire à l'implantation durable de *Wolbachia* dans des lignées de moustiques. Ces observations pourraient expliquer en partie l'abondance plus faible de *Wolbachia* observée dans les échantillons de moustiques *Ae. albopictus* infectés par *Asaia* ainsi que sa prévalence modérée chez le moustique tigre (Minard, Tran, et al., 2013). Par ailleurs, les genres bactériens *Dysgonomonas* et *Streptococcus* ont été identifiés uniquement dans les échantillons d'intestins moyens. L'approche de pyroséquençage précedemment utilisée avait déjà mis en évidence la présence de ces deux genres bactériens dans les individus entiers (Minard et al., 2014). Les bactéries du genre *Streptococcus* sont ubiquistes appartenant au Phylum des Firmicutes. Ce genre regroupe de nombreuses espèces dont certaines sont retrouvées à la surface de l'épiderme des mammifères (Hochedez et al., 2009; Richards et al., 2013). L'hypothèse d'une acquisition de la bactérie par contact avec la peau a d'ailleurs été proposée dans le cas des tiques *Ripicephalus microplus* et de la mouche domestique *Musca domestica* (Nazni et al., 2005; Andreotti et al., 2011). La bactérie *Dysgonomonas,* quant à elle, a souvent été reportée au sein des intestins moyens de différentes espèces animales dont les termites (*Coptotermes formosanus*, *Macrotemes barneyi*) (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2014), la

mouche verte (*Lucilia sericata*) (Wei et al., 2014), la mouche des fruits (*Drosphila melanogaster*) (Chandler et al., 2011), le charançon rouge des palmiers (*Rynchophorus ferrugineus*) (Tagliavia et al., 2014) et le bar (*Dicentrachus labrax*) (Carda-Diéguez et al., 2014). Elle a également été identifiée chez les moustiques *Anopheles stephensi* et *Culex tarsalis* (Rani et al., 2009; Duguma et al., 2013). Appartenant au phylum des Bacteroidetes, ce genre renferme des espèces aéro-anaérobies facultatives. Leur présence dans les intestins moyens d'insectes pourrait notamment s'expliquer par les conditions proches de l'anoxie qui y règnent (Johnson and V Barbehenn R, 2000; Chouaia et al., 2014). Husseneder et collaborateurs (Husseneder et al., 2009) ont par ailleurs proposé que cette bactérie contribuerait à l'approvisionnement en vitamine B_{12} chez les termites. Ces observations argumentent l'hypothèse d'un rôle de *Dysgonomonas* dans la biologie d'*Ae. albopictus*. Cependant, certaines espèces de *Dysgonomonas* ont également été identifiées comme pathogènes opportunistes de l'homme (Hironaga et al., 2008; Lawson et al., 2010). Le moustique tigre pourrait alors jouer un rôle dans la transmission de ces bactéries à l'homme.

Nos résultats ont également suggéré un taux plus important de contaminations exogènes au sein des échantillons d'intestins moyens par rapport ceux des carcasses ou d'individus entiers. En effet, parmi 16 phylotypes dominants, 6 étaient à la fois présents dans les intestins moyens et le témoin négatif (Figure 22). Ces résultats pourraient s'expliquer par la quantité d'ADN génomique plus faible extrait des intestins moyens, toute légère contamination extérieure sera *a fortiori* plus apparente lors des amplifications. Par ailleurs, l'intestin moyen étant un organe ouvert sur le milieu extérieur via la nutrition, il est envisageable qu'il soit colonisé par des taxons bactériens présents dans le témoin négatif.

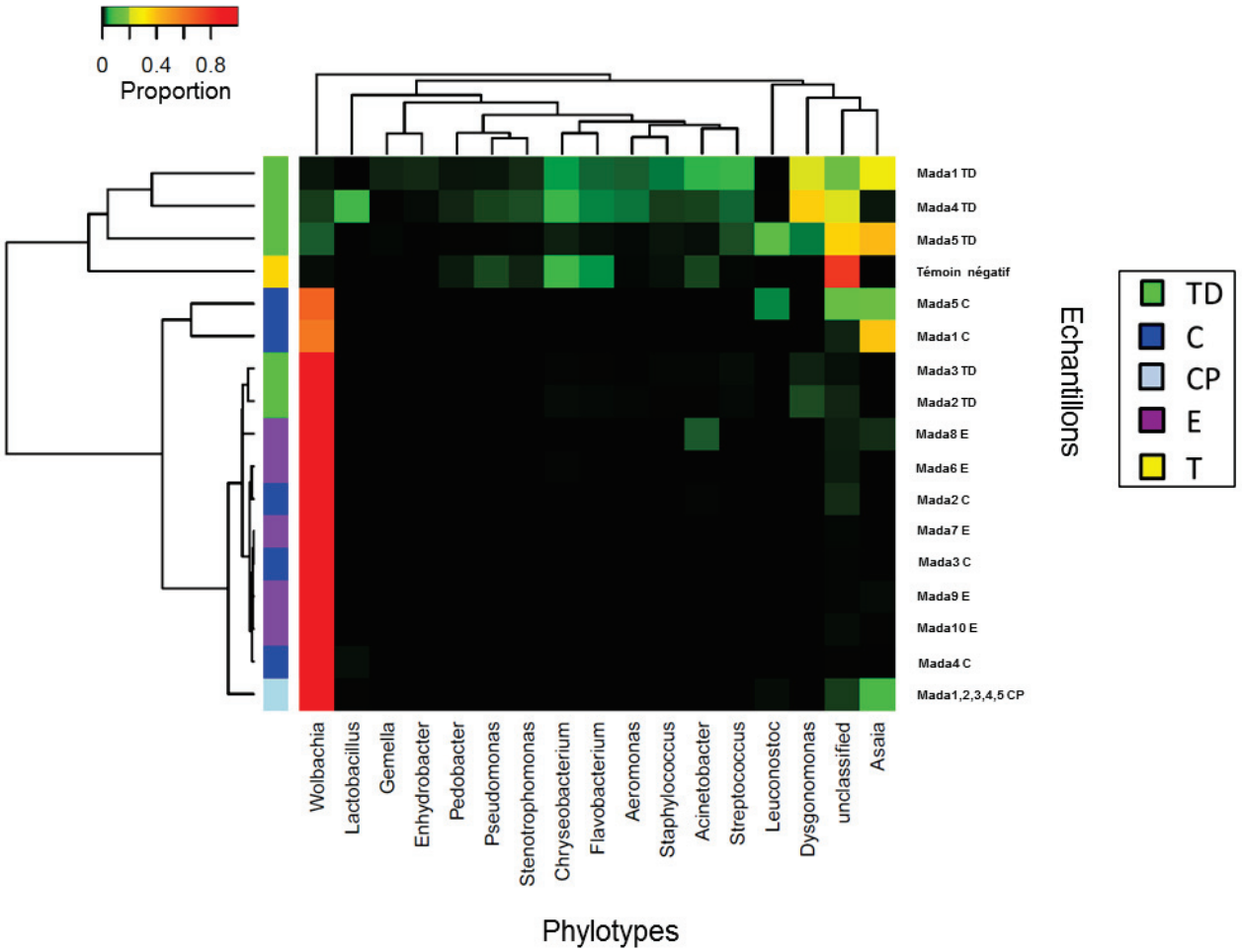


Figure 22. Abondance relative des différents phylotypes bactériens. Les colonnes représentent les différents phylotypes bactériens. Les lignes représentent les différents échantillons : les intestins moyens individuels (TD), les carcasses individuelles (C), les carcasses poolées (CP), les individus entiers (E) et le témoin négatif (T). L'intersection lignes/colonnes correspond à la proportion relative des différents phylotypes bactériens au sein des échantillons. Sa valeur correspond à l'échelle de couleur. Seuls les phylotypes retrouvés à une abondance d'au moins 0,01 dans l'un des échantillons ont été représentés.

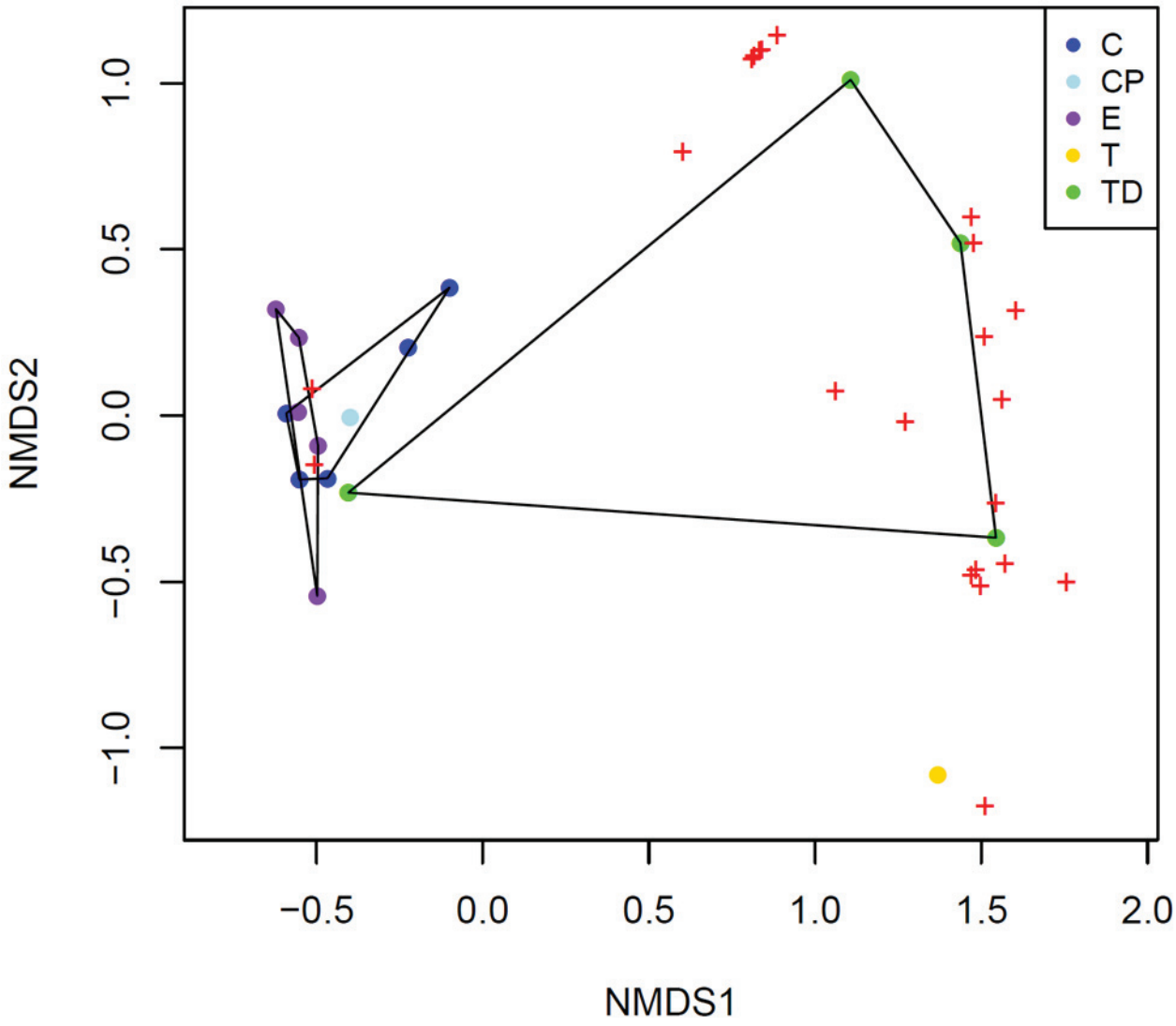


Figure 23. Positionnement multidimensionnel non-métrique (NMDS) des échantillons. Le positionnement des échantillons a été réalisé en deux dimensions selon une corrélation R^2 de 0,98 avec les valeurs réelles et une fonction de perte stress égale à 0,06. Les différentes UTOs sont représentées par des croix rouge. Les échantillons sont représentés par des points de couleurs, selon le code suivant : intestins moyens (TD), carcasses individuelles (C), carcasses poolées (CP), individus entiers (E) et témoin négatif (T).

3.4.2.4. Conclusion

Les analyses comparatives ont permis de mettre en évidence une structuration différente de la diversité bactérienne en fonction des échantillons. Alors que l'analyse du microbiote des individus entiers ou des carcasses confirme la dominance de *Wolbachia,* comme précédemment révélée lors de l'étude pilote (Minard et al., 2014), l'analyse du microbiote intestinal s'est révélée une alternative intéressante, permettant d'accéder à une diversité bactérienne plus importante. En effet, l'effort de séquençage obtenu avec la technologie MiSeq a permis la découverte d'une plus grande richesse (~10 fois plus importante) que celle obtenue par le pyroséquençage 454. Pour la suite de nos travaux, la validation de ce protocole nous a permis d'étendre notre étude à l'analyse comparative du microbiote intestinal de différentes populations de moustiques tigre afin de proposer de nouvelles hypothèses sur le fonctionnement de l'holobionte à moustique.

4. Métataxogénomique bactérienne et génétique des populations autochtones et invasives du moustique tigre *Aedes albopictus*

4.1. Contexte et objectif général de l'étude

Le moustique tigre est actuellement considéré comme l'une des espèces les plus invasives au monde (Global Invasive Species Database). Originaire d'Asie du Sud et de l'Est, il a déjà colonisé 5 des 6 continents et a très largement étendu son aire de répartition au cours de ces 150 dernières années (Bonizzoni et al., 2013). Bien qu'il soit avéré que son introduction et son expansion au sein de nouveaux territoires sont principalement dûes aux activités humaines (voir Synthèse Bibliographique chapitre 1.3), sa forte plasticité écologique a également largement participé à son acclimatation et son adaptation à des régions éco-climatiques variées. Cette plasticité reste toutefois multifactorielle et complexe du fait des nombreuses interactions Génotype x Environnement qui la régissent. De façon intéressante, le microbiote pourrait aussi avoir un rôle à jouer. En effet, de nombreux exemples dans la littérature font état de l'implication de microorganismes symbiotiques dans les interactions d'organismes eucaryotes supérieurs avec leur environnement (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2014). On peut ainsi citer l'exemple des bactéries symbiotiques *Hamiltonella defensa* et *Serratia symbiotica* qui participeraient à la résistance des pucerons aux chocs thermiques (Montllor et al., 2002), ou encore de la bactérie *Burkholderia* conférant aux punaises une résistance aux insecticides (Kikuchi et al., 2012). Ces observations argumentent ainsi la théorie de l'hologénome (Chapitre 2.1). Si la plupart des travaux se sont

focalisés sur le microbiote des insectes phytophages, de nombreuses lacunes persistent sur la connaissance du microbiote des insectes hématophages et en particulier les moustiques (Ricci et al., 2012; Minard, Mavingui, et al., 2013).

Dans ce contexte, nous nous sommes attachés à décrire la diversité bactérienne de différentes populations d'*Ae. albopictus* en utilisant le protocole précédement validé (Chapitre 2.2.2.). Des populations d'Asie du Sud-Est (Vietnam), aire d'origine du moustique, ont été comparées aux populations invasives récentes d'Europe (France). Ces données ont par la suite été corrélées à la structuration génétique des moustiques.

Plus précisément, les questionnements auxquels nous souhaitions répondre étaient les suivants :

(i) La diversité bactérienne diffère-t'elle entre des populations d'*Ae. albopictus* d'introduction récente et celles de l'aire d'origine ? Existe-t-il un core bactérien commun à toutes les populations ? Existe-t-il des groupes bactériens spécifiques ?

(ii) Quelle est la structuration génétique des populations d'*Ae. albopictus* au sein des zones étudiées ? Est-elle corrélée au microbiote bactérien de ces populations ?

4.2. Choix des sites d'échantillonnage des populations de moustiques

Les critères de sélection des sites de capture et du plan d'échantillonnage sont des éléments importants pour guider la suite des analyses et tester nos hypothèses biologiques. Nous avons ainsi sélectionné les 7 sites (3 en France et 4 au Vietnam) selon les critères suivants. Les sites des 7 populations étaient espacés d'une distance minimale de 18 km de manière à limiter les possibilités de capture d'individus issus d'un même gîte larvaire. Les captures ont été réalisées sur une même période d'Août à Septembre 2012. Les individus d'un même site ont été échantillonnés dans un intervalle maximal d'une semaine de manière à éviter l'utilisation de générations successives dans une même analyse. Les sites étudiés en France ont été choisis en collaboration avec les Ententes Interdépartementales de démoustication (EID Rhône Alpes et EID Méditerranée). Les sites de Nice, Portes-lès-Valence et Saint Priest (Figure 23) ont ainsi été sélectionnés sur la base de l'historique d'implantation des populations : respectivement en 2005, 2011 et 2012. De plus, aucun traitement insecticide n'avait été utilisé dans l'année en cours et les populations étaient assez denses pour capturer un nombre suffisant d'individus (>50) au cours de chaque série d'échantillonnage. Les sites étudiés au Vietnam ont été sélectionnés selon les recommendations des entomologistes de l'Institut Pasteur d'Hồ Chí Minh ville. Il s'agit des sites de Hồ Chí Minh ville, Bình Dương, Vũng Tàu ville, and Bù Gia Mập (Figure 24). En plus

des critères précédents, le choix de ces sites avait été motivé par le fait qu'ils abritaient une densité relativement faible de moustiques *Ae. aegypti* pouvant représenter une source d'erreur lors de l'identification morphologique des individus. Les coordonnées GPS des sites ont été enregistrées selon le système géodésique WGS84. Tous les sites (en France et au Vietnam) se trouvaient dans des zones périurbaines à l'exception du site de Bù Gia Mập qui est localisé dans un parc national protégé et donc faiblement anthropisé. Les moustiques ont été capturés à l'aide de pièges BG-sentinelles et de filets.

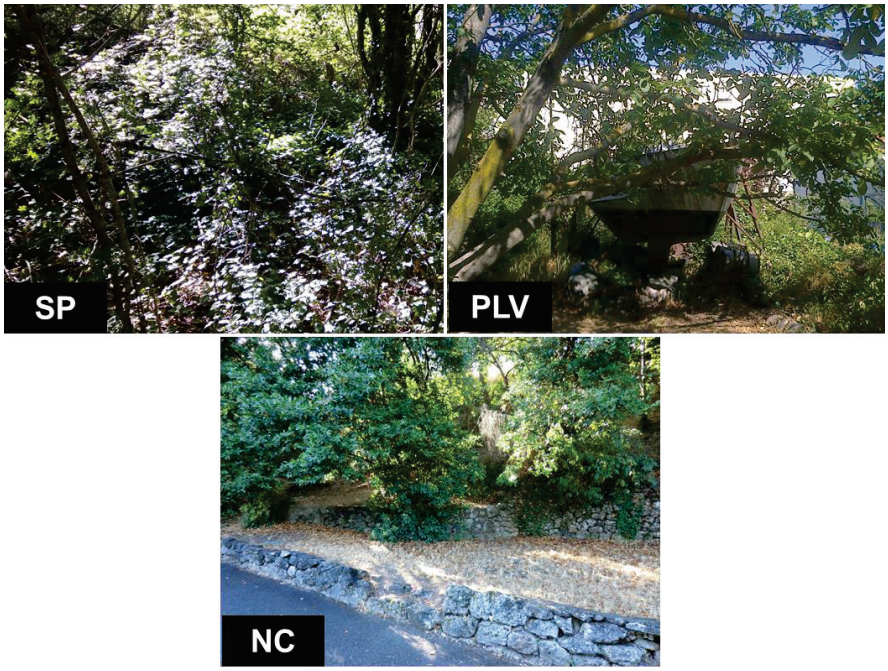


Figure 23. Sites d'échantillonnage en France. Les photographies représentent les sites d'échantillonnages de Saint Priest (SP), Portes-lès-Valence (PLV) et Nice (NC).

Figure 24. Sites d'échantillonnage au Vietnam. Les photographies représentent les sites d'échantillonnages de Vũng Tàu ville (VT), Bình Dương (BD), Hồ Chí Minh ville (HCM), Bù Gia Mập (BGM).

Figure 25. Méthodes de capture des moustiques adultes. (a) Piège BG-sentinel alimenté par batterie, (b) filets.

4.3. Publication n°4 «Invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity»

Ces travaux ont été soumis à comité de lecture dans la revue ***Environmental Microbiology*** – soumission n° EMI-2014-1296

environmental microbiology
environmental microbiology reports

Invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to autochthonous relatives

Journal:	*Environmental Microbiology and Environmental Microbiology Reports*
Manuscript ID:	EMI-2014-1296
Manuscript Type:	EMI - Research article
Journal:	Environmental Microbiology
Date Submitted by the Author:	26-Sep-2014
Complete List of Authors:	Minard, Guillaume; University Claude Bernard Lyon 1, Microbial Ecology Tran, Florence; University Claude Bernard Lyon 1, Microbial Ecology Tran Van, Van; University Claude Bernard Lyon 1, Microbial Ecology Goubert, Clement; University Claude Bernard Lyon 1, Laboratory of Biometry and Evolutionnary Biology Bellet, Christophe; Entente Interdépartementale Rhône Alpes pour la Démoustication, Lambert, Gregory; Entente Interdépartementale pour la Démoustication du littoral Méditerranéen, Ly, Khanh; Pasteur Institute, Medical Entomology and Zoonotics HUYNH, TRANG; Pasteur Institute, Medical Entomology and Zoonotics Mavingui, Patrick; University Claude Bernard Lyon 1, Microbial Ecology Valiente Moro, Claire; University Claude Bernard Lyon 1, Microbial Ecology
Keywords:	bacteria, metagenomics/community genomics, symbionts, microbial ecology, microbe:higher organism interactions

SCHOLARONE™
Manuscripts

Invasive Asian tiger mosquito populations harbor reduced bacterial microbiota and genetic diversity compared to autochthonous relatives

Guillaume Minard[1], Florence H Tran[1], Van Tran Van[1], Clément Goubert[2], Christophe Bellet[3], Gregory Lambert[4], Khanh H.K. Ly[5], Trang T.T. Huynh[5], Patrick Mavingui[1], Claire Valiente Moro[1]

Affiliations

[1]Ecologie Microbienne, UMR CNRS 5557, USC INRA 1364, VetAgro Sup, FR41 BioEnvironment and Health, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

[2]Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive, UMR CNRS 5558, Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

[3]Entente Interdépartementale Rhône-Alpes pour la Démoustication, Chindrieux, France

[4]Entente Interdépartementale de Démoustication du littoral méditerranéen, Montpellier, France

[5]Pasteur Institute, Ho Chi Minh City, Vietnam

Correspondence

C. Valiente Moro, « Microbial Dynamics and Viral Transmission » group, Microbial Ecology, University Claude Bernard Lyon 1, André Lwoff Building, 10th street Raphaël Dubois, 69100 Villeurbanne Cedex, France. Tel : +33 472 433 565, Fax : +33 472 431 223, E-mail : claire.valiente-moro@univ-lyon1.fr

Running title: Biogeography and microbiota of *Aedes albopictus*

For Peer Review Only

Summary

The Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* is one of the most preoccupying pathogen vectors of the 21st century. Originating from Asia, it has invaded a wide range of eco-climatic regions worldwide. The insect-associated microbiota is now recognized to play a significant role in host biology. Assuming this holobiont theory also applies to mosquitoes, we hypothesized that bacterial microbiota could be partially driving *Ae. albopictus* adaptation and subsequent invasiveness. We investigated this in four autochthonous *Ae. albopictus* populations in Vietnam and in three populations recently introduced to Metropolitan France. Genetic and bacterial diversity was compared between each population of field-caught mosquitoes. Bacterial microbiotas from the whole bodies of individual insects were largely dominated by *Wolbachia pipientis* and the proportions of *w*AlbA and *w*AlbB clades were conserved between sites. However, analysis of gut microbiota revealed a greater bacterial diversity in which *Dysgonomonas* was the most prevalent genus. Moreover, the bacterial and host genetic diversities found in the invasive populations were less than in autochthonous populations. These results from an integrated ecological genomics approach show that the bacterial component of the tiger mosquito hologenome shrank when populations invaded new territories, and implicate the bacterial microbiota in aspects of invasive population genetics and ecology.

For Peer Review Only

Introduction

Mosquitoes are considered by the World Health Organization to be the most medically important disease vectors. The Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) is of major concern as it is competent for 26 arboviruses including Dengue and Chikungunya (Paupy *et al.,* 2009). Furthermore, *Ae. albopictus* is considered as one of the most invasive species geographically. It has rapidly spread from its native area of South and East Asia to reach various eco-climatic regions in America, Africa, Oceania and Europe (Bonizzoni *et al.,* 2013). The worldwide trades in secondhand tires and lucky bamboo both of which often contain standing water making them ideal places for mosquito eggs and larvae, have been key factors in *Ae. albopictus* transportation. Once established in a new region, the tiger mosquito easily adapts and persists in a wide range of habitats, even in temperate climates mainly due to its aptitude to enter into a state of dormancy or "diapause" (Urbanski *et al.,* 2010). Undoubtedly, the intrinsic capacities of the mosquito populations largely play an important role in their ecological plasticity. According to the “paradox of invasion”, recent introductions often imply a burden for the genetic structure of newly introduced populations (reviewed by Handley *et al.,* 2011).

To gain a comprehensive understanding of insect population genetics now requires an integrative approach considering microorganisms as a keystone component of the system. According to the hologenome theory, Metazoan organisms should no longer be considered as individuals, but rather as holobionts consisting of the host plus all of its associated microorganisms (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008). It is the holobiont and its associated hologenome that can be considered as a unit of selection which is impacted by variation, selection, drift and evolution (reviewed by (Rosenberg and Zilber-Rosenberg, 2014). Insect holobionts are also difficult to decipher as they may include a range of host-symbiont relationships ranging from parasitism to mutualism (Toft and Andersson, 2010). Numerous studies have demonstrated the contribution of the microbiota to the biology of the host (Blottière

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

et al., 2013; Douglas, 2014). Some mutualistic symbionts favor ecological adaptations in phytophagous insects (Douglas, 2011, 2014) by playing key roles in extended phenotypes such as growth, nutrition, reproduction, protection against pathogens and tolerance to environmental stresses (Buchner, 1965; Dillon and Dillon, 2004; Moran *et al.,* 2008; Moya *et al.,* 2008). Moreover, the host genotype may also influence symbiont communities (Ochman *et al.,* 2010; Muegge *et al.,* 2011). It is thus important to consider the genetic basis of bacterial microbiota selection.

It is striking that relatively few studies have focused on bacterial microbiota associated with mosquitoes or other invasive arthropods. Many invasive species harbor genetic modifications caused by founder effects or genetic drift, but the effect of such changes on their microbiotas are only just beginning to be documented (Meusnier *et al.,* 2001; Zurel *et al.,* 2011; Ye *et al.,* 2014). As symbiotic microorganisms can change more rapidly and by more diverse processes than the host organism itself they could influence the adaptation and evolution of the holobiont.

We hypothesized that bacterial microbiota could modulate the ability of the highly invasive species *Ae. albopictus* to respond to factors in the new environment and favor its adaptation to a new niche. We aimed to document how recent introductions of the Asian tiger mosquito have affected the host genotype and its associated bacterial microbiota. To achieve this, we sampled tiger mosquitoes from autochthonous field populations in Vietnam and from recently introduced populations in France. Mitochondrial and nuclear genotypes of mosquitoes and bacterial diversity were compared within and between populations.

Results

Wolbachia w*AlbA and* w*AlbB strains are abundant and positively correlated with each other*

Our aim was to study the bacterial microbiota in autochthonous and invasive tiger mosquito populations. In a pilot study we demonstrated that *Wolbachia* is the predominant bacterial species in *Ae. albopictus* when using whole body genomic DNA (Minard *et al.,* 2014). Here we

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

first tested whether the two *Wolbachia* strains *w*AlbA and *w*AlbB were present in mosquitoes sampled from autochthonous populations at four sites (HCM, BD, VT, BGM) in Vietnam and from invasive populations at three sites (SP, PLV, NC) in France (Fig. 1). NC is one of the first sustainably invaded sites in France since 2004 (Medlock *et al.,* 2012), whereas PLV and SP were colonized in 2011 and 2012, respectively (data obtained from French health organization INVS). *w*AlbA and *w*AlbB were detected in all seven populations. The lowest densities of *w*AlbA and *w*AlbB strains detected were 5.25×10^{-5} wsp.actin^{-1} and 3.09×10^{-3} wsp.actin^{-1} copies respectively in mosquito samples from BD and the highest densities of 2.44 wsp.actin^{-1} and 8.53 wsp.actin^{-1} copies respectively from the BGM population (Fig. 2). A significant positive correlation (Spearman's rank order correlation $\rho = 0.82$, *P-value* $< 2.2 \times 10^{-16}$) between *w*AlbA and *w*AlbB strains was found among all the populations tested (Fig. 2). Moreover, the V5-V6 *rrs* MiSeq sequencing of mosquito carcass pools revealed a dominance of the *Wolbachia* phylotype, which counted for 24% (for HCMC) to 79% (for SPC) of the sequence dataset (Fig. 3A).

Midgut bacterial community structure in autochthonous and invasive populations

To investigate which other bacterial taxa were present in the *Ae. albopictus* microbiota, V5-V6 *rrs* amplicons from individual midgut samples (from 3 to 5 individuals per sampling site) were sequenced with MiSeq technology. A total of 4 400 152 sequences were obtained after trimming. The sequence diversity of the most abundant phylotypes (>1%) within each sample was clustered with the Bray-Curtis dissimilarity index (Fig. 3A). To ensure that this index was not biased by the phylotype approach used, a second parallel analysis was made with OTUs which gave similar results (Fig. S1). Bacterial sequences were detected in the negative control that probably derived from contamination during laboratory sample handling. The diversity of this control was highly dissimilar from those of all mosquito samples (Bray-Curtis dissimilarity > 68.6%), except for sample NC11 (Bray-Curtis dissimilarity = 17.9%) (Fig. 3A). NC11 was not analyzed further. The phylotypes assigned as *Flavobacterium, Chryseobacterium* and

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

unclassified Gammaproteobacteria were relatively highly abundant in the negative control (respectively 3%, 6% and 72% of the reads) compared to the mosquito samples, so these phylotypes were considered as laboratory contaminants when found in other samples.

Based on similarity analysis of the whole dataset, eight diversity groups were identified (Fig. 3A). The populations from France included the three diversity groups B, D and G with group B dominating (Fig. 3C). Conversely, the populations from Vietnam consisted of 5 diversity groups with major groups A, B and C (Fig. 3C). AMOVA analysis was performed to detect levels of structure that variation between countries was significant for the three β-diversity measures explaining a large part of the variation for Unifrac weighted (AMOVA, 17%, *P-value* = 0.03) and Bray-Curtis dissimilarities (AMOVA, 18.2%, *P-value*=0.03) (Table 1). However, none of these methods revealed any significant variation at the site level.

The genus *Dysgonomonas* was the most frequent phylotype retrieved from the midgut samples, although its abundance varied between diversity groups (Fig. 3A). Surprisingly, in comparison to the populations from Vietnam, populations from France harbored less diverse and more homogeneous bacterial microbiotas as values for the Chao 1 richness estimator (Mann-Whitney Wilcoxon, *P-value* = 0.003), Shannon-Weather α-diversity (Mann-Whitney Wilcoxon, *P-value* = 0.0002) (Fig. 3B), and variance of abundance-weighted β-diversity were all lower (Fig. 3B and Fig. S2). However, weighted Unifrac (Beta-dispersion, *P-value* = 0.33) and Bray-Curtis (Beta-dispersion, *P-value* = 0.33) distances were not significantly different between populations from the two countries.

Bacterial co-occurrence in Ae. albopictus populations from *France and Vietnam*

Co-occurrence and co-exclusion analyses were performed to highlight positive or negative correlation networks among OTUs. The checkerboard score analysis revealed a significant non-random pattern of OTUs (C-score = 8.99, *P-value* = 0.01). No co-exclusion was found. However,

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

co-occurrence was highlighted between OTUs in two main networks (Fig. 4A). Network 1 harbored genera belonging to the class Gammaproteobacteria and the phylum Bacteroidetes. It also included the dominant phylotypes retrieved from the negative control. Therefore, this co-occurrence Network 1 was considered as being mostly associated with bacterial contaminants from the laboratory. Network 2 contained genera belonging to the Classes Alpha- and Beta-proteobacteria. A total of 7 and 17 OTUs were shown to be significantly associated (Welch, $P > 0.05$) with the populations from French and Vietnamese sites, respectively (Fig. 4B). Among the 7 OTUs significantly associated with the populations from France, Otu1, Otu2, Otu4, Otu6, Otu19, Otu25, Otu37 also belonged to Network 1 (Fig. 4A, 4B). Network 2 harbored 15 of the 17 OTUs significantly associated with populations from Vietnam including *Shingomonadaceae* OTUs assigned to *Sphingomonas*, *Sphingobium* and *Novosphingobium* genera (Fig. 4A and 4B). As illustrated by a Venn diagram (Fig. 4C), many more OTUs were specific to populations from either France (546 OTUs) or Vietnam (669 OTUs) than were shared (388 OTUs).

Low mitochondrial DNA variation among Ae. albopictus *populations from France and Vietnam*

The genetic makeup of *Ae. albopictus* hosts was evaluated by barcoding based on mitochondrial *COI* gene sequences. A total of 6 haplotype variants were found in individuals from all populations. The result of Tajima's D test was such that the neutrality hypothesis should not be rejected (Tajima's D Test, $P = 0.87 \pm 0.1$), in other words, no selection of a particular *COI* marker was apparent in any population. The overall nucleotide diversity (π) was 0.001 and the average haplotype diversity (Hd) was 0.34. The estimated richness after rarefaction was between 1 (for SP and NC populations) and 2.67 (for the PLV population). The genetic heterogeneity was more pronounced between countries (AMOVA 47.4%, *P-value* $<10^{-3}$) than between sites (AMOVA 19.79%, *P-value* $<10^{-3}$) (Table 1). The minimum spanning network was composed of two major subclades distinguishable by only one mutation. One subclade included

For Peer Review Only

52 haplotypes (H_1) and the other 28 haplotypes (H_3) (Fig. 5A). H_1 was mostly associated with the populations from Vietnam whereas H_3 was more associated with those from France. However, a mix of both haplotypes was also found in the populations at the PLV site in France (12/20 for H_1 and 7/20 for H_3) and at the BGM site in Vietnam (16/17 for H_1 and 1/17 for H_3) (Fig. 5C). Because of this strong admixture, PLV had the highest Hd of 0.542 (Table S1).

Evidence for genetic reduction in Ae. albopictus *populations invasive to France*

The mosquito nuclear genomic variation was characterized further by genotyping 199 individuals with 11 microsatellite markers. The overall number of alleles per locus varied from 6 (AealbB52) to 30 (Alb-tri 18). Rarefied allele richness of populations from each site was 4.56 for SP, 4.57 for PLV, 5.91 for NC, 6.50 for HCM, 7.47 for VT, 8.25 for BGM, and 8.62 for BD. To test for hypothetical population bottlenecks or expansions, the allelic richness (*Ar*) and the heterozygosity (He) at each genomic locus were analyzed for each sampling site. For both these analyses of variation, values for populations from France were significantly lower than those from Vietnam (Mann-Whitney, *P-value* = 0.0003 and *P-value* = 0.0003 respectively). The bottleneck analysis did not show any significant heterozygosity excess under a two-phase model or a single stepwise model (Table S2). No significant linkage disequilibrium was found between any pair of loci. All populations had a positive inbreeding index (F_{IS}) between 0.12 (for PLV) and 0.196 (for HCM) reflecting an excess of homozygotes (Table 2). Moreover, there were significant scores for the presence of null alleles. However, F_{ST} values of the entire mosquito sample were 0.142 ($CI_{95\%}$ 0.058-0.269) with ENA correction for null alleles and 0.145 ($CI_{95\%}$ 0.061-0.270) without correction. Consequently, the presence of null alleles did not strongly impact the estimation of differentiation. The structure of the populations was evaluated with the Bayesian method of assignment. The optimal number of clusters selected with the second-order change in likelihood method was *K* = 2 (Fig. S3) (Evanno et al., 2005). Populations were clustered in two

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

different genetic groups according to country of origin, except for populations from PLV in France and BD in Vietnam, which harbored a mixture of both genotypes (Fig. 5B and 5D). AMOVA analysis revealed a non-significant variation in the structure among countries (AMOVA 2.6%, *P-value* = 0.2) but a moderate variation among sites within a country (AMOVA 13%, *P-value* < 10^{-3}) (Table 1).

Positive correlation between bacterial and genetic diversities of Ae. albopictus *populations*

The populations sampled were compared to assess whether there was any relationship between the bacterial diversity and the genetic diversity of the mosquitoes. Comparative analysis showed a low correlation between bacterial β-diversity (Bray-Curtis dissimilarity distance) and haplotype structure (Mantel, R^2 = 0.48, *P-value* = 0.02) and no significant correlation with the Cavalli-Sforza Edwards measure of microsatellite genetic distance (Mantel, R^2 = 0.29, *P-value* = 0.11). However, for all sampling sites, positive correlations were observed between mean bacterial α-diversity (*H'*) and respectively host *Ar* (Spearman's rank correlation, ρ = 0.95, P-value < 10^{-3}) (Fig. 6A) and host genetic diversity (*Hs*) (Spearman's rank correlation, ρ = 0.74, P-value = 0.04) (Fig. 6B). Moreover, based on the *Ar, Hs* and *H'* values, bacterial and host genetic diversities of the invasive populations in France were lower than in autochthonous populations from Vietnam (Fig. 6A, 6B).

Discussion

Mosquitoes are now regarded as holobiont units in which the host and its microbiota may display symbiotic relationships and multitrophic interactions (Minard et al., 2013). As demonstrated in other insect models such as drosophila and aphids (Engel and Moran, 2013; Lizé *et al.,* 2014), it is envisaged that mosquito-associated bacterial microbiota could influence the ability of the host

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

to respond to biotic and abiotic factors. However, to date, very few studies have explored whether bacterial microbiota contribute to the fitness of mosquito holobionts and if so how. An essential step forward is to increase our knowledge on the mosquito-associated microbiota. Here, we used a next generation sequencing method and meta-taxogenomics to characterize the composition of bacterial microbiota of invasive and autochthonous populations of *Ae. albopictus* and to test for correlations with host genotype.

Wolbachia is the most studied bacterium of mosquitoes. Although some beneficial fitness effects of this symbiont have been demonstrated in *Ae. albopictus* (Dobson et al., 2002), *Wolbachia* most commonly alters mosquito reproduction by inducing cytoplasmic incompatibility between infected males and uninfected females (Stouthamer *et al.,* 1999). Superinfection with more than one *Wolbachia* strain makes the system more complex and some models predict that superinfected females have a selective advantage as they should be able to reproduce with every combination of uninfected and strain-infected males (Dobson *et al.,* 2004; Tortosa *et al.,* 2010). Diagnostic PCR on field-caught *Ae. albopictus* from various countries confirmed this prediction as more than 99% of individuals were superinfected with *Wolbachia* *w*AlbA and *w*AlbB strains (Kittayapong *et al.,* 2002; de Albuquerque *et al.,* 2011; Zouache *et al.,* 2011). Here we showed a 100% prevalence of such double infection in seven *Ae. albopictus* populations from France and Vietnam. Other than cytoplasmic incompability and the age of the mosquito (Tortosa *et al.,* 2010), factors driving *Wolbachia* persistence in *Ae. albopictus* remain largely unknown. Our results demonstrate a strong correlation between the proportions of the two strains *w*AlbA and *w*AlbB in *Ae. albopictus* populations, suggesting a fine mechanism is regulating such co-occurrence. *Wolbachia* has also been demonstrated to induce selective “sweep” on mitochondria, which drastically reduces the genomic variability of this organelle in *Ae. albopictus* ((Hurst and Jiggins, 2005). As expected then, the mitochondrial haplotyping of all seven populations showed very low nucleotide diversity in the *COI* gene (haplotypes differed by only one substitution) and low richness (less than 3 haplotypes per sampling site after rarefaction).

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

Therefore, mitochondrial markers are highly sensitive to admixture in comparison with nuclear markers such as microsatellites. For this reason, it is not suitable to rely on haplotypes when estimating intraspecific genetic diversity in *Ae. albopictus*.

As bacterial microbiota analysis from entire *Ae. albopictus* genomic DNA is systematically overrun by *Wolbachia* sequences (Minard *et al.,* 2014), to investigate other genera we used midgut tissues from a total of 2 511 bacterial OTUs were identified. The negative control harbored 405 OTUs in common with at least one midgut sample. We considered these OTUs as real laboratory contaminants, or as false contaminants due to errors in assigning sequences. Either way, this result emphasizes the importance of sequencing a negative control in metagenomics studies even when working in an aseptic environment. Considering the overall midgut bacterial microbiota, 388 OTUs were common between populations from France and Vietnam, which is assumed to be a core microbiota shared in *Ae. albopictus* from different populations and habitats. The insect gut ecosystem is a relatively homogenous habitat in terms of pH and availability of nutrients and oxygen which may influence the midgut microbiota diversity (Dillon and Dillon, 2004). Among all the samples, a total of 56 dominant phylotypes were described and *Dysgonomonas* was the most prevalent and abundant one. This genus belongs to the phylum Bacteroidetes, and has already been detected in *Ae. albopictus* from Madagascar (Minard *et al.,* 2014). Interestingly, *Dysgonomonas* has also been identified in the gut of different animals such as termites (*Coptotermes formosanus, Macrotermes barneyi*), house flies (*Musca domestica*), fruit flies (*Drosophila melanogaster*), red palm weevils (*Rhynchophorus ferrugineus*) and sea bass (*Dicentrarchus labrax*) (Husseneder *et al.,* 2009; Chandler *et al.,* 2011; Carda-Diéguez *et al.,* 2014; Tagliavia *et al.,* 2014; Yang *et al.,* 2014). Some species are both aerobic and facultative anaerobic, which could partly explain how some may adapt to the nearly anoxic insect midgut habitat (Johnson and Barbehenn, 2000; Chouaia *et al.,* 2014). The production of vitamin B_{12} by *Dysgonomonas* strains of termites might be a selective mechanism involved in a mutualistic interaction with the host (Husseneder *et al.,* 2009).

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

All these observations point to *Dysgonomonas* having some role in mosquito biology. Finally, some *Dysgonomonas* species were also identified as human opportunistic pathogens, raising concern about the possibility of additional mosquito borne diseases (Hironaga *et al.,* 2008; Lawson *et al.,* 2010).

Other bacterial genera detected in *Ae. albopictus* belong to the *Sphingomonadaceae* family (*Sphingomonas*, *Sphingobium*, *Novosphingobium*) and were preferentially associated with the autochthonous populations from Vietnam. These bacterial genera are ubiquitous in the environment (Vaz-Moreira *et al.,* 2011; Ashton Acton, 2012) and are also able to colonize a variety of higher organisms (D'Auria *et al.,* 2013; Zhang *et al.,* 2013; Dai *et al.,* 2014). They display various catabolic abilities including the production of hydrolases involved in the degradation of oligosaccharides, and in termite hosts they may participate in the degradation of plant compounds (Aylward *et al.,* 2013). Moreover, these bacteria have already been identified in other plant-feeding insects including mosquitoes *Anopheles maculipenis*, *Anopheles gambiae*, *Anopheles stephensis* and *Aedes aegypti* (Dong *et al.,* 2009; Ramírez-Puebla *et al.,* 2010; Dinparast Djadid *et al.,* 2011; Gayatri Priya *et al.,* 2012; Terenius *et al.,* 2012; Koroiva *et al.,* 2013). From these observations, it could be assumed that *Sphingomonadaceae* are important in making plant sugar available to the mosquito host, by degrading oligosaccharides in the mosquito gut or acquiring them from the environment. Overall the bacterial communities associated with the invasive mosquito populations in France were less diverse and more homogeneous than those associated with autochthonous populations in Vietnam.

The living host environment is an important factor impacting the microbiota of insects (Linnenbrink *et al.,* 2013). In mosquitoes, it is known that feeding behavior may drastically modify the structure of gut microbiota and strongly increase inter-individual variation (Wang *et al.,* 2011; Pernice *et al.,* 2014). To avoid the effects of short-term changes in midgut microbiota, we only studied unfed mosquitoes, but long-term feeding effects cannot be ignored. Indeed, mosquito nutrition is mostly based on nectar and *Ae. albopictus* is known to have a wide

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

nutritional spectrum (Clements, 1992). Interestingly, previous studies of the microfloral diversity of different environments highlighted a significant reduction of species richness within the flowering plants (angiosperms) in temperate compared to tropical ecosystems (Francis and Currie, 2003). Therefore, the diversity and availability of plant nutrient sources could explain the reduction and the homogeneity in bacterial diversity we observed in populations in France. Populations from France also harbor a lower genetic diversity. Genetic reductions in invasive species have been widely documented. The most probable factor explaining genetic reduction in invasive populations is that recent colonization by a reduced effective size population causes a founder effect bottleneck and genetic drift (Dlugosch and Parker, 2008). However, no evidence for a recent founder effect was detected in the invasive populations in France. The short generation time of *Ae. albopictus* as well as the history of complex and multiple introductions (evidenced especially in Portes-Lès-Valence with both haplotype and microsatellite markers) may have erased signs of a past bottleneck. Interestingly, the most genetic diversified of these populations was in Nice, a sustainably invaded site since 2004 (Medlock *et al.,* 2012), whereas Portes-Lès-Valence and Saint-Priest were colonized much later. As already suggested in various models (reviewed by Sommer, 2005), genetic diversity reduction identified with neutral markers could be linked with diversity reduction of genes involved in immunity. Moreover, immune genes could be also an important selective pressure that would affect the composition of mosquito microbiota (Wang *et al.,* 2011; Minard *et al.,* 2013). Indeed, gut microbiota is involved in a strong reciprocal interaction with the host immune system in the mosquito gut (Hillyer, 2010; Cirimotich *et al.,* 2011; Weiss and Aksoy, 2011). We did not find any correlations between microbiota and mosquito genetic structure based on neutral microsatellite markers. Interestingly, a genetic study of mice using quantitative markers demonstrated that a core microbiota was regulated by a complex polygenic trait likely to involve pleiotropic effects (Benson *et al.,* 2010). Development of *Ae. albopictus* quantitative markers would be helpful in pinpointing which host genetic factors could partly shape the microbiota diversity.

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

Reduction in diversity for both the mosquito host and its associated bacterial microbiota also raises questions about the possible impact on human pathogen transmission. During transmission cycles, mosquito-vectored pathogens pass through the host midgut epithelial membrane to reach hemolymph and salivary glands. This checkpoint is critical for transmission as the pathogen faces the microbiota barrier and its potentially antagonistic activity (enzymes, toxins, etc.) as well as the host immune system (Cirimotich *et al.,* 2011; Weiss and Aksoy, 2011; Wang *et al.,* 2013). It was recently demonstrated that a high proportion of virus particles were able to disseminate beyond the insect midgut barrier in *Ae. albopictus* populations from Cagne-Sur-Mer (~12 km away from Nice in France) (Vega-Rua *et al.,* 2013). Moreover, lowest range of Chikungunya virus dissemination was found in mosquitoes from Vietnam (Zouache *et al.,* 2014). It is conceivable that the reduction and change in the mosquito microbiota and its associated immune response could partly explain the efficient vector competence observed in *Ae. albopictus* populations from Metropolitan France.

In conclusion, our results suggest anything which directly impacts the genetic diversity of *Ae. albopictus* could directly or indirectly affect the bacterial microbiota. This finding provides new insights into the biology of one invasive species and its associated bacterial microbiota. It also highlights the need of further ecological studies to describe how the invasive mosquito population with its reduced hologenome, responds when challenged by new biotic and abiotic factors. Moreover, the dynamics of mosquito-associated eukaryotic and viral microbiota should also be investigated to gain a fully integrated view of the whole holobiont pathosystem of the tiger mosquito.

Experimental Procedures

Sampling areas and mosquito collection

Ae. albopictus specimens were sampled between August and September 2012 at Saint-Priest (SP), Portes-Lès-Valence (PLV), and Nice (NC) in Metropolitan France and during October 2012

For Peer Review Only

362 at Hồ Chí Minh City (HCM), Bình Dương (BD), Vũng Tàu City (VT), and Bù Gia Mập (BGM) in
363 Vietnam (Fig. 1). All sites are urban or suburban, except BGM located in a protected forest
364 national park. Sampling sites were at least 18 km distant from each other to avoid sampling
365 populations originated from the same breeding site. Live adult females were caught with nets or
366 BG-Traps and then identified using morphological characteristics (Rueda, 2004). For some
367 individuals, identification was confirmed by COI barcode sequencing (see below). To control
368 confounding effects from nutritional and gender factors, only non-blooded, non-fed females were
369 used after binocular observations of gut contents. Mosquitoes were stored in 100% ethanol at -
370 80°C.
371
372 *Sample preparation, Miseq sequencing, quality trimming and diversity analysis of sequences*
373 Prior to dissection, female *Ae. albopictus* specimens were surface-disinfected with 70% ethanol
374 and rinsed with sterile water as previously described (Minard *et al.,* 2013). All dissection steps
375 were performed under a sterile laminar flow hood in a containment environment. Experimenters
376 wore all-in-one sterile suits and mouth protection to minimize contamination. Mosquitoes were
377 dissected in sterile 1× phosphate buffered saline solution (Life Technologies, NY, USA).
378 Dissected tissues were crushed with 1-mm (to extract midgut contents) or 5-mm (to extract
379 carcass contents) diameter beads in ATL lysis buffer (Qiagen, Hilden, Germany) containing 20
380 $mg.ml^{-1}$ lysozyme (Euromedex, Strasbourg, France) using a Bioblock Scientific MM 2000 mill
381 (Retsch, Eragny sur Oise, France). DNA was then extracted with Qiagen DNeasy Blood and
382 Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) following the manufacturer's recommendations for both
383 Gram negative and Gram positive bacteria. As negative controls to evaluate potential
384 contamination, DNA extraction and amplification steps without any biological matrix were carried
385 out and the four independent eluates obtained were concentrated and pooled. Hypervariable V5-
386 V6 *rrs* regions were amplified in triplicate for each DNA sample with 30 ng of DNA modified
387 primers 784F (5'-AGGATTAGATACCCTGGTA-3') and 1061R (5'-CRRCACGAGCTGACGAC-3')

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

388 as described (Andersson *et al.*, 2008) with modifications. Briefly, primers contains also a 8-bp
389 multiplex barcode and Illumina adapters and amplifications were performed with 1.75 U of
390 Expand High Fidelity Enzyme Mix (Roche, Basel, Switzerland), 1× Expand High Fidelity Buffer
391 (Roche, Basel, Switzerland), 0.06 mg mL−1 of T4 gene 32 protein (New England Biolabs, Evry,
392 France), 0.06 mg mL−1 of bovine serum albumin (New England Biolabs, Evry, France), 40 µM of
393 dNTP mix, 200 nM of each primer (Life Technologies, Saint Aubin, France) and 30 ng of
394 template DNA. V5-V6 hypervariable regions were amplified on Biorad C1000 thermal cycler
395 (Biorad, CA, USA) with 5min at 95°C, followed by 40 cycles at 95°C for 40 s, 54.2°C for 1min,
396 72°C for 30 s, with a final extension step of 7 min at 72°C. The triplicate samples were pooled
397 and purified with Agencourt AMPure XP PCR Purification kit (Beckman Coulter, Villepinte,
398 France) and DNA was quantified with the Quant-iT Picogreen dsDNA Assay Kit (Life
399 Technologies, NY, USA). Amplicons from carcasses and negative controls were pooled in
400 equimolar amounts before sequencing whereas amplicons from midguts were analyzed
401 individually. A total of 41 amplicon libraries were sequenced on the Illumina MiSeq platform (2 ×
402 250-bp paired-end reads) by ProfileXpert – ViroScan 3D (Lyon, France). A total of 9 222 165
403 (2x250-bp paired-end) reads were aligned with PandaSeq (Masella et al., 2012) and trimmed
404 using standard filtering tools in Mothur pipeline (Schloss *et al.,* 2009). Two errors were allowed
405 in primer sequences, read sizes were filtered to be 200 to 350 bp long with no ambiguous
406 bases. Chimeras were detected and removed with Perseus implemented in Mothur package.
407 Based on the analysis of clustered sequence rates from 92% to 99% similarity, OTUs were re-
408 adjusted to 97% similarity using a median neighbor algorithm. Sequences were classified
409 according to the SILVA database release 115 at 80% minimum bootstrap using a naïve
410 Bayesian classifier (Wang *et al.,* 2007). Richness, α and β diversity indices were calculated
411 using a subsample of the same read number for each sample. Diversity analyses, hierarchical
412 analysis of molecular variance (AMOVA), β-dispersion and heatmap representations were
413 performed with R software (R Development Core Team, 2009) using ade4 and vegan packages

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

(Dray and Dufour; Oksanen *et al.,* 2013). Non-random co-occurrence patterns were evaluated using the checkerboard score (C-score) under a null model preserving individual and site frequencies (Stone and Roberts, 1990). Co-occurrence networks were drawn between OTUs harboring a significant correlation (Spearman's rank correlation $\rho > 0.6$, *P-value* $< 10^{-1}$) as described (Barberán *et al.,* 2012). To highlight possible country-associated OTUs, extended errors bars were computed and classified according to Welsh modified t-test significance (*P-value*>0.05) using STAMP software (Parks and Beiko, 2010). All FastQ files were deposited at EMBL European Nucleotide Archive (www.ebi.ac.uk/ena/) under project accession number PRJEB6896.

Mitochondrial gene amplification and haplotyping

To maximize the quality and quantity of DNA obtained from 85 entire mosquitoes; our previously optimized extraction protocol was used (Minard *et al.,* 2014). The 597-bp region of mtDNA cytochrome c oxidase subunit I (*COI*) gene was amplified with CI-J-1632 (5'-TGATCAAATTTATAAT-3') and CI-N-2191 (5'-GGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3') primers and 45 ng of DNA matrix as described (Raharimalala et al., 2012). To analyze haplotypes, *COI* sequences were aligned with Seaview 4, then diversity and nucleotide composition were calculated with DnaSP (Librado and Rozas, 2009). AMOVA statistical analyses were performed with Arlequin 3.5.x (Excoffier and Lischer, 2010). The genetic structure of haplotypes among sites was represented by a median-joining haplotype network with NETWORK 4.612 (Bandelt *et al.,* 1999). All fasta files were deposited at EMBL European Nucleotide Archive (www.ebi.ac.uk/ena/) under project accession numbers LM999972-LM999977.

Microsatellite processing and genotyping

Microsatellite genotyping was performed using a set of 11 microsatellite markers previously described (Chambers *et al.,* 1986; Porretta *et al.,* 2006; Beebe *et al.,* 2013), namely AealbA9, AealbB51, AealbB52, AEDC, Alb-di6, Alb-tri3, Alb-tri18, Alb-tri25, Alb-tri41, Alb-tri45 and Alb-tri6 (Table S3). A total of 199 individuals were genotyped ranging from 22 to 30 individuals per

For Peer Review Only

sampling site. Amplifications were done with 10 ng of DNA and master mix from Qiagen Type-it Microsatellite PCR Kit following the manufacturer's recommendations (Qiagen, Hilden, Germany). Amplifications were performed on Biorad C1000 thermal cycler (Biorad, CA, USA) with an optimal protocol for each microsatellite to minimize unspecific artifacts. For AeablA9, AealbB51, and AealbB52 microsatellites, the program consisted of 5 min at 94 °C, followed by 35 amplification cycles at 94°C for 5 min, 52°C (AealbA9) or 50°C (AealbB51, Aealb0B52) for 30 s and 72°C for 45 s, with a final step of 30 min at 72°C. AEDC microsatellite sequences were amplified with 5 min at 94°C followed by 30 cycles of 45 s at 94°C, 1 min 30 s at 56°C and 45 s at 72°C, with a final step of 30 min at 60°C. Alb-di6, Alb-tri3, Alb-tri18, Alb-tri25, Alb-tri41, Alb-tri45 and Alb-tri6 were amplified as described by Beebe *et al.* (2013). PCR products were diluted (between 1/60 and 1/100 depending on the relative sensitivity of markers) then 1 µL was mixed with 13.8 µL of ultrapure Hi-Di-formamide TM and 0.2 µL of size marker (MRL 500) and loaded on an ABI Prism 3730XL Genetic Analyzer automated sequencer (Life Technologies, NY, USA). Microsatellites were scored manually with Genemapper 3.0 (LifeTechnologies, NY, USA). Null alleles were evaluated with FreeNA (Chapuis and Estoup, 2007). Diversity indices, linkage disequilibrium and hierarchical AMOVA analyses were computed with Genetix 4.05, Fstat 2.9.3.2 and Arlequin 3.5x softwares (Excoffier and Lischer, 2010). The Bayesian structure of populations was evaluated using Structure 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) with 100 000 "burn-in" steps followed by 500 000 iterations. Runs from 1 to 8 potential groups (K) were processed with 20 replicates. An admixture model was used with a location prior factor. As recommended for datasets with possible null alleles, a dominant allele option was set in the model. The best fit K-value was chosen with the Evanno method implemented in STRUCTURE HARVESTER (Evanno et al., 2005; Earl and vonHoldt, 2012) and the 20 replicates were averaged with CLUMPP (Jakobsson and Rosenberg, 2007). Finally, a population structure barplot was drawn with DISTRUCT (Rosenberg, 2004). Comparisons between Fst distances and bacterial microbiota Bray-Curtis distances were performed with a Mantel test. Rarefied genetic richness

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

(Ar) and diversity (Hs) were correlated with Shannon bacterial diversity using Spearman's rank correlation. As populations which experienced a recent reduction of their effective size can develop a heterozygosity excess at neutral loci, this parameter was tested using BOTTLENECK software (Cornuet and Luikart, 1996).

Quantification of Wolbachia wAlbA *and* wAlbB *strains*

Wolbachia wAlbA and wAlbB were quantified in whole bodies of 10 mosquitoes from each site. Their densities were measured in triplicate by qPCR amplification of the *Wolbachia wsp* gene and normalized with the *Ae. albopictus actin* gene as described (Zouache *et al.*, 2011). Correlations between the two strains were calculated with R software using the non-parametric Spearman's rank correlation.

Acknowledgments

We thank help by Bernard Kaufmann with population genetics advices, Patricia Luis with map design, Audrey Dubost with bioinformatics analysis and Guillaume Carillo with qPCR experiments. Funding for this project was provided by grants from EC2CO CNRS and CMIRA Région Rhône-Alpes. This research was also partially funded by ERA-NET BiodivERsA (2012-2013 call) and the national funders FRB France, FWF Austria, and DFG Germany, and was carried out within the framework of GDRI "Biodiversity and Infectious Diseases in Southeast Asia." To achieve this work, we used the computing facilities of the PRABI cluster. We also gratefully acknowledge the contribution of the DTAMB platform of the FR41 Bio-Environment and Health (University Lyon 1).

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

For Peer Review Only

De Albuquerque, A.L., Magalhães, T., and Ayres, C.F.J. (2011) High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipientis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 106: 773-776.

Ashton Acton, Q. (2012) Advances in Sphingomonadaceae Research and Application: 2012. Atlanta, USA: ScholarlyEditions.

Aylward, F.O., McDonald, B.R., Adams, S.M., Valenzuela, A., Schmidt, R.A., Goodwin, L.A., *et al.* (2013) Comparison of 26 Sphingomonad Genomes Reveals Diverse Environmental Adaptations and Biodegradative Capabilities. Appl. Environ. Microbiol. 79: 3724-3733.

Bandelt, H.J., Forster, P., and Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. Mol. Biol. Evol. 16: 37-48.

Barberán, A., Bates, S.T., Casamayor, E.O., and Fierer, N. (2012) Using network analysis to explore co-occurrence patterns in soil microbial communities. ISME J. 6: 343-351.

Beebe, N.W., Ambrose, L., Hill, L.A., Davis, J.B., Hapgood, G., Cooper, R.D., et al. (2013) Tracing the Tiger: Population Genetics Provides Valuable Insights into the *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* Invasion of the Australasian Region. PLoS Negl. Trop. Dis. 7: e2361.

Benson, A.K., Kelly, S.A., Legge, R., Ma, F., Low, S.J., Kim, J., *et al.* (2010) Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 107: 1893-18938.

Blottière, H.M., de Vos, W.M., Ehrlich, S.D., and Doré, J. (2013) Human intestinal metagenomics: state of the art and future. Curr. Opin. Microbiol. 16: 232-239.

Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., and James, A.A. (2013) The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. Trends Parasitol. 29: 460-468.

Buchner, P. (1965) Endosymbiosis of animals with plant microorganisms. Bucks, USA. Interscience Publishers.

For Peer Review Only

516 Carda-Diéguez, M., Mira, A., and Fouz, B. (2014) Pyrosequencing survey of intestinal microbiota
517 diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. FEMS Microbiol. Ecol.
518 87: 451-459.
519 Chambers, D.M., Young, L.F., and Hill, H.S. (1986) Backyard mosquito larval habitat availability
520 and use as influenced by census tract determined resident income levels. J. Am. Mosq. Control
521 Assoc. 2: 539-544.
522 Chandler, J.A., Lang, J.M., Bhatnagar, S., Eisen, J.A., and Kopp, A. (2011) Bacterial
523 communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system.
524 PLoS Genet. 7: e1002272.
525 Chapuis, M.-P. and Estoup, A. (2007) Microsatellite Null Alleles and Estimation of Population
526 Differentiation. Mol. Biol. Evol. 24: 621-631.
527 Chouaia, B., Gaiarsa, S., Crotti, E., Comandatore, F., Degli Esposti, M., Ricci, I., *et al.* (2014)
528 Acetic acid bacteria genomes reveal functional traits for adaptation to life in insect guts. Genome
529 Biol. Evol. 6: 912-920.
530 Cirimotich, C.M., Ramirez, J.L., and Dimopoulos, G. (2011) Native microbiota shape insect
531 vector competence for human pathogens. Cell Host Microbe 10: 307-310.
532 Clements, A.N. (1992) The biology of mosquitoes: Development, nutrition and reproduction.
533 London: United Kingdom. Chapman & Hall.
534 Cornuet, J.M. and Luikart, G. (1996) Description and power analysis of two tests for detecting
535 recent population bottlenecks from allele frequency data. Genetics 144: 2001-2014.
536 D'Auria, G., Peris-Bondia, F., Džunková, M., Mira, A., Collado, M.C., Latorre, A., and Moya, A.
537 (2013) Active and secreted IgA-coated bacterial fractions from the human gut reveal an under-
538 represented microbiota core. Sci. Rep. 3: 3515.
539 Dai, J.X., Liu, X.M., and Wang, Y.J. (2014) Diversity of endophytic bacteria in *Caragana*
540 *microphylla* grown in the desert grassland of the Ningxia Hui autonomous region of China.
541 Genet. Mol. Res. GMR 13: 2349-2358.

Wiley-Blackwell and Society for Applied Microbiology

For Peer Review Only

542 Dillon, R.J. and Dillon, V.M. (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions.
543 Annu. Rev. Entomol. 49: 71-92.
544 Dinparast Djadid, N., Jazayeri, H., Raz, A., Favia, G., Ricci, I., and Zakeri, S. (2011)
545 Identification of the midgut microbiota of *An. stephens*i and *An. maculipennis* for their application
546 as a paratransgenic tool against malaria. PloS One 6: e28484.
547 Dlugosch, K.M. and Parker, I.M. (2008) Founding events in species invasions: genetic variation,
548 adaptive evolution, and the role of multiple introductions. Mol. Ecol. 17: 431-449.
549 Dobson, S.L., Marsland, E.J., and Rattanadechakul, W. (2002) Mutualistic *Wolbachia* infection in
550 *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. Genetics 160: 1087-1094.
551 Dobson, S.L., Rattanadechakul, W., and Marsland, E.J. (2004) Fitness advantage and
552 cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. Heredity
553 93: 135-142.
554 Dong, Y., Manfredini, F., and Dimopoulos, G. (2009) Implication of the mosquito midgut
555 microbiota in the defense against malaria parasites. PLoS Pathog. 5: e1000423.
556 Douglas, A.E. (2011) Lessons from studying insect symbioses. Cell Host Microbe 10: 359–367.
557 Douglas, A.E. (2014) The Molecular Basis of Bacterial-Insect Symbiosis. J. Mol. Biol.
558 Dray, S. and Dufour, A.-B. The ade4 Package: Implementing the Duality Diagram for Ecologists.
559 J. Stat. Softw. 22:1-20.
560 Earl, D.A. and vonHoldt, B.M. (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for
561 visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv. Genet.
562 Resour. 4: 359-361.
563 Engel, P. and Moran, N.A. (2013) The gut microbiota of insects – diversity in structure and
564 function. FEMS Microbiol. Rev. 37: 699-735.
565 Evanno, G., Regnaut, S., and Goudet, J. (2005) Detecting the number of clusters of individuals
566 using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol. Ecol. 14: 2611-2620.

For Peer Review Only

567 Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to
568 perform population genetics analyses under Linux and Windows. Mol. Ecol. Resour. 10: 564-
569 567.
570 Francis, A.P. and Currie, D.J. (2003) A globally consistent richness-climate relationship for
571 angiosperms. Am. Nat. 161: 523-536.
572 Gayatri Priya, N., Ojha, A., Kajla, M.K., Raj, A., and Rajagopal, R. (2012) Host Plant Induced
573 Variation in Gut Bacteria of *Helicoverpa armigera*. PLoS ONE 7: e30768.
574 Handley, L.-J.L., Estoup, A., Evans, D.M., Thomas, C.E., Lombaert, E., Facon, B., *et al.* (2011)
575 Ecological genetics of invasive alien species. BioControl 56: 409-428.
576 Hillyer, J.F. (2010) Mosquito immunity. Adv. Exp. Med. Biol. 708: 218-238.
577 Hironaga, M., Yamane, K., Inaba, M., Haga, Y., and Arakawa, Y. (2008) Characterization and
578 antimicrobial susceptibility of *Dysgonomonas capnocytophagoides* isolated from human blood
579 sample. Jpn. J. Infect. Dis. 61: 212-213.
580 Hurst, G.D.D. and Jiggins, F.M. (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in
581 population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. Proc.
582 Biol. Sci. 272: 1525-1534.
583 Husseneder, C., Berestecky, J.M., and Grace, J.K. (2009) Changes in Composition of Culturable
584 Bacteria Community in the Gut of the Formosan Subterranean Termite Depending on Rearing
585 Conditions of the Host. Ann. Entomol. Soc. Am. 102: 498-507.
586 Jakobsson, M. and Rosenberg, N.A. (2007) CLUMPP: a cluster matching and permutation
587 program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure.
588 Bioinformatics 23: 1801-1806.
589 JohnsonV and Barbehenn R, null (2000) Oxygen levels in the gut lumens of herbivorous
590 insects. J. Insect Physiol. 46: 897-903.

For Peer Review Only

591 Kittayapong, P., Baisley, K.J., Sharpe, R.G., Baimai, V., and O'Neill, S.L. (2002) Maternal
592 transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in
593 Thailand. Am. J. Trop. Med. Hyg. 66: 103-107.
594 Koroiva, R., Souza, C.W.O., Toyama, D., Henrique-Silva, F., and Fonseca-Gessner, A.A. (2013)
595 Lignocellulolytic enzymes and bacteria associated with the digestive tracts of *Stenochironomus*
596 (Diptera: Chironomidae) larvae. Genet. Mol. Res. 12: 3421-3434
597 Lawson, P.A., Carlson, P., Wernersson, S., Moore, E.R.B., and Falsen, E. (2010)
598 *Dysgonomonas hofstadii* sp. nov., isolated from a human clinical source. Anaerobe 16: 161-164.
599 Librado, P. and Rozas, J. (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA
600 polymorphism data. Bioinforma. Oxf. Engl. 25: 1451-1452.
601 Linnenbrink, M., Wang, J., Hardouin, E.A., Künzel, S., Metzler, D., and Baines, J.F. (2013) The
602 role of biogeography in shaping diversity of the intestinal microbiota in house mice. Mol. Ecol.
603 22: 1904-1916.
604 Lizé, A., McKay, R., and Lewis, Z. (2014) Kin recognition in *Drosophila*: the importance of
605 ecology and gut microbiota. ISME J. 8: 469-477.
606 Masella, A.P., Bartram, A.K., Truszkowski, J.M., Brown, D.G., and Neufeld, J.D. (2012)
607 PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. BMC Bioinformatics 13: 31.
608 Medlock, J.M., Hansford, K.M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., and Van
609 Bortel, W. (2012) A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks,
610 and control options. Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N 12: 435-447.
611 Meusnier, I., Olsen, J.L., Stam, W.T., Destombe, C., and Valero, M. (2001) Phylogenetic
612 analyses of *Caulerpa taxifolia* (Chlorophyta) and of its associated bacterial microflora provide
613 clues to the origin of the Mediterranean introduction. Mol. Ecol. 10: 931-946.
614 Minard, G., Mavingui, P., and Moro, C.V. (2013) Diversity and function of bacterial microbiota in
615 the mosquito holobiont. Parasit. Vectors 6: 146.

For Peer Review Only

616 Minard, G., Tran, F.-H., Dubost, A., Tran-Van, V., Mavingui, P., and Valiente Moro, C. (2014)
617 Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes*
618 *albopictus*: a pilot study. Front. Cell. Infect. Microbiol. 4: 59.
619 Moran, N.A., McCutcheon, J.P., and Nakabachi, A. (2008) Genomics and evolution of heritable
620 bacterial symbionts. Annu. Rev. Genet. 42: 165-190.
621 Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2011) Diversity and Antibiotic Resistance
622 Patterns of Sphingomonadaceae Isolates from Drinking Water. Appl. Environ. Microbiol. 77:
623 5697-5706.
624 Moya, A., Peretó, J., Gil, R., and Latorre, A. (2008) Learning how to live together: genomic
625 insights into prokaryote-animal symbioses. Nat. Rev. Genet. 9: 218-229.
626 Muegge, B.D., Kuczynski, J., Knights, D., Clemente, J.C., González, A., Fontana, L., *et al.*
627 (2011) Diet drives convergence in gut microbiome functions across mammalian phylogeny and
628 within humans. Science 332: 970-974.
629 Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C.-H., Ndjango, J.-B.N., Peeters, M., Hahn, B.H., and
630 Hugenholtz, P. (2010) Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial
631 communities. PLoS Biol. 8: e1000546.
632 Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., *et al.* (2013)
633 vegan: Community Ecology Package. [WWW document]. URL http://cran.r-
634 project.org/web/packages/vegan/index.html
635 Parks, D.H. and Beiko, R.G. (2010) Identifying biologically relevant differences between
636 metagenomic communities. Bioinforma. Oxf. Engl. 26: 715-721.
637 Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., and Fontenille, D. (2009) *Aedes albopictus*, an
638 arbovirus vector: from the darkness to the light. Microbes Infect. Inst. Pasteur 11: 1177–1185.
639 Pernice, M., Simpson, S.J., and Ponton, F. (2014) Towards an integrated understanding of gut
640 microbiota using insects as model systems. J. Insect Physiol. *in-press*

For Peer Review Only

641 Porretta, D., Gargani, M., Bellini, R., Calvitti, M., and Urbanelli, S. (2006) Isolation of
642 microsatellite markers in the tiger mosquito *Aedes albopictus* (Skuse). Mol. Ecol. Notes 6: 880-
643 881.
644 Pritchard, J.K., Stephens, M., and Donnelly, P. (2000) Inference of Population Structure Using
645 Multilocus Genotype Data. Genetics 155: 945-959.
646 Raharimalala, F.N., Ravaomanarivo, L.H., Ravelonandro, P., Rafarasoa, L.S., Zouache, K.,
647 Tran-Van, V., et al. (2012) Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes*
648 *aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. Parasit. Vectors 5: 56.
649 Ramírez-Puebla, S.T., Rosenblueth, M., Chávez-Moreno, C.K., de Lyra, M.C.C.P., Tecante, A.,
650 and Martínez-Romero, E. (2010) Molecular phylogeny of the genus *Dactylopius* (Hemiptera:
651 Dactylopiidae) and identification of the symbiotic bacteria. Environ. Entomol. 39: 1178-1183.
652 Rosenberg, E. and Zilber-Rosenberg, I. (2014) The Hologenome Concept: Human, Animal and
653 Plant Microbiota. Cham, Switzerland. Springer International Publishing.
654 Rosenberg, N.A. (2004) distruct: a program for the graphical display of population structure. Mol.
655 Ecol. Notes 4: 137-138.
656 Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., et al. (2009)
657 Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for
658 describing and comparing microbial communities. Appl. Environ. Microbiol. 75: 7537-7541.
659 Sommer, S. (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology
660 and conservation. Front. Zool. 2: 16.
661 Stone, L. and Roberts, A. (1990) The checkerboard score and species distributions. Oecologia
662 85: 74-79.
663 Stouthamer, R., Breeuwer, J.A., and Hurst, G.D. (1999) *Wolbachia pipientis*: microbial
664 manipulator of arthropod reproduction. Annu. Rev. Microbiol. 53: 71-102.

For Peer Review Only

665 Tagliavia, M., Messina, E., Manachini, B., Cappello, S., and Quatrini, P. (2014) The gut
666 microbiota of larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). BMC
667 Microbiol. 14: 136.
668 Terenius, O., Lindh, J.M., Eriksson-Gonzales, K., Bussière, L., Laugen, A.T., Bergquist, H., *et al.*
669 (2012) Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. FEMS Microbiol. Ecol. 80: 556-565
670 Toft, C. and Andersson, S.G.E. (2010) Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial
671 host adaptation. Nat. Rev. Genet. 11: 465-475.
672 Tortosa, P., Charlat, S., Labbé, P., Dehecq, J.-S., Barré, H., and Weill, M. (2010) *Wolbachia*
673 age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: a host evolutionary response to cytoplasmic
674 incompatibility? PloS One 5: e9700.
675 Urbanski, J.M., Benoit, J.B., Michaud, M.R., Denlinger, D.L., and Armbruster, P. (2010) The
676 molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive
677 mosquito, *Aedes albopictus*. Proc. Biol. Sci. 277: 2683-2692.
678 Vega-Rua, A., Zouache, K., Caro, V., Diancourt, L., Delaunay, P., Grandadam, M., and Failloux,
679 A.-B. (2013) High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue
680 viruses in the Southeast of France. PloS One 8: e59716.
681 Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid
682 assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. Appl. Environ. Microbiol. 73:
683 5261-5267.
684 Wang, Y., Gilbreath, T.M., 3rd, Kukutla, P., Yan, G., and Xu, J. (2011) Dynamic gut microbiome
685 across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. PloS One 6: e24767.
686 Wang, Y., Wang, Y., Zhang, J., Xu, W., Zhang, J., and Huang, F.S. (2013) Ability of TEP1 in
687 intestinal flora to modulate natural resistance of *Anopheles dirus*. Exp. Parasitol. 134: 460-465.
688 Weiss, B. and Aksoy, S. (2011) Microbiome influences on insect host vector competence.
689 Trends Parasitol. 27: 514-522.

For Peer Review Only

690 Yang, Y.-J., Zhang, N., Ji, S.-Q., Lan, X., Zhang, K., Shen, Y.-L., et al. (2014) *Dysgonomonas*
691 *macrotermitis* sp. nov., isolated from the hindgut of a fungus-growing termite. Int. J. Syst. Evol.
692 Microbiol. 64:2956-2961.
693 Ye, L., Amberg, J., Chapman, D., Gaikowski, M., and Liu, W.-T. (2014) Fish gut microbiota
694 analysis differentiates physiology and behavior of invasive Asian carp and indigenous American
695 fish. ISME J. 8: 541-551.
696 Zhang, X., Lin, L., Zhu, Z., Yang, X., Wang, Y., and An, Q. (2013) Colonization and modulation
697 of host growth and metal uptake by endophytic bacteria of *Sedum alfredii*. Int. J.
698 Phytoremediation 15: 51-64.
699 Zilber-Rosenberg, I. and Rosenberg, E. (2008) Role of microorganisms in the evolution of
700 animals and plants: the hologenome theory of evolution. FEMS Microbiol. Rev. 32: 723-735.
701 Zouache, K., Fontaine, A., Vega-Rua, A., Mousson, L., Thiberge, J.-M., Lourenco-De-Oliveira,
702 R., et al. (2014) Three-way interactions between mosquito population, viral strain and
703 temperature underlying chikungunya virus transmission potential. Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 281:
704 1078.
705 Zouache, K., Raharimalala, F.N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L.H.R., Ravelonandro,
706 P., and Mavingui, P. (2011) Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and
707 *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. FEMS Microbiol. Ecol. 75:
708 377-389.
709 Zurel, D., Benayahu, Y., Or, A., Kovacs, A., and Gophna, U. (2011) Composition and dynamics
710 of the gill microbiota of an invasive Indo-Pacific oyster in the eastern Mediterranean Sea.
711 Environ. Microbiol. 13: 1467-1476.
712
713
714 **Table and Figure legends**

For Peer Review Only

715 **Fig. 1** Maps of sampling sites. Sampling sites and GPS coordinates (*World Geodetic System*
716 *1984*) in France **(A)** and Vietnam **(B).** NC, Nice; PLV, Porte-lès-Valence; SP, Saint Priest; VT,
717 Vũng Tàu City; HCM, Hồ Chí Minh City; BD, Bình Dương, BGM, Bù Gia Mập. Scale bars, 200
718 km.

719 **Fig. 2** Correlation densities of *Wolbachia pipientis*. Quantifications of *wsp* genes from each
720 *Wolbachia* *w*AlbA and *w*AlbB strains were normalized to the number of host actin copies.
721 Correlation coefficient (ρ) and associated *P-value* were calculated with Spearman's correlation
722 rank. NC, Nice; PLV, Porte-lès-Valence; SP, Saint Priest; VT, Vũng Tàu City; HCM, Hồ Chí Minh
723 City; BD, Bình Dương, BGM, Bù Gia Mập.

724 **Fig. 3** *Aedes albopictus* microbiota bacterial diversity. **(A)** The heatmap represents the relative
725 abundance of OTUs according to a color key for the samples. Bray-Curtis dissimilarity distances
726 are represented as dendrograms for sample phylotypes. Midgut samples from Vietnam (Light
727 blue); midgut samples from France (light green); pooled carcasses from Vietnam (dark blue);
728 pooled carcasses from France (dark green); negative control (yellow). A, B, C, D, E, F, G and N
729 indicate the different similarity groups. **(B)** Comparison of midgut bacterial diversity between
730 populations from France and Vietnam according to the 3% OTU richness estimations (Log_{10}
731 Chao), α-diversity (H') and β-diversity homogeneity (Bray-Curtis distance to centroid). **(C)**
732 Proportion of dissimilarity groups for midgut samples in each country.

733 **Fig. 4** Co-occurrence networks and OTU-country associations **(A)** Networks formed by strongly
734 correlated OTUs (Spearman's correlation rank > 0.6, *P-value* < 0.01) are represented as dots.
735 Strands represent correlations between two OTUs. Dot size is proportional to the number of
736 connections. The two main networks (Network 1 and Network 2) are circled. **(B)** OTU
737 abundance displayed as extended error bars representing significant fold-changes (*P-value* >
738 0.05) among midguts of populations from France (f) and Vietnam (v). **(C)** Venn diagram of
739 shared OTUs between midguts of populations from France, Vietnam and negative controls.
740 Sequences were merged per group, and then subsampled and singletons were removed.

For Peer Review Only

741 **Fig. 5** Genetic structures of *Aedes albopictus* populations. **(A)** COI gene haplotypes are
742 constituted by median joining network. Lines connect the six observed haplotypes (H_1, H_2,
743 H_3, H_4, H_5, H_6). Pie chart segments represent the proportions of different individuals from
744 each site according to haplotype frequency. Pie chart size is proportional to the total number of
745 samples represented. **(B)** Graph of the genetic structure of populations (K = 2) among
746 individuals. Each bar represents an individual and the grayscale represents the probability that
747 an individual belongs to a population. **(C)** Map of the haplotype proportions for each site. Scale
748 bar, 200 km. **(D)** Map of the microsatellite genetic structure for each site. Scale bar, 200 km. NC,
749 Nice; PLV, Porte-lès-Valence; SP, Saint Priest; VT, Vũng Tàu City; HCM, Hồ Chí Minh City; BD,
750 Bình Dương; BGM, Bù Gia Mập.
751 **Fig. 6** Correlation between host genetic richness, host genetic diversity and midgut bacterial
752 diversity. Correlation coefficient (ρ) and associated *P-value* were calculated with Spearman's
753 correlation rank. The mean bacterial Shannon α-diversity (H') was correlated with **(A)** rarefied
754 genetic richness (Ar) and **(B)** diversity (Hs). NC, Nice; PLV, Porte-lès-Valence; SP, Saint Priest;
755 VT, Vũng Tàu City; HCM, Hồ Chí Minh City; BD, Bình Dương; BGM, Bù Gia Mập.
756 **Table 1** AMOVA analysis.
757 **Table 2** Microsatellite characteristics among populations.
758
759 **Supporting information**
760 **Fig. S1** OTUs associated with *Ae. albopictus*. The heatmap represents the relative abundance
761 of OTUs according to a color key. Bray-Curtis dissimilarity distances were represented as
762 dendrograms for samples phylotypes. Midgut samples from Vietnam (Light blue); midgut
763 samples from France (light green); pooled carcasses from Vietnam (dark blue); pooled
764 carcasses from France (dark green); negative control (yellow). A, B, C, D, E, F, G and N indicate
765 the different similarity groups.

For Peer Review Only

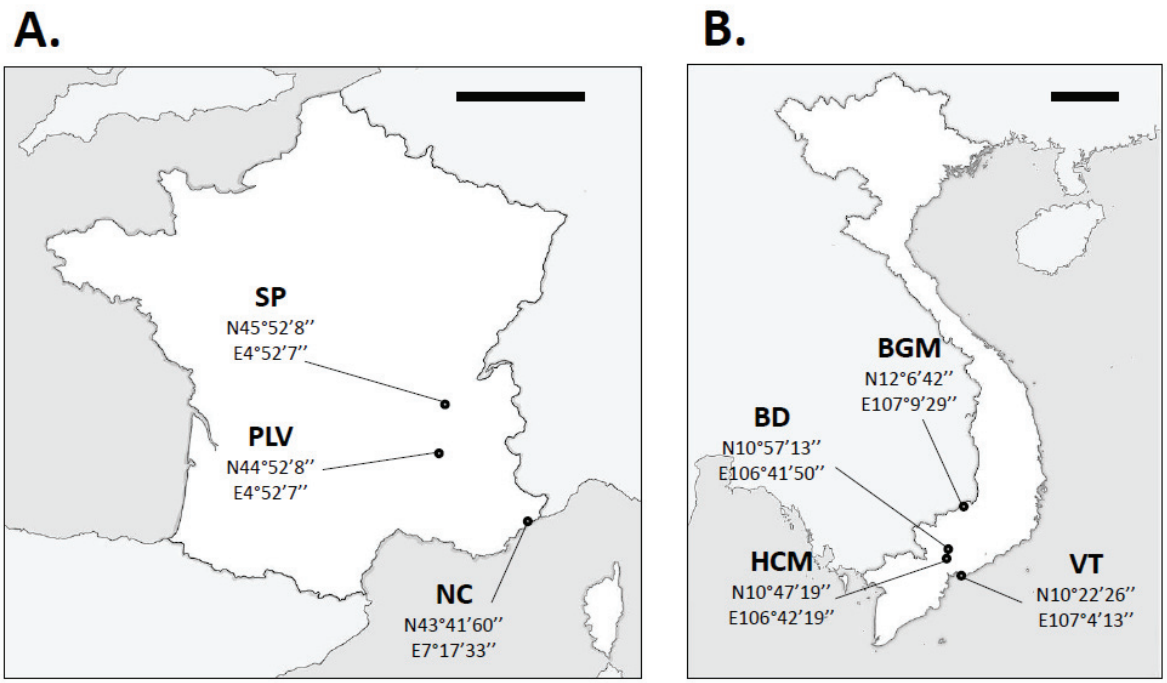


Fig. 1 Maps of sampling sites. Sampling sites and GPS coordinates (*World Geodetic System 1984*) in France **(A)** and Vietnam **(B).** NC, Nice; PLV, Porte-lès-Valence; SP, Saint Priest; VT, Vũng Tàu city; HCM, Hồ Chí Minh City; BD, Bình Dương, BGM, Bù Gia Mập. Scale bars, 200 km.

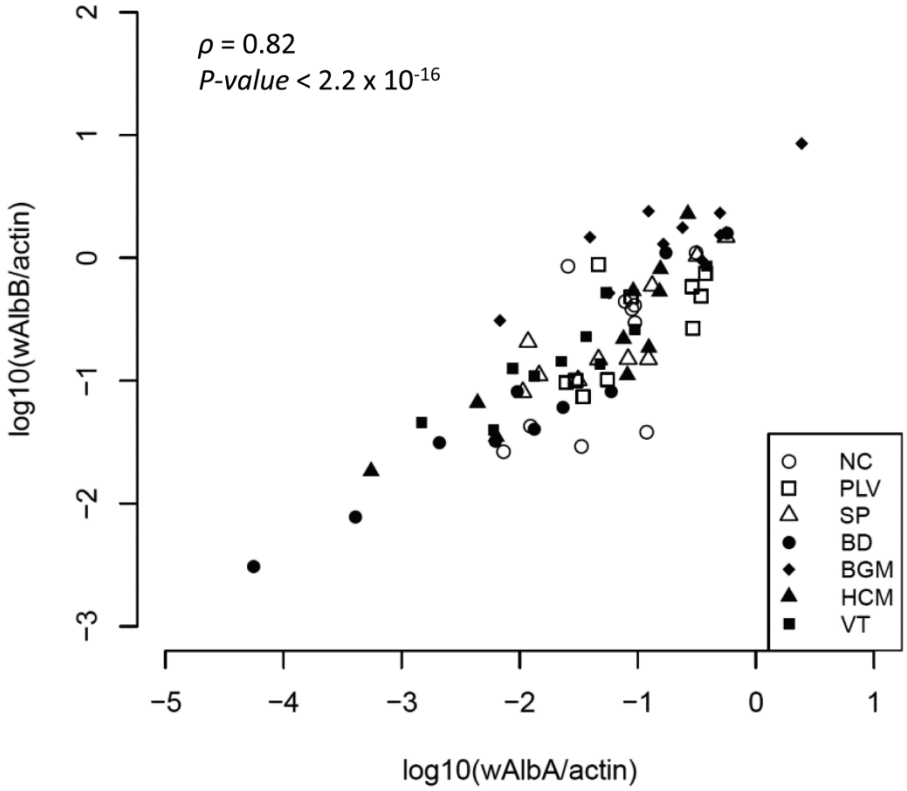


Fig. 2 Correlation densities of *Wolbachia pipientis*. Quantifications of *wsp* genes from each *Wolbachia* clade *w*AlbA and *w*AlbB were normalized to the number of host actin copies. Correlation coefficient (*ρ*) and associated *P-value* were calculated with Spearman's correlation rank. NC, Nice; PLV, Porte-lès-Valence; SP, Saint Priest; VT, Vũng Tàu city; HCM, Hồ Chí Minh City; BD, Bình Dương, BGM, Bù Gia Mập.

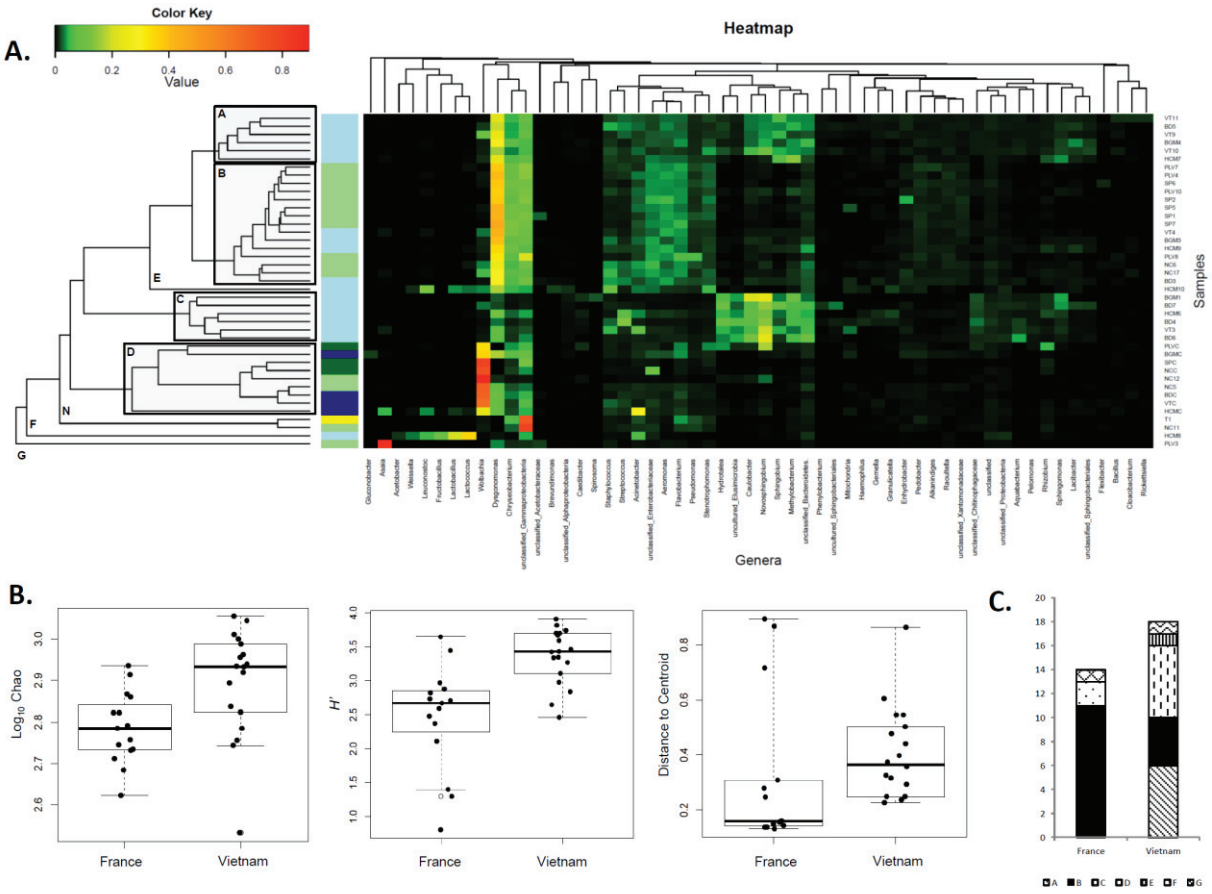


Fig. 3 *Aedes albopictus* microbiota bacterial diversity. **(A)** The heatmap represents the relative abundance of OTUs according to a color key for the samples. Bray-Curtis dissimilarity distances are represented as dendrograms for sample phylotypes. Midgut samples from Vietnam (Light blue); midgut samples from France (light green); pooled carcasses from Vietnam (dark blue); pooled carcasses from France (dark green); negative control (yellow). A, B, C, D, E, F, G and N indicate the different similarity groups. **(B)** Comparison of bacterial diversity between populations from France and Vietnam according to the 3% OTU richness estimations (Log_{10} Chao), α-diversity (H') and β-diversity homogeneity (Bray-Curtis distance to centroid). **(C)** Proportion of dissimilarity groups in each country.

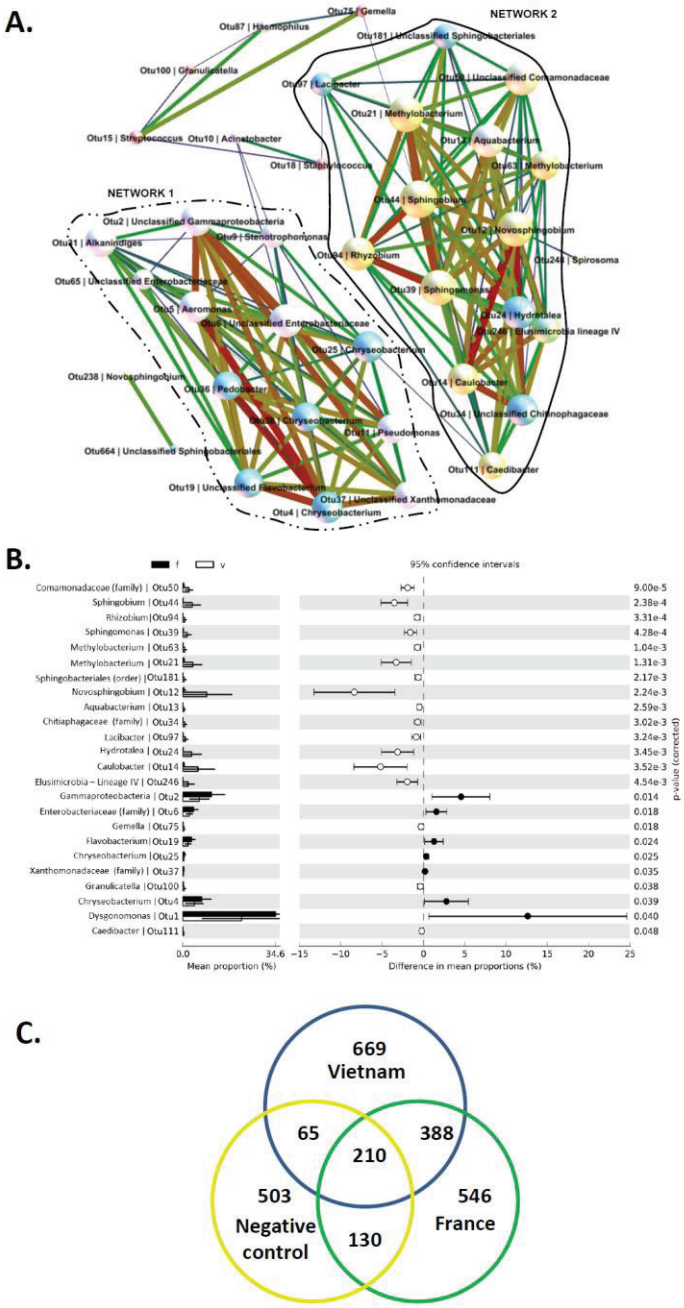


Fig. 4 Co-occurrence networks and OTU-country associations **(A)** Networks formed by strongly correlated OTUs (Spearman's correlation rank > 0.6, *P-value* < 0.01) are represented as dots. Strands represent correlations between two OTUs. Dot size is proportional to the number of connections. The two main networks (Network 1 and Network 2) are circled. **(B)** OTU abundance displayed as extended error bars representing significant fold-changes (*P-value* > 0.05) among populations from France (f) and Vietnam (v). **(C)** Venn diagram of shared OTUs between populations from France, Vietnam and negative controls. Sequences were merged per group, and then subsampled and singletons were removed.

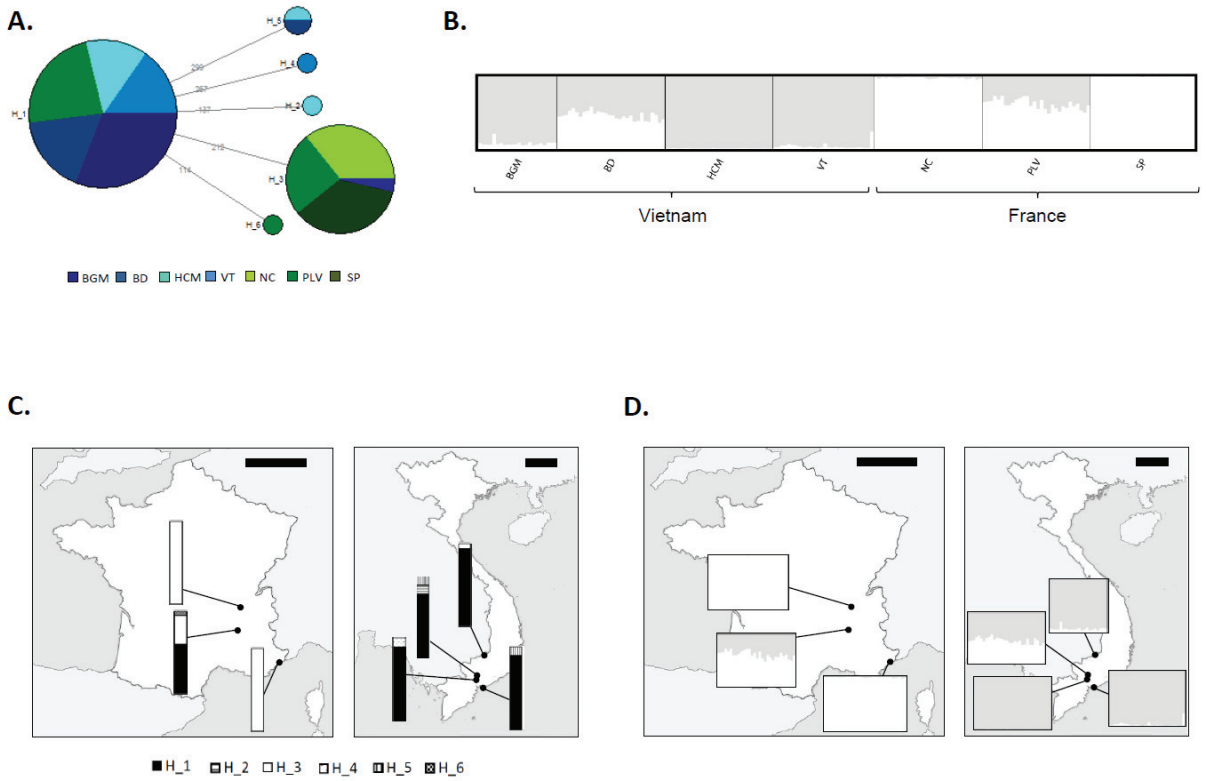


Fig. 5 Genetic structures of *Aedes albopictus* populations. **(A)** COI gene haplotypes are constituted by median joining network. Lines connect the six observed haplotypes (H_1, H_2, H_3, H_4, H_5, H_6). Pie chart segments represent the proportions of different individuals from each site according to haplotype frequency. Pie chart size is proportional to the total number of samples represented. **(B)** Graph of the genetic structure of populations (K = 2) among individuals. Each bar represents an individual and the grayscale represents the probability that an individual belongs to a population. **(C)** Map of the haplotype proportions for each site. Scale bar, 200 km. **(D)** Map of the microsatellite genetic structure for each site. Scale bar, 200 km.

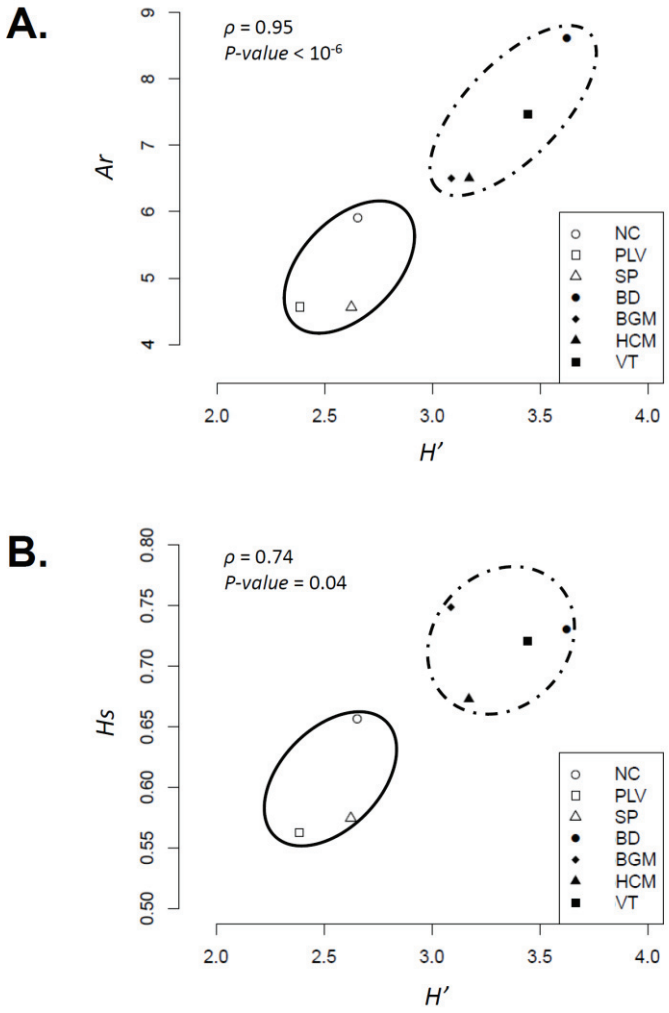


Fig. 6 Correlation between host genetic richness, host genetic diversity and bacterial diversity. The mean bacterial Shannon α-diversity (H') was correlated with **(A)** rarefied genetic richness (Ar) and **(B)** diversity (Hs). NC, Nice; PLV, Porte-lès-Valence; SP, Saint Priest; VT, Vũng Tàu city; HCM, Hồ Chí Minh City; BD, Bình Dương; BGM, Bù Gia Mập.

Table 1 AMOVA analysis.

	Haplotypes			Microsatellites			β-diversity (weighted unifrac)			β-diversity (Bray-Curtis)		
	df	Variation (%)	*P-value*	df	Variation (%)	*P-value*	df	Variation (%)	*P-value*	df	Variation (%)	*P-value*
Among Countries (φ_{CT})	1	54.3	0.02	1	2.61	0.2	1	17	0.02	1	18.2	0.03
Among Populations within Countries (φ_{SC})	5	20.54	$<10^{-3}$	5	12.61	$<10^{-3}$	26	7	0.43	26	6.2	0.48
Within populations	78	25.15		391	84.78		32	76		32	75.6	

df, degre of freedom

Table 2 Microsatellite characteristics among populations.

Country	Site	Index	di-6	tri-3	tri-18	tri-25	tri-41	tri-45	tri-6	B51	B52	A9	AEDC	All
Vietnam	**BD**	Nall	0.03	**0.21**	0.03	**0.16**	0	0.07	0	0	0	0.01	0	0.046
		Fis	0.114	0.49	0.125	0.366	0.058	0.211	0.038	-0.036	-0.14	-0.008	-0.164	0.133
		He	0.812	0.828	0.92	0.798	0.834	0.746	0.852	0.95	0.259	0.813	0.593	0.717
		Ho	0.733	0.433	0.82	0.519	0.8	0.6	0.833	1	0.3	0.833	0.7	0.636
	HCM	Nall	0	**0.17**	0.01	**0.22**	0.11	0.05	0.04	0.06	0	0.06	0.03	0.068
		Fis	-0.105	0.395	0.183	0.556	0.533	0.109	0.098	0.116	na	0.188	0.137	0.196
		He	0.683	0.723	0.68	0.691	0.723	0.882	0.798	0.633	0	0.624	0.493	0.659
		Ho	0.767	0.448	0.57	0.318	0.533	0.8	0.733	0.645	0	0.517	0.433	0.537
	VT	Nall	0	0.01	**0.16**	**0.25**	**0.13**	0	0	0	0	0.07	0	0.056
		Fis	-0.137	0.146	0.36	0.588	0.305	0.049	-0.008	na	-0.061	0.123	-0.309	0.122
		He	0.77	0.696	0.87	0.725	0.803	0.848	0.866	0	0.364	0.827	0.647	0.706
		Ho	0.889	0.607	0.57	0.308	0.571	0.821	0.889	0	0.393	0.741	0.857	0.615
	BGM	Nall	0	**0.19**	0.01	0.02	**0.08**	**0.13**	**0.11**	0.05	**0.12**	**0.16**	0.01	0.08
		Fis	0.026	0.429	0.012	0.071	0.218	0.267	0.264	0.119	0.267	0.369	-0.309	0.171
		He	0.775	0.693	0.9	0.7	0.791	0.783	0.84	0.386	0.542	0.838	0.65	0.729
		Ho	0.773	0.409	0.91	0.667	0.636	0.591	0.636	0.35	0.41	0.546	0.86	0.627
France	**NC**	Nall	0.08	0.21	0.07	0.03	0	0.2	**0.09**	0	0	0.07	0	0.068
		Fis	0.129	0.562	0.328	0.017	-0.057	0.539	0.223	na	-0.024	0.136	-0.141	0.181
		He	0.638	0.634	0.72	0.756	0.807	0.655	0.825	0	0.099	0.847	0.654	0.642
		Ho	0.567	0.286	0.5	0.762	0.867	0.31	0.655	0	1.03	0.75	0.762	0.545
	PLV	Nall	**0.08**	**0.13**	0.06	**0.12**	0.01	0	0.05	0	**0.11**	**0.22**	0	0.071
		Fis	0.207	0.507	0.108	0.211	0.033	-0.143	0.13	na	0.487	0.51	-0.306	0.152
		He	0.494	0.292	0.77	0.727	0.745	0.316	0.827	0	0.127	0.686	0.504	0.551
		Ho	0.4	0.148	0.7	0.607	0.733	0.367	0.733	0	0.067	0.345	0.667	0.475
	SP	Nall	0.04	0.03	0	0.09	0.05	0.01	0.08	0	0	0.05	0.06	0.037
		Fis	0.005	0.154	-0.012	0.223	0.122	0.011	0.191	na	na	0.2	0.176	0.12
		He	0.579	0.4	0.84	0.765	0.757	0.48	0.71	0	0	0.675	0.574	0.706
		Ho	0.586	0.345	0.86	0.607	0.679	0.483	0.586	0	0	0.552	0.483	0.615

Significant frequencies of null alleles are in bold. NC, Nice; PLV, Porte-lès-Valence; SP, Saint Priest; VT, Vũng Tàu city; HCM, Hồ Chí Minh City; BD, Bình Dương, BGM, Bù Gia Mập.

1. Supplementary Tables

Table S1 Microsatellite primers and information.

Locus	Accession number	size range	5'modified-Forward	Reverse	Reference
AealbA9	DQ366022	141-179	5'PET-TGGGACAAGAGCTGAAGGAT	CTCGTTCTCTACTCTCTCCGTT	Porretta et al., 2006
AealbB51	DQ366023	132-160	5'VIC-TCCACGTGGTATAACTCTGA	GTAGTTGTCCAATTAACATCG	Porretta et al., 2006
AealbB52	DQ366024	165-176	5'NED-GGGTCTAGAAGTAATAGCGATG	GCATTCTTTGCTTCTGTTTGC	Porretta et al., 2006
AEDC	T58313	203-228	5'FAM-TGCAGGCCCAGATGCACAGCC	TCCGCTGCCGTTGGCGTGAAC	Chambers ert al., 2007
Alb-di6	KF146972	245-267	5'ATTO565-TCTTCATCTACGCTGTGCTC	GACGCCAATCCGACAAAGTC	Beebe et al., 2013
Alb-tri3	KF146973	102-134	5'Yakima Yellow-AGATGTGTCGCAATGCTTCC	GATTCGGTGATGTTGAGGCC	Beebe et al., 2013
Alb-tri18	KF146975	221-263	5'Yakima Yellow-ACACAATTGCCGTTCAGCTC	CGTCTAATAGCTCCGGTCCC	Beebe et al., 2013
Alb-tri25	KF146978	253-279	5'ATTO550-CCAACCAACAACCCAGGAAC	TACGATGCGCAACCATCATC	Beebe et al., 2013
Alb-tri41	KF146980	103-136	5'ATTO550-GATCGATTTGGGAGCTTCTG	GAACCTCTTCTCGCTTGGCT	Beebe et al., 2013
Alb-tri45	KF146982	116-143	5'ATTO565-TTTCAGCTCGGTGTTATGGC	TGATGTTGATGATGATGACTACGA	Beebe et al., 2013
Alb-tri6	KF146974	156-190	5'FAM-AGCACGAGTACAGAATGTGC	TGGCCTCCTACCGTTTATCTG	Beebe et al., 2013

Table S2 Haplotypes and nucleotide diversity.

Country	Site	n	π	*Hd*	Estimated richness
Vietnam	BD	9	0.00053	0.222	1.53
Vietnam	BGM	17	0.00028	0.118	1.37
Vietnam	HCM	9	0.00106	0.417	2.13
Vietnam	VT	10	0.00048	0.2	1.51
France	NC	10	0	0	1
France	PLV	20	0.00138	0.542	2.67
France	SP	10	0	0	1

Table S3 Bottleneck analysis.

Site	Wilcoxon test			Mode-Shift distribution
	I.A.M.	T.P.M.	S.M.M.	
BD	0.05	0.99	0.99	no
HCM	0.16	0.99	0.99	no
VT	0.001	0.95	0.99	no
BGM	0.07	0.97	0.99	no
NC	0.08	0.95	0.99	no
PLV	0.22	0.78	0.96	no
SP	0.005	0.79	0.99	no

We tested the bottleneck hypothesis under three different mutation models: IAM, infinite allele model; TPM, two-phase model; and SMM, stepwise mutation model. *P-values* of Wilcoxon test represent one tailed probability for heterozygosity excess. The mode shift test detects distortion of allele frequency distribution.

2. Supplementary Figures

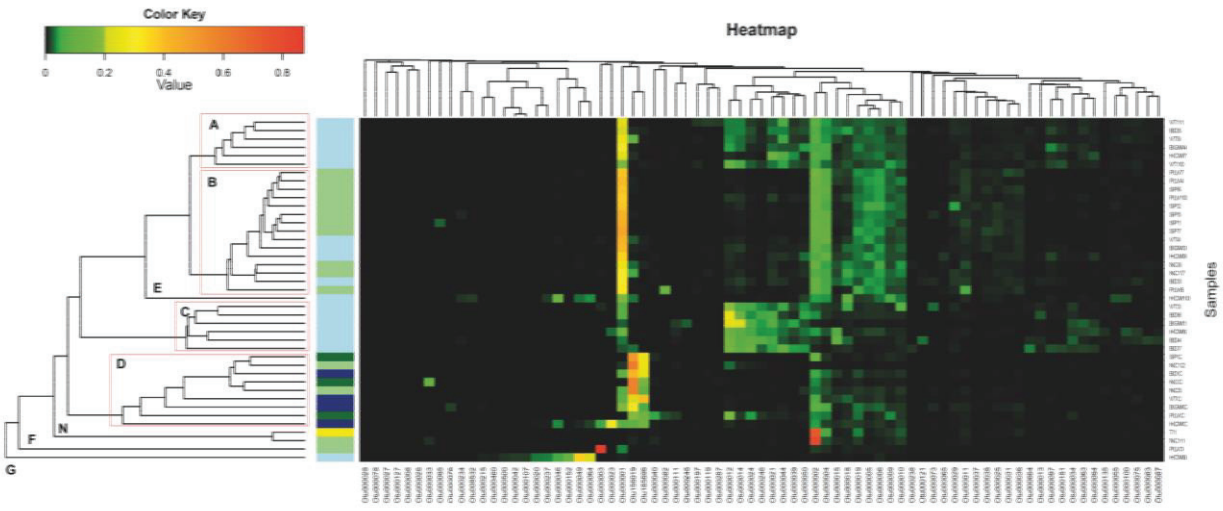


Fig. S1 OTUs associated with *Ae*. *albopictus*. The heatmap represents the relative abundance of OTUs according to a color key. Bray-Curtis dissimilarity distances were represented as dendrograms for samples phylotypes. Midgut samples from Vietnam (Light blue); midgut samples from France (light green); pooled carcasses from Vietnam (dark blue); pooled carcasses from France (dark green); negative control (yellow). A, B, C, D, E, F, G and N indicate the different similarity groups.

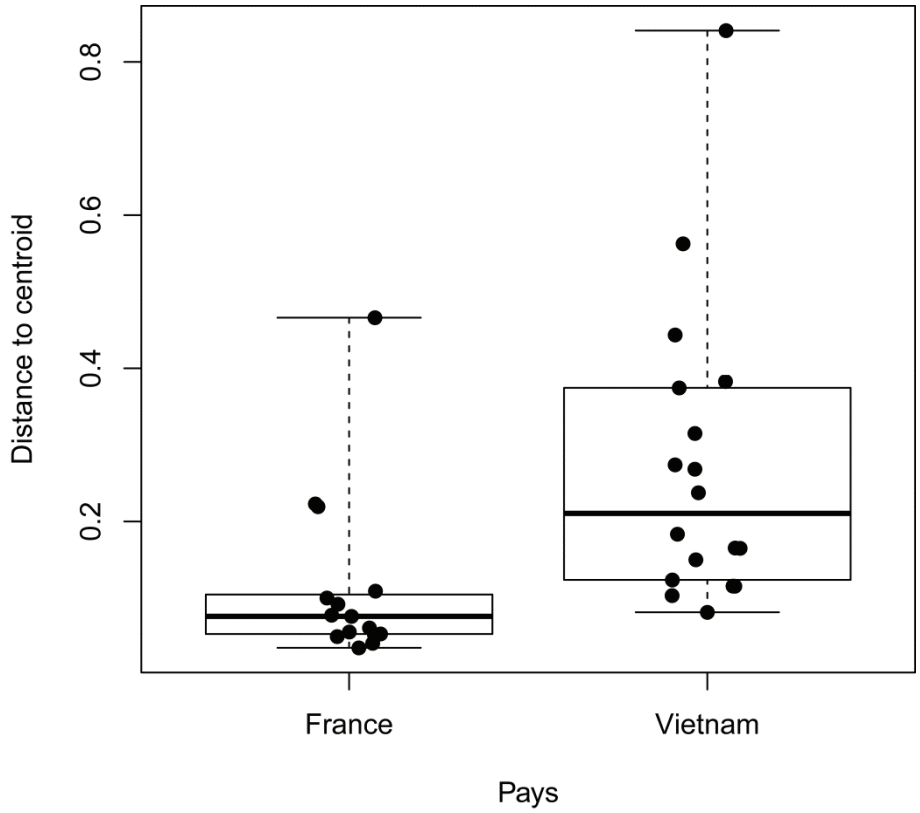


Fig. S2 Unifrac weighted β-diversity homogeneity. Unifrac weighted distances to centroid are represented for each country.

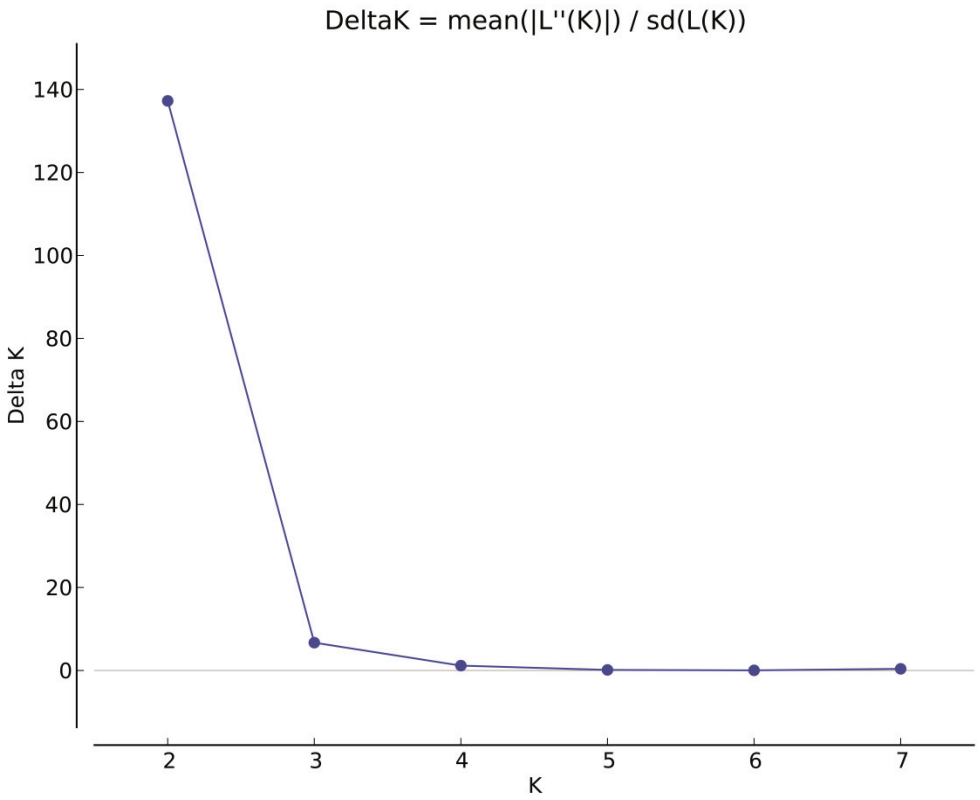


Fig. S3 Prediction of the best value of *K*. According to Evanno, 2005, the distribution of *ΔK* (absolute values of the second-order in change of the likelihood distribution divided by the standard deviation of the likelihoods) was plotted for each value of K (number of potential sub-groups) from 2 to 7.

4.4. Discussion et conclusions

Tous les organismes supérieurs entretiennent des interactions étroites avec des symbiotes qui forment en partie leur microbiote. Ces interactions sont en permanence confrontées à des pressions de sélection susceptibles de modifier leur équilibre. Une meilleure compréhension de leur fonctionnement nécessite une approche intégrée prenant en compte l'holobionte, c'est-à-dire l'ensemble formé par l'hôte et son microbiote (Zilber-Rosenberg and Rosenberg, 2008). C'est le cas pour les moustiques chez lesquels de nombreux exemples témoignent de l'importance des interactions symbiotiques et multitrophiques (Minard, Mavingui, et al., 2013). Comme observé chez d'autres modèles d'insectes (Engel and Moran, 2013; Lizé et al., 2014), il est envisagé que les bactéries associées aux moustiques puissent influencer leur capacité à répondre aux facteurs biotiques et abiotiques du milieu. Cependant, jusqu'à présent, très peu d'études ont permis de révéler si et comment le microbiote bactérien pouvait contribuer à la valeur sélective de l'holobionte moustique. L'une des étapes essentielles à l'avancement de cette problématique est la connaissance des communautés bactériennes hébergées par les moustiques, un préalable aux études de leur rôle dans la biologie des hôtes. Dans ce contexte, notre objectif a été d'étudier, au moyen d'une approche de méta-taxogénomique, le microbiote bactérien de populations invasives et autochtones d'*Ae. albopictus* en lien avec leur diversité génétique.

Les résultats obtenus ont tout d'abord confirmé la forte prévalence de la bactérie *Wolbachia* (100%) au sein des sept populations de France et du Vietnam et montré une corrélation forte entre les densités des deux souches *w*AlbA et *w*AlbB, suggérant une régulation fine de leur co-occurence. Même si *Wolbachia* est reconnue pour augmenter la valeur sélective des femelles, elle est également connue pour avoir un impact négatif sur leur taux de reproduction via le phénomène d'incompatibilité cytoplasmique (Stouthamer *et al.*, 1999; Dobson *et al.*, 2002). La superinfection (individus co-infectés par 2 souches ou plus de *Wolbachia*) complexifie encore le système, et les modèles prédisent que les femelles superinfectées possèderaient un avantage sélectif pour la reproduction du fait de leur capacité à se croiser avec un mâle infecté ou non (Dobson et al., 2004; Tortosa et al., 2010). L'analyse par PCR de populations naturelles d'*Ae. albopictus* de Madagascar, du Brésil et de Thaïlande a ainsi confirmé que plus de 99% des individus étaient superinfectés par les clades de *Wolbachia* *w*AlbA et *w*AlbB (Kittayapong et al., 2002a; de Albuquerque et al., 2011; Zouache et al., 2011). Des études ont également montré que *Wolbachia* pouvait induire une pression de sélection sur les mitochondries conduisant à une réduction de la variabilité génétique de cette organelle chez *Ae. albopictus* (Hurst and Jiggins, 2005). Notre analyse barcoding du gène CO1 a confirmé ces observations en révélant une très faible

diversité nucléotidique au sein des populations étudiées (moins de 3 haplotypes par site d'échantillonnage après raréfaction).

Un total de 2 511 UTOs bactériennes a été identifié à partir de l'analyse des intestins moyens des moustiques. Nous avons montré la présence de 405 UTOs communes entre le témoin négatif et un échantillon d'intestin moyen, témoignant de l'importance de séquencer un échantillon contrôle indépendamment des précautions prises lors de la préparation des matrices nucléiques en conditions aseptiques. L'origine de ces contaminants reste difficile à déterminer mais serait probablement un mélange ambiant contracté lors des manipulations ou directement apportés par les réactifs, ou bien encore de faux contaminants générés par des erreurs d'indexage lors de la réalisation du séquençage. Par ailleurs, une étude récente a démontré l'impact significatif des réactifs de kits d'extraction d'ADN sur la contamination 16S dans le cadre des approches Méta-taxogénomique (Salter et al., 2014). En excluant les contaminants, le diagramme de Venn a permis de détecter 388 UTOs communes aux échantillons de France et du Vietnam, pouvant ainsi être considérées comme le core microbien partagé par les différentes populations d'*Ae. albopictus*. Parmi eux, 56 phylotypes dominants ont été décrits dont le genre *Dysgonomonas* qui s'est révélé le plus prévalent et le plus abondant. Ces résultats confirment les observations précédentes (chapitre 4.3.2.3) où *Dysgonomonas* était l'un des taxons majoritaires identifiés dans les intestins moyens de moustique tigre échantillonné sur l'île de Madagascar. Une association durable entre *Dysgonomonas* et *Ae. albopictus* est donc très fortement enviseageable et il est essentiel de mieux caractériser le métabolisme de cette bactérie au sein de l'intestin moyen du moustique afin de décrypter la nature des interactions qui unissent ces deux partenaires. Par ailleurs, certains membres de la famille des *Sphingomonadaceae* (*Sphingomonas, Sphingobium, Novosphingobium*) ont été retrouvés préférentiellement associés aux populations autochtones du Vietnam. Ces genres bactériens, ubiquistes, ont été déjà décrits d'environnements variés (eau, sol, plantes, insectes…) (Vaz-Moreira et al., 2011; Ashton Acton, 2012) ainsi que chez des organismes eucaryotes (D'Auria et al., 2013; Zhang et al., 2013; Dai et al., 2014). Ces bactéries possédent un large spectre d'activités cataboliques. Certaines participent par exemple à la dégradation de la lignocellulose dans le tube digestif des termites (Aylward et al., 2013). Ces bactéries ont déjà été identifiées chez certains insectes dont les moustiques (*An. gambiae, An. stephensi,* et *Ae. aegypti*) ayant pour caractéristique commune un mode de nutrition en partie constituée de composés végétaux (Dong et al., 2009; Ramírez-Puebla et al., 2010; Dinparast Djadid et al., 2011; Gayatri Priya et al., 2012; Terenius et al., 2012; Koroiva et al., 2013). Ces observations suggèrent ainsi un rôle potentiel des *Sphingomonadaceae* dans le métabolisme des sucres et autres substrats d'origine végétale au sein du tube digestif des animaux.

Les résultats d'analyse de diversité ont montré que les communautés bactériennes associées aux populations invasives de France étaient moins diversifiées et plus homogènes que celles des populations autochtones du Vietnam. Ces observations pourraient s'expliquer par des différences au niveau des conditions éco-climatiques des écosystèmes français et vietnamiens. En effet, des études ont montré que l'environnement pouvait être un facteur majeur de structuration du microbiote (Linnenbrink et al., 2013). Dans ce contexte, les différences trophiques de chacune des populations auraient pu favoriser les variations inter-individuelles au niveau du contenu du microbiote bactérien (Wang et al., 2011; Pernice et al., 2014). En effet, Wang et collaborateurs (Wang et al., 2011) ont montré que la nutrition pouvait entrainer une modification transitoire de la structure du microbiote du moustique qui retrouvait par la suite une résilience. Cependant, l'utilisation d'individus au bol alimentaire vide nous a permis de limiter ce biais lié à la nutrition, sans toutefois exclure la possibilité que les différences nutritionnelles puissent entrainer des modifications à long terme. Il est à noter que les angiospermes, source nutritionnelle des moustiques, ont également montré une richesse plus réduite dans les régions tempérées par rapport aux régions tropicales (Francis and Currie, 2003). Par conséquent, la faible diversité et disponibilité des angiospermes en France pourraient expliquer la réduction observée de diversité et la plus forte homogénétité du microbiote bactérien au sein des populations Françaises de moustiques. Par ailleurs, ces populations de France se sont avérées moins diversifiées génétiquement. Les réductions génétiques au sein des espèces invasives ont été largement documentées. L'un des facteurs pouvant expliquer ce phénomène est une colonisation récente du territoire par une population de faible taille efficace, entraînant un goulot d'étranglement et de la dérive génétique (Dlugosch and Parker, 2008). Nos travaux n'ont pas démontré de réduction d'hétérozygosité, et n'ont donc pas mis en évidence de goulot d'étranglement récent en France. Le faible temps de génération d'*Ae. albopictus* ainsi que son historique d'introduction complexe et probablement multiple peuvent être deux facteurs expliquant la disparition d'indices d'un goulot d'étranglement passé. De manière intéressante, la ville de Nice, qui représente la zone d'invasion la plus précoce (2005), a également hébergé la population française la plus diversifiée (Medlock et al., 2012). Comme suggéré par différents modèles (Sommer, 2005), les réductions de diversité génétique détectées par des marqueurs neutres peuvent être liées à une réduction de diversité des gènes de l'immunité. Dans cette étude, nous n'avons pas démontré de corrélation entre la structure du microbiote et la structure génétique des populations. Pourtant, l'immunité est un facteur important induisant une forte pression de sélection sur le microbiote, ce dernier étant en interaction étroite avec le système immunitaire du tube digestif du moustique (Cirimotich et al., 2011; Hillyer, 2010; Weiss and Aksoy, 2011; Wang et al., 2011). Des études réalisées chez la souris avec des marqueurs quantitatifs ont démontré que le core microbien était

régulé par un ensemble complexe de traits polygéniques qui sembleraient de plus impliquer des effets pléiotropiques (Benson et al., 2010). Le développement de marqueurs quantitatifs pourrait donc être un outil intêressant pour la découverte de facteurs génétiques impliqués dans la structuration du microbiote.

En conclusion, ces travaux ouvrent la voie à de nouvelles perspectives pour l'étude des interactions Génotypes x Microbiote x Environnement de l'holobionte moustique. De plus, comme cela a déjà été suggéré, les réductions de diversité traduisent souvent un plus faible potentiel des individus à résister aux changements environnementaux. Il serait donc intéressant de poursuivre nos investigations sur ces populations invasives de France et d'étudier leur capacité à répondre à différents stress y compris aux infections par les pathogènes transmis. Ces travaux soulèvent ainsi la question de l'évolution de la compétence vectorielle des populations invasives qui représentent un risque épidémique.

4.5. Mise en évidence d'une espèce cryptique et caractérisation de son microbiote bactérien

4.5.1. Contexte de l'étude

Les moustiques vecteurs *Aedes aegypti* et *Ae. albopictus* sont les deux espèces du sous genre *Stegomyia* les plus étudiées du fait de leur capacité à répliquer et transmettre des pathogènes humains et vétérinaires. L'identification de ces espèces est souvent basée sur des critères morphologiques et en particulier, pour les adultes, sur des motifs présents sur le thorax (et plus particulièrement le scutellum) et les tarses (Huang, 1972; Tanaka et al., 1979; Rueda, 2004). Cependant, ces critères d'identification peuvent se révéler insuffisants pour certaines espèces comme celles proches d'*Aedes albopictus*, réunies dans la littérature sous le terme de « sous-groupe *Aedes albopictus* » qui possèdent des caractéristiques morphologiques extrêmement similaires en particulier aux stades larvaires et adultes (femelles) (Huang, 1972; Tanaka et al., 1979; Hawley, 1988). Les espèces de ce sous-groupe présentent pour la plupart des niches écologiques différentes d'*Ae. albopictus* mais il arrive parfois qu'elles soient retrouvées en sympatrie, partageant ainsi de nombreux habitats (Huang, 1972, 1979; McLain et al., 1987; Patsoula et al., 2006). C'est notamment le cas en Asie où les populations autochtones d'*Ae. albopictus* coexistent avec les populations d'*Ae. flavopictus, Ae. pseudalbopictus*, *Ae. subalbopictus, Ae. patricae et Ae. novalbopictus* (Huang, 1972, 1979), ou encore en Grèce où les populations invasives d'*Ae. albopictus* cohabitent avec des populations autochtones d'*Ae. cretinus* (Patsoula et al., 2006).

L'importance de ces espèces cryptiques dans les cycles de transmission de pathogènes est assez méconnue et n'a été que très peu étudiée jusque-là. Ceci s'explique notamment par leur faible contact avec les populations humaines, mais également par leur forte ressemblance avec le moustique tigre, parfois identifié à tort.

Chez *Ae. albopictus*, la bactérie endosymbiotique *Wolbachia* est connue pour induire un phénotype d'incompatibilité cytoplasmique (Kambhampati et al., 1993). Chez les insectes, ce mécanisme de contrôle de la reproduction pourrait être à l'origine d'un isolement reproductif entre populations (Bordenstein et al., 2001). L'acquisition de *Wolbachia* pourrait donc à long terme participer aux événements de spéciation. De même, l'isolement reproductif peut constituer une barrière à l'invasion de *Wolbachia* (Rasgon et al., 2006). Des études menées chez les guêpes parasitoïdes *Nasonia girault*i et *Nasonia vitripennis* ont également montré que le microbiote pouvait être à l'origine d'une spéciation tirant son origine d'isolements reproductifs, en induisant une réaction autoimmune chez les hybrides (Brucker and Bordenstein, 2013). De tels événements sont plus succeptibles d'être détectés au sein de complexes d'espèces ayant divergé récemment et possédant par conséquent une part importante de leur fond génétique en commun. Lors de notre mission d'échantillonnage dans la réserve naturelle de Bù Gia Mập au sud du Vietnam, nous avons mis en évidence la présence d'une espèce cryptique en sympatrie avec *Ae. albopictus*. Afin d'évaluer sa proximité avec le moustique tigre, nous avons génotypé les individus par des marqueurs mitochondriaux et microsatellites puis analysé leur microbiote bactérien par une approche de séquençage haut-débit.

4.5.2. Materiel et méthodes

Identification des individus et extraction d'ADN

L'identification des espèces a été réalisée sous loupe binoculaire en suivant les clefs morphologiques de l'espèce *Ae. albopictus* (Huang, 1972; Tanaka et al., 1979; Rueda, 2004) et les recommandations du Walter Reed institute (Walter Reed Biosystematic Unit). L'ensemble des manipulations a été réalisé en conditions stériles selon les protocoles d'extraction décrits dans le chapitre 3.3.

Amplification et analyse des marqueurs microsatellites et mitochondriaux

Les marqueurs microsatellites AealbA9, AealbB51, AealbB52, AEDC, Alb-di6, Alb-tri3, Alb-tri18, Alb-tri25, Alb-tri41, Alb-tri45 and Alb-tri6 ont été amplifiés puis analysés en suivant le protocole précédement décrit (voir chapitre 4.3.). Les gènes de la cytochrome oxydase

sous unité 1 (*COI*) et de la NADH déshydrogénase sous unité 5 (*ND5*) ont été amplifiés par PCR, en utilisant les couples d'amorces repectifs : CI-J-1632 (5'-TGATCAAATTTATAAT-3') CI-N-2191 (5'-GGTAAAATTAAAATATAAACTTC-3') (Kambhampati et al., 1991) et ND5FOR (5'-TCCTTAGAATAAAATCCCGC-3'), ND5REV (5'-GTTTCTGCTTTAGTT-CATTCTTC-3') (Birungi and Munstermann, 2002). Les protocoles d'amplification ont été réalisés avec 45 ng d'ADN comme précédemment décrit (Raharimalala et al., 2012). Les produits d'amplification ont été séquencés (Biofidal, France) puis les séquences ont été alignées à l'aide du logiciel Seaview v.4.5.2. (Gouy et al., 2010) et du programme MUSCLE (Edgar, 2004). La vraissemblance du modèle d'évolution des séquences *COI* et *ND5* a été sélectionée à partir du critère d'information d'Akaike (AIC) et du critère d'information Bayesien (BIC), tous deux obtenus après analyse de l'alignement avec le logiciel jModelTest2. Les analyses phylogénétiques ont été réalisées avec le logiciel MrBayes v.3.2. Un total de 3 chaines de Markov (MCMC) a été lancé avec 5 000 000 générations et un échantillonnage toutes les 500 générations. Au final, 1 750 000 arbres ont été retirés de l'analyse pour l'étape d'allumage et les 3 250 000 arbres restants ont été utilisés pour estimer l'arbre consensus et les probabilités postérieures. La convergence a été vérifiée grâce au *Potential Scale Reduction Factor* (PSRF). Des séquences de différentes espèces du genre *Aedes* ont été utilisées pour l'analyse comparative. Pour les séquences *COI,* il s'agit des espèces *Ae. flavopictus* (Miyarai) (gi474421143, gi474420545, gi474421139), *Ae. flavopictus* (downsi) (gi474421296), *Ae. cretinus* (gi444435802, gi444435804, gi444435806), *Ae. lineatopennis* (gi474420638), *Ae. aegypti* (gi347515169, gi347515179), *Ae. vexans* (gi292397385, gi292397375), *Ae. pseudalbopictus* (gi409968743) et *Ae. subalbopictus* (gi169667481). Pour les séquences ND5, il s'agit des espèces *Ae. vexans* (gi291193176, gi91193188), *Ae. detritus* (gi657638622, gi657638611), *Ae. notoscriptus* (gi508599960, gi508599844), *Ae. koreicus* (gi625295125, gi625295131) et *Ae. aegypti* (gi66351522, gi66351530).

Analyse du microbiote bactérien intestinal et détection de Wolbachia *par PCR* et *PCR en temps réel*

Le microbiote intestinal du moustique a été analysé par amplification de la région V5-V6 du gène *rrs* suivi du séquençage haut débit des séquences par la technologie MiSeq d'Illumina. Les conditions d'amplification et le traitement des données de séquençage ont été réalisés selon le protocole décrit dans le chapitre 4.2. La détection des bactéries *Wolbachia* *w*AlbA et *w*AlbB a été réalisée par PCR en temps réel, en triplicats, sur l'ADN de 52 individus ayant également servi de matrice pour l'amplification du gène COI. Ces PCR ont été réalisées sur le gène *wsp* avec des amorces spécifiques de chacune des souches *w*AlbA et *wsp* *w*AlbB, et le gène *actin* de l'hôte selon le protocole décrit par Zouache et collaborateurs

(2011). Les PCR en temps réel ont été réalisées sur un thermocycleur LightCycler LC480 (Roche, Suisse) et une gamme interne de dilution en série (de 10^1 à 10^8) du plasmide pQuantAlb (Tortosa et al., 2008). Lorsqu'une différence inférieure à 1 cycle était observée, et qu'aucun produit n'était visible après dépôt sur gel, les produits ont été considérés comme étant négatifs. Les amplifications PCR classique du gène *wsp* ont été réalisées avec les amorces 81F (TGGTCCAATAAGTGTATGAAGAAAC) et 691R (AAAGGGGACTGATGATGT), comme précédement décrit (Braig et al., 1998; Zouache et al., 2009). Les PCR et PCR en temps réel ont ensuite été déposées sur gel d'Agarose 2% marqué au bromure d'éthidium pour confirmer la présence ou l'absence de produit d'amplification.

4.5.3. Résultats et discussion

L'analyse des séquences des gènes *COI* des individus de BGM a mis en évidence 5 haplotypes différents notés H_1, H_3 et HC_BGM5, HC_BGM22, HC_BGM12. Tous ces haplotypes ont montré plus de 99% de similarité avec des séquences annotées *Ae. albopictus* au sein de la base de données non redondante du ncbi. Les analyses phylogénétiques réalisées à partir des séquences COI des individus de BGM ont montré que les haplotypes H_1 et H_3 formaient un groupe paraphylétique avec HC_BGM5, HC_BGM22 et HC_BGM12 (Figure 26a). HC_BGM5, HC_BGM22, HC_BGM12 ont été pour leurs parts regroupés avec la séquence gi340050926 identifiée comme appartenant à l'espèce *Ae. albopictus* ainsi qu'une séquence annotée *Ae. subalbopictus* et une séquence annotée *Ae. pseudalbopictus* (Figure 26a). Ces deux espèces appartiennent au sous groupe *albopictus* pour lequel les caractéristiques morphologiques ne permettent pas une distinction aisée des espèces au stade adulte (Hawley, 1988). Or, des travaux antérieurs ont déjà reporté que les trois espèces *Ae. albopictus, Ae. subalbopictus* et *Ae. pseudalbopictus* vivaient en sympatrie en Asie du Sud et de l'Est (Huang, 1972, 1979). Leur regroupement au sein du sous groupe *albopictus* pourrait alors s'expliquer soit par une mauvaise identification morphologique des espèces ou une mauvaise assignation taxonomique du barcode *COI,* soit par une introgression mitochondriale entre les différentes espèces. Cependant, aucun des 11 marqueurs microsatellites précédemment utilisés pour génotyper les moustiques *Ae. albopictus* n'a permis l'amplification des 11 échantillons présentant les haplotypes HC_BGM5, HC_BGM22, HC_BGM12. Cette absence d'amplification pourrait être dûe à l'absence de séquences conservées permettant l'amplification des régions microsatellites. Ces résultats indiquaient que ces individus divergaient non seulement au niveau de leur matériel génétique mitochondrial mais également nucléaire. Dans ce contexte, l'hypothèse d'une introgression récente reste peu probable et ces individus appartiendraient plutôt à une

espèce différente d'*Ae*. *albopictus* dont les femelles seraient morphologiquement identiques entre elles. Pour confirmer l'hypothèse d'une divergence chromosomique, des analyses actuellement en cours visent à amplifier, cloner et séquencer les régions intergéniques ribosomales (*ITS1* et *ITS2*) (Patsoula et al., 2006; Hill et al., 2008; Shaikevich and Talbalaghi, 2013). Des techniques d'étude de SNP (Single Nucleotide Polymorphisms) non ciblées comme le séquençage haut débit de sites de restriction enzymatiques (marqueurs RAD – Restriction site Associated DNA) pourront également être utilisées pour étudier les divergences chromosomiques des échantillons (Miller et al., 2007; Baird et al., 2008). Pour la suite des travaux portant sur l'analyse du microbiote, les individus ont été considérés comme appartenant à une espèce cryptique indéterminée du fait du regroupement des séquences *COI* avec des séquences assignées à trois espèces différentes.

Aucune amplification ni des gènes *wsp* des clades *w*AlbA et *w*AlbB ni du gène wsp généraliste n'a été obtenue pour tous les individus de l'espèce cryptique. La diversité bactérienne du tube digestif de deux échantillons de l'espèce cryptique, dont la divergence avait été préalablement confirmée par l'étude de leurs marqueurs *COI*, a été analysée par Méta-taxogénomique, parallèlement à l'analyse de diversité de 30 individus issus des six autres sites précédemment étudiés (voir chapitre 4.3.) et celle de 3 individus du site de BGM associés à l'haplotype *COI* H_1 (Figure 26). Pour tous les échantillons, la divergence des haplotypes mitochondriaux a également été confirmée par amplification et séquençage du gène ND5. La même structure a été observée pour les deux échantillons divergents, qui ont finalement été associés à l'haplotype Hn_c_4 (Figure 26b). Aucune congruence n'a cependant été notée entre la phylogénie des haplotypes mitochondriaux et la structure des communautés bactériennes (Figures 27 et 28). De façon intéressante, le phylotype *Dysgonomonas* a été détecté au sein de deux échantillons de l'espèce cryptique. Cette bactérie ayant déjà été identifiée comme prévalente et abondante dans les populations d'*Ae. albopictus* de Madagascar, de France et du Vietnam (voir chapitres 3.4.2 et 4.3), sa présence dans le tube digestif d'une espèce proche renforce donc l'hypothèse d'une interaction forte au sein de l'intestin moyen des moustiques. Nos résultats précédents n'ayant pas montré une structure du microbiote « site dépendant » au sein de l'intestin moyen d'*Ae. albopictus*, il est donc peu probable que la structuration observée soit le résultat d'un effet site. Des études basées sur la transplantation du microbiote entre des espèces très divergentes (poisson – souris) ont démontré que l'assemblage des communautés microbiennes intestinales était soumise à des pressions de sélection largement déterminées par l'espèce hôte considérée (Rawls et al., 2006). Il existerait donc un lien étroit entre divergence génétique, spéciation et divergence de structuration du microbiote comme en témoignent les études réalisées chez certaines espèces de vertébrés (Ochman et al., 2010) et d'invertébrés notamment les guêpes du genre *Nasonia* (Brucker and Bordenstein, 2012)

ou encore les termites (Hongoh et al., 2005). Cependant, la divergence génétique entre l'espèce cryptique et *Ae. albopictus* étant probablement récente à la lumière des analyses phylogénétiques des barcodes considérés, il est possible que celle-ci ne soit pas suffisante pour modifier les facteurs de sélection opérant sur le microbiote bactérien intestinal. De plus, Osei-Poku et collaborateurs (Osei-Poku et al., 2012) avaient précédement démontré que les divergences de communautés microbiennes entre espèces de moustiques échantillonnées sur le terrain pouvaient être plus faibles que les divergences intra-espèces, suggérant ainsi la possibilité d'un core microbien variant en fonction de facteurs individuels. Nous avons démontré que *Wolbachia* était absente de cette espèce alors qu'elle est associée, de façon systématique, à *Ae. albopictus*. Cette bactérie est transmise verticalement de mère à descendants, de même que les mitochondries qu'elle peut transporter avec elle lors d'évènements d'introgression entre hybrides (Hurst and Jiggins, 2005). Il serait alors possible que les croisements inter-espèces conduisent à la transmission de *Wolbachia* et de variants mitochondriaux associés par un tel phénomène. Cependant, comme décrit précédemment, l'espèce cryptique et *Ae. albopictus* ont subi une probable divergence génétique nucléaire révélée par l'absence d'amplification d'allèles microsatellites spécifiques à *Ae. albopictus* chez l'espèce cryptique. Dans ce contexte, la population identifiée serait bien une espèce cryptique et pourrait être protégée de toute introgression par un isolement reproductif. Il est alors très fortement probable que l'arrivée de *Wolbachia* chez *Ae. albopictus* soit postérieure à la séparation des deux espèces.

Tableau 5. Haplotypes et proportion d'infection par *Wolbachia*

	BGM		Autres sites
	Ae. albopictus	**espèce cryptique**	***Ae. albopictus***
COI	17	11	68
ND5	3	2	30
Meta-taxogénomique	3	2	30
wspA	12(12)	0(11)	60(60)
wspB	12(12)	0(11)	60(60)
wsp	2(2)	0(9)	NA

Le nombre d'individus pour lesquels les gènes COI ou ND5 ont été analysés sont notés pour chaque catégorie d'échantillons de même que le nombre d'individus pour lesquels des analyses de diversité bactérienne des intestins ont été menées (Méta-taxogénomique). Les résultats positifs pour la détection de *Wolbachia* ont été reportés pour l'amplification des gènes *wsp* avec amorces généralistes (wsp) ou ciblant les clades *w*AlbA (*wspA*) et *w*AlbB (*wspB*). Le nombre d'individus testés est indiqué entre parenthèses.

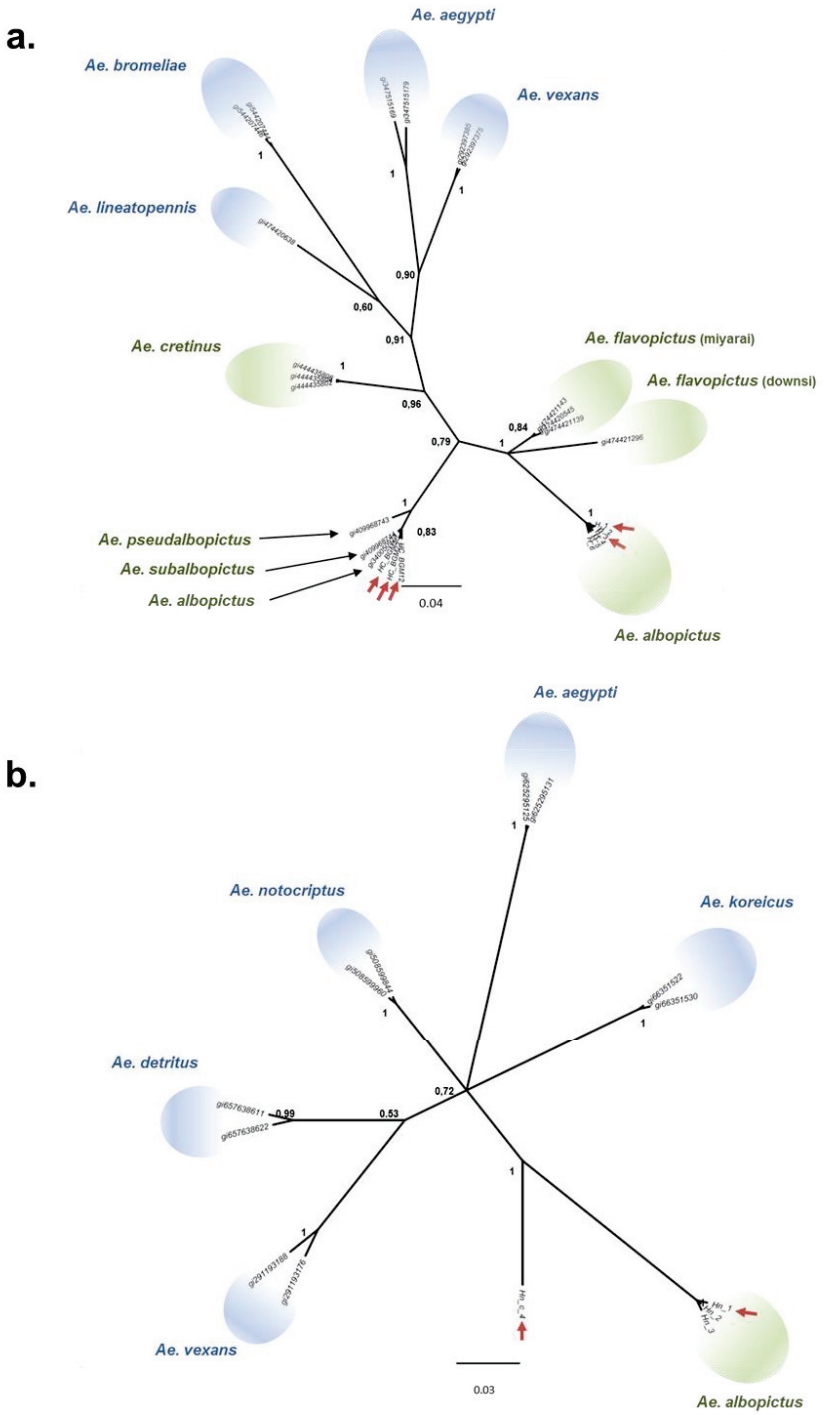


Figure 26. Phylogénie des différentes espèces d'*Aedes* basée sur les haplotypes mitochondriaux. Les séquences des gènes *COI,* (a) associées à un modèle de substitutions GTR+I+G et *ND5,* (b) associées à un modèle de substitutions HKY+I+G, ont été utilisées lors de l'analyses bayésienne. Les probabilités postérieures ont été reportées sur les nœuds. Les séquences obtenues lors de cette étude sont marquées par des flèches rouges. Les haplotypes *COI* H_2, H_4, H_5, H_6 et *ND5* Hn2 et Hn3, proviennent d'*Ae. albopictus* issus de sites différents en France et au Vietnam. Les espèces membres du « sous-groupe *Ae. albopictus* » sont entourées en vert. Les autres espèces du genre *Aedes* sont entourées en bleu.

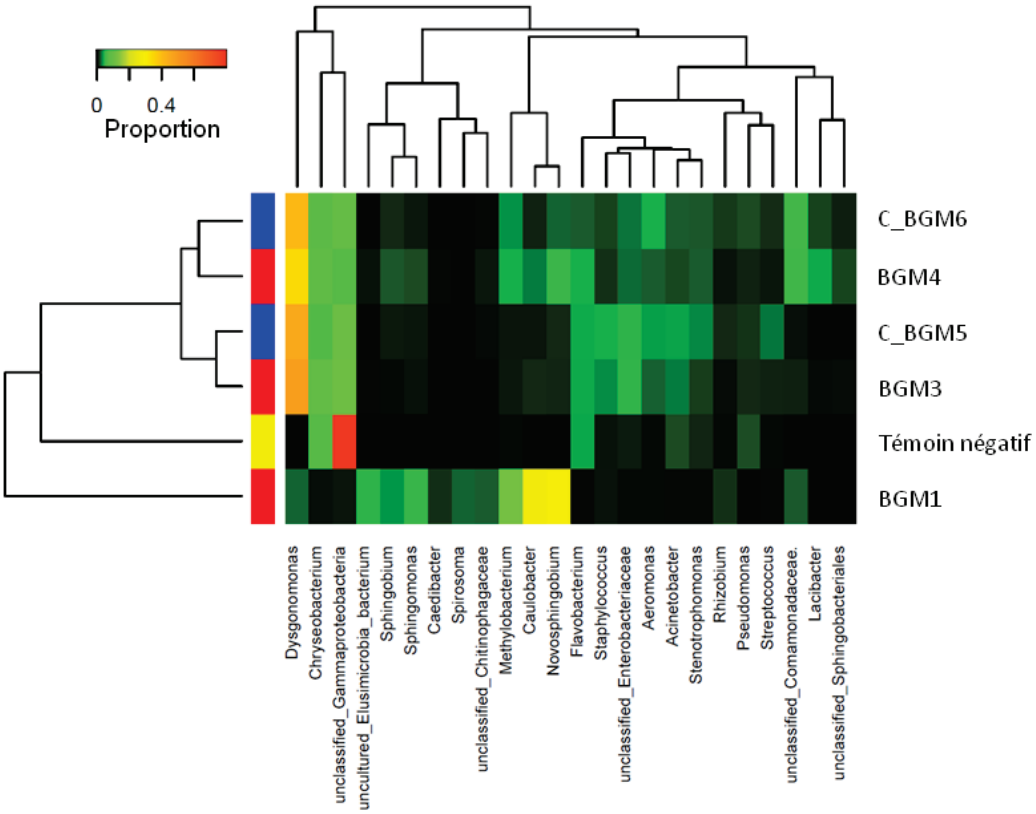


Figure 27. Abondance relative des différents phylotypes bactériens. Les colonnes représentent les différents phylotypes bactériens. Les lignes représentent les différentes classes d'échantillons d'intestins moyens. L'échelle latérale gauche représente les échantillons de moustique *Ae. albopictus* de Bù Gia Mập (rouge), de l'espèce cryptique de Bù Gia Mập (bleu) et le témoin négatif (jaune). Les cases d'intersection entre les colonnes et les lignes correspondent à l'abondance relative des différents phylotypes bactériens au sein des échantillons. Leurs valeurs correspondent à l'échelle de couleur. Seuls les phylotypes retrouvés à une abondance d'au moins 0,01 dans l'un des échantillons ont été représentés.

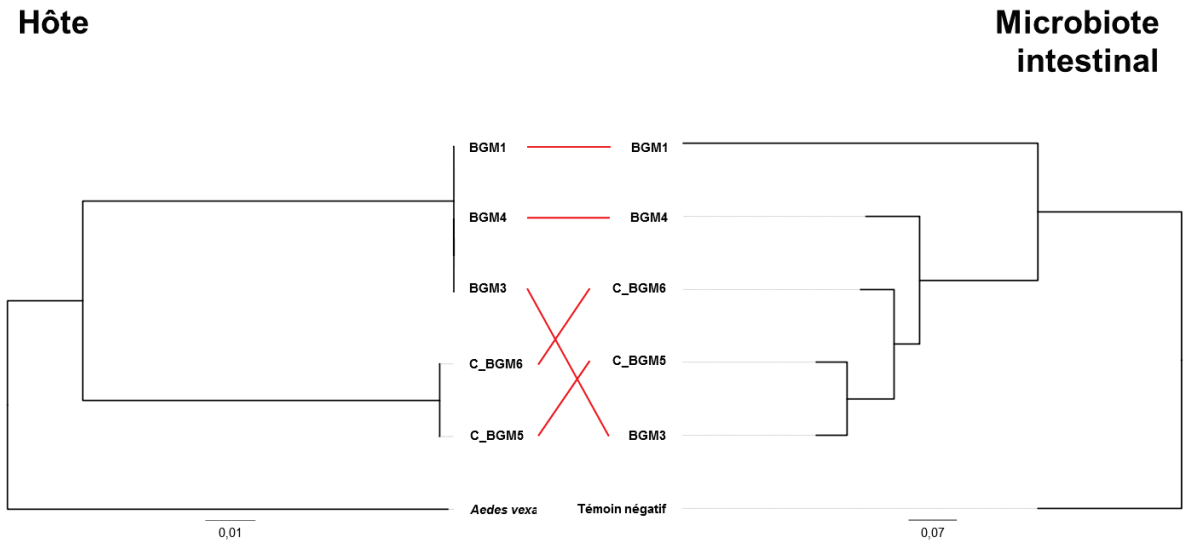


Figure 28. Comparaison entre la phylogénie de l'hôte et ses communautés bactériennes intestinales. Trois échantillons *d'Ae. albopictus* (BGM1, BGM3, BGM4) et deux échantillons de l'espèce cryptique (C_BGM5, C_BGM6) ont été analysés. *Pour* l'hôte, les séquences amplifiées des gènes mitochondriaux *COI* associées à un modèle de substitutions GTR+I+G ont été représentées par un arbre phylogénétique avec une sequence d'*Ae. vexans* comme groupe externe. Pour le microbiote intestinal, les distances de dissimilarité de Bray-Curtis ont été représentées par un arbre calculé par la méthode de *Neighbor-joining* en prenant le le témoin négatif comme groupe externe. Les lignes rouges relient les analyses de *COI* et du microbiote bactérien intestinal pour un même échantillon.

4.5.4. Conclusion

En conclusion, cette étude nous a permis de détecter une espèce cryptique proche d'*Ae. albopictus* vivant en sympatrie au sein de la réserve naturelle de Bù Gia Mập. Le microbiote bactérien intestinal s'est révélé relativement similaire entre les deux espèces présentant cependant un statut différent d'infection à *Wolbachia.* Ces résultats suggèrent l'existence de fortes pressions de sélection pouvant s'opérer sur le microbiote intestinal des moustiques, assurant ainsi son maintien chez des espèces proches et ce, malgrè des divergences au niveau génétique et du statut d'infection à *Wolbachia.* Des approches globales portées sur différentes espèces de moustiques pourraient nous aider à mieux comprendre l'histoire évolutive de l'assemblage du microbiote intestinal des *Culicidae* et ainsi améliorer notre connaissance du rôle du microbiote dans l'adaption des populations hôtes et l'interaction avec les pathogènes transmis.

Discussion générale

A la faveur d'une plasticité écologique exceptionnelle (colonisation d'écosystèmes ruraux et périurbains, compétitivité, diapause hivernale) et de l'accentuation des échanges internationaux, le moustique tigre *Aedes albopictus* a très largement étendu son aire de répartition mondiale depuis ces 150 dernières années (Bonizzoni et al., 2013). Plus inquiétant encore, ce moustique est capable de transmettre de nombreux agents pathogènes viraux et parasitaires. La découverte récente de cas autochtones de transmissions infectieuses dans des régions jusque-là épargnées associée au potentiel invasif de ce moustique et les difficultés rencontrées dans la mise en place d'une lutte antivectorielle efficace accentuent les risques épidémiques liés à la présence d'*Ae. albopictus* (Paupy et al., 2009). Bien que l'environnement semble jouer un rôle important, l'adaptation d'une population introduite dans un milieu repose souvent sur une base génétique. Dans le cas d'*Ae. albopictus*, il est avéré que la diapause hivernale participe à son adaptation au milieu tempéré. Cependant, d'autres facteurs, intrinsèques pourraient également expliquer son caractère adaptatif. En effet, tous les organismes eucaryotes supérieurs hébergent un ensemble de communautés microbiennes avec lesquelles ils interagissent. C'est le cas de l'homme dont le microbiote est composé de 14 trillons de cellules (Whitman et al., 1998) et contient 150 fois plus de gènes que l'hôte *per se* (Qin et al., 2010). Son microbiote joue un rôle fondamental dans l'homéostasie physiologique du tube digestif (e.g. une dysbiose impliquant des modifications d'abondance relative de différentes espèces de *Bacteroides* serait impliquée dans la maladie de Crohn) (Dicksved et al., 2008). Les insectes, hébergent également de nombreux microorganismes ou microbiote dont le nombre excède celui de leurs propres cellules (Dillon and Dillon, 2004). Il est maintenant admis que les communautés bactériennes des insectes jouent un rôle important dans des fonctions clés de la biologie de leur hôte (Dillon and Dillon, 2004; Feldhaar, 2011; Engel and Moran, 2013). En se basant sur l'ensemble de ces observations, il est donc important de considérer le microbiote comme l'un des acteurs majeurs du pathosystème vectoriel afin de développer une vue intégrée de l'holobionte vecteur. D'un point de vue appliqué, l'amélioration des connaissances dans ce domaine pourrait offrir de nouvelles pistes de recherche dans la lutte contre les insectes vecteurs et l'interférence microbienne sur les pathogènes transmis. Au cours de ces travaux de thèse, nous nous sommes tout d'abord intéressés au cas particulier de symbiotes cultivables d'*Ae. albopictus*, puis nous avons bénéficié du développement des techniques de séquençage haut débit pour accéder à une profondeur jamais égalée dans la description de la diversité du microbiote bactérien associé au moustique tigre. Ces travaux font écho aux lacunes dans nos connaissances actuelles sur ce sujet et contribuent à les combler en utilisant de nouvelles approches pour mieux appréhender la biologie d'*Ae. albopictus* et de ses symbiotes. Nous discuterons, à travers différents volets, les résultats majeurs de notre étude et les perspectives qui en découlent. Le premier volet sera centré sur

Wolbachia, la bactérie la plus étudiée chez les moustiques, et pour laquelle notre étude a apporté de nouveaux éléments sur sa représentativité au sein du microbiote. Le deuxième volet sera consacré aux symbiotes secondaires du moustique tigre pour lesquels nos travaux ont mis en avant de nouvelles hypothèses quant à leur rôle dans la biologie du moustique. Enfin, le dernier volet portera sur une discussion de nos résultats concernant le microbiote du moustique tigre dans son ensemble et les facteurs influençant sa dynamique, ainsi que les développements futurs.

Wolbachia: écologie d'un endosymbiote dominant chez _Ae. albopictus_.

La bactérie *Wolbachia* est un endosymbiote très répandu chez les arthropodes avec plus de 40% des espèces infectées (John H. Werren et al., 2008; Zug and Hammerstein, 2012). Chez les moustiques (Diptera : *Culicidae*), elle infecterait au moins 185 des 3 500 espèces décrites (Bourtzis et al., 2014). Elle a notamment été retrouvée au sein de populations naturelles vectrices de pathogènes humains tels que certaines espèces du complexe *Culex pipiens* (Yen and Barr, 1973), *Aedes polynesiensis* (Wright and Barr, 1981)*, Ae. albopictus* et plus récemment *Anopheles gambiae* (Baldini et al., 2014). Comme nous l'avons évoqué, elle est transmise de la mère à sa descendance et induit un phénotype d'incompatibilité cytoplasmique (IC) chez le moustique tigre visant à favoriser sa transmission verticale (Dobson et al., 2002). Elle assure ainsi son maintien au sein des populations en réduisant le nombre de descendants viables lors du croisement entre un mâle infecté et une femelle non infectée (IC unidirectionnelle) ou infectée par un clade incompatible (IC bidirectionnelle). Le phénomène est d'autant plus complexe que le moustique tigre peut être superinfecté, simultanément, par deux souches de *Wolbachia* nommées *w*AlbA et *w*AlbB, appartenant respectivement aux clades A et B. Ainsi, du fait de l'incompatibilité cytoplasmique, les femelles non infectées ou monoinfectées ne produiront pas de descendance viable si elles se croisent avec des mâles bi-infectés. Les femelles bi-infectées, pour leur part, produiront une descendance viable après croisement avec un mâle quel que soit son statut d'infection (Tableau 6). L'avantage sélectif des femelles superinfectées pour la reproduction peut donc expliquer à lui seul leur forte prévalence au sein des populations (Werren et al., 1995; Kittayapong et al., 2002b; de Albuquerque et al., 2011; Zouache et al., 2011). Nos travaux ne font pas exception puisque toutes les femelles issues des différentes populations étudiées (Madagascar, France, Vietnam) ont montré une superinfection par les deux clades. Cependant, notre étude a permis de révéler, pour la première fois, la forte représentativité, en proportion, de *Wolbachia* au sein du microbiote bactérien des femelles. L'abondance relative de cet endosymbiote pouvait dépasser 99% avec une densité de plus de 20 copies par cellule pour *w*AlbB et 3 copies par cellule pour *w*AlbA. Une étude publiée récemment chez la mouche tsé-tsé, vectrice de parasites du genre *Trypanosoma*, agent étiologique de

la maladie du sommeil, a montré des résultats similaires avec une prédominance significative de l'entérobactérie *Wigglesworthia*, un symbiote mutualiste obligatoire (Aksoy et al., 2014). L'origine des fortes densités de *Wolbachia* pourrait être liée au taux de transmission et à l'efficacité de l'incompatibilité cytoplasmique qu'elle induit. Ainsi, pour une transmission optimale, il serait préférable que les deux souches soient prévalentes et abondantes chez les femelles hôtes. Ces résultats contrastent avec ceux retrouvés chez les mâles qui présentent des densités de *Wolbachia* beaucoup plus variables (Zouache et al., 2009, 2011; Tortosa et al., 2010). Ceci est probablement dû au fait que les mâles ne transmettent pas le symbiote aux descendants et constituent donc un cul de sac évolutif pour celui-ci. Toutes ces observations seraient donc en faveur d'une sélection, chez *Ae. albopictus*, de souches de *Wolbachia* prévalentes, en densité élevée et en co-infection. Cependant, le maintien de symbiotes à de telles densités pourrait également entraîner un coût pour les individus infectés (recrutement de la machinerie cellulaire et des métabolites …). Si tel était le cas, alors il est probable que le taux de reproduction et/ou la survie des femelles en seraient affectés ce qui aurait pour effet, en retour, de limiter la transmission verticale et le maintien de la bactérie. Plusieurs hypothèses pourraient expliquer le maintien de *Wolbachia* en forte densité et sa régulation par *Ae. albopictus*. Tout d'abord, il est envisageable que *Wolbachia* puisse compenser son coût en augmentant la valeur sélective de son hôte. Les deux partenaires seraient alors impliqués dans une interaction à bénéfice réciproque. De telles assertions pourraient expliquer les observations faites en laboratoire qui tendent à démontrer que les femelles *Ae. albopictus* superinfectées survivraient plus longtemps que les femelles non infectées, et que le taux d'éclosion de leurs œufs serait supérieur (Dobson et al., 2002; S. L. Dobson et al., 2004). Cette différence n'est cependant pas généralisable à toutes les populations de moustique tigre (Mains et al., 2013). Par ailleurs, *Wolbachia* pourrait également être engagée dans des interactions mutualistes, comme cela a déjà été observé chez certains modèles d'insectes. Par exemple, *Wolbachia* participerait à la régulation du métabolisme du fer chez *Drosophila melanogaster,* en condition de carence ou d'excès (Brownlie et al., 2009). Des études menées chez la guêpe parasitoïde *Asobara tabida* naturellement infectée par *Wolbachia* et une lignée cellulaire de moustique *Ae. aegypti* artificiellement infectée par *Wolbachia w*Mel ont démontré que la concentration en fer au sein des cellules-hôtes était directement régulée par le recrutement de bactérioferritines (protéines stockant le fer sous une forme non toxique) de *Wolbachia*, limitant ainsi un stress oxydatif pouvant déclencher leur apoptose (Kremer et al., 2009). Néanmoins, le fer ne bénéficierait pas à la bactérie. D'autres exemples de mutualisme nutritionnel médié par *Wolbachia* ont été décrits chez des modèles comme la punaise des lits, *Cimex lectularius*, qui bénéficierait de l'approvisionnement en vitamine B par *Wolbachia w*Cle (Hosokawa et al., 2009; Nikoh et al., 2014) ou encore le nématode *Brugia malayi* qui

bénéficierait de l'apport de nombreux métabolites (FAD-Flavine Adénine Dinucléotide, Vitamine B_2, nucléotides, hème) de la part de *Wolbachia* *w*Bm pour compléter son cycle de développement et de reproduction (Foster et al., 2005). Un autre exemple de mutualisme concerne la protection contre les pathogènes. En effet, chez les drosophiles, *Wolbachia* est également connue pour interférer avec les cycles de réplication de virus entomopathogènes, comme par exemple le Drosophila C Virus ou le Flock House Virus (Lauren M. Hedges et al., 2008; Teixeira et al., 2008) et il a été montré que ce phénotype d'interférence était positivement corrélé à la densité des clades de *Wolbachia* (Martinez et al., 2014). Une fois encore, ces observations argumentent l'hypothèse d'une sélection par l'hôte de clades présentant une densité importante. Enfin, l'hôte *per se* pourrait intervenir dans le contrôle du symbiote. En effet, des études réalisées sur lignées cellulaires d'*Ae. albopictus* ont montré que l'autophagie (digestion des organelles cellulaires par les lysosomes visant à réguler l'homéostasie cellulaire) pouvait jouer un rôle important dans la régulation de la densité bactérienne (Voronin et al., 2012).

Tableau 6. Pattern d'incompatibilité cytoplasmique bidirectionnelle dans un contexte de superinfections.

	Male			
Female	AB	A	B	O
AB	+	+	+	+
A	-	+	-	+
B	-	-	+	+
O	-	-	-	+

Ce tableau illustre l'incompatibilité cytoplasmique (-) ou la compatibilité cytoplasmique (+) résultant de croisements entre individus non infectés (O), mono-infectés (A ou B), et superinfectés (AB). L'incompatibilité cytoplasmique se produira lorsque le mâle présentera un profil d'infection qui n'est pas retrouvé chez la femelle.

Indépendamment des hypothèses précédentes, il semble fort probable que des mécanismes de régulation communs impactent les densités de *Wolbachia* *w*AlbA et *w*AlbB. Cette hypothèse est appuyée par la forte corrélation de ces deux clades observée au sein des populations étudiées (France, Vietnam, Madagascar). Une telle corrélation avait déjà été observée sur des populations de laboratoire (Tortosa et al., 2008). Par ailleurs, des travaux antérieurs font état de nombreux facteurs exogènes pouvant être à l'origine des variations de densité de *Wolbachia* au sein de son hôte, comme par exemple, l'âge du moustique en interaction avec la population et le sexe, les températures élevées ou encore la densité de larves dans les gîtes (Wiwatanaratanabutr and Kittayapong, 2009; Tortosa et al., 2010). De plus, nous avons noté une plus faible densité de la souche *w*AlbA comparée à la souche *w*AlbB chez les femelles, confirmant ainsi des observations antérieures (Zouache et al., 2009; Tortosa et al., 2010). Ce résultat pourrait s'expliquer par des différences au niveau de leur croissance, de leur sensibilité envers les mécanismes de régulation, mais également au niveau de la densité de bactéries sélectionnées pour induire une incompatibilité et / ou une transmission efficaces. D'autre part, il est probable que l'infection d'*Ae. albopictus* par la souche *w*AlbA soit plus ancienne que celle par la souche *w*AlbB. En effet, des moustiques *Ae. albopictus* issus de populations isolées avant 1970 sur l'île Maurice et l'île de Koh Samui en Thaïlande se sont avérées être mono-infectées par *w*AlbA (Sinkins et al., 1995). Cette dernière pourrait donc avoir envahi les populations de moustique en premier, et le contrôle de sa densité serait alors le résultat d'une co-évolution plus ancienne avec son hôte.

Au cours de ces travaux, nous avons découvert une espèce cryptique appartenant au « sous-groupe *Aedes albopictus* ». Il convient de souligner que nous n'avons pas détecté de *Wolbachia* au sein de cette espèce, ce qui pourrait signifier que l'infection des deux clades de *Wolbachia* serait un évènement postérieur à la séparation entre l'espèce *Ae. albopictus stricto sensu* et cette espèce cryptique, ou bien encore que le statut d'infection a été perdue par cette dernière. Une étude récente a révélé la présence d'un clade non identifié de *Wolbachia* chez l'espèce *Ae. pseudoalbopictus* (Wiwatanaratanabutr and Kittayapong, 2009). A notre connaissance, il s'agit du seul exemple décrivant la présence de *Wolbachia* au sein d'une espèce appartenant au « sous-groupe *Ae. albopictus* ». Il est donc probable que contrairement à ce qui a été observé chez le complexe *Culex pipiens* (Atyame et al., 2011), l'infection d'*Ae. albopictus* par les deux souches de *Wolbachia* *w*AlbA et *w*AlbB soit un événement récent apparu après sa spéciation. De plus, ces résultats sont soutenus par la très faible diversité mitochondriale mise en évidence au sein de l'espèce cryptique identifiée lors de nos travaux mais également observée pour d'autres populations éloignées d'*Ae. albopictus* (Armbruster, W. E. Damsky, et al., 2003). En effet, *Wolbachia* est connue pour induire un balayage sélectif sur les mitochondries, diminuant ainsi leur diversité (sélection de variants mitochondriaux associés aux individus initialement envahis par la bactérie

endosymbiotique) (Hurst and Jiggins, 2005). Ce phénomène se traduit généralement par une réduction de la diversité des haplotypes et / ou la sélection de variants rares, successifs à l'invasion de la bactérie au sein de la population. Le balayage sélectif aura donc le même impact qu'un goulot d'étranglement ou qu'un effet fondateur sur les mitochondries. C'est d'ailleurs en partie pour cette raison qu'il n'est pas recommandé d'utiliser les haplotypes mitochondriaux comme marqueurs génétiques pour les études de biogéographie chez certains insectes, car leur histoire évolutive peut être plus fortement liée à celle de *Wolbachia*.

***Acinetobacter*, *Asaia*, et *Dysgonomonas* : de nouvelles pistes d'investigation**

Lors de nos travaux, nous avons combiné les approches culture-dépendant et culture-indépendant et montré, en plus de *Wolbachia*, que le genre *Acinetobacter* était très prévalent dans les populations naturelles d'*Ae. albopictus* (~74% d'individus infectés sur l'île de Madagascar). Une prévalence similaire a également été enregistrée chez les populations de laboratoire (~70% d'individus infectés). Par ailleurs, les analyses de diversité bactérienne par séquençage haut débit ont également mis en évidence la bactérie *Acinetobacter* dans les échantillons du témoin négatif. Bien que surprenant, il convient de signaler que cette bactérie ubiquiste est souvent associée comme contaminant des réactifs de biologie moléculaire (Doughari et al., 2011; Salter et al., 2014). Cependant, l'isolement de souches bactériennes à partir d'individus d'*Ae. albopictus* ayant subi une désinfection de surface (Zouache et al., 2009; Minard et al., 2013) et leur localisation par marquage FISH au sein de différents organes (Zouache et al., 2009) sont autant d'arguments qui nous confortent dans l'idée que cette bactérie pourrait être un symbiote du moustique tigre. De plus, nous avons également montré que les isolats d'*Acinetobacter* de moustique présentaient certaines capacités métaboliques différentes de celles des souches de même espèce issues d'autres environnements (homme, sol, eau…). Malgré une hétérogénéité avérée des espèces et de leur structure génomique globale, il est donc envisageable que les souches associées à *Ae. albopictus* aient acquis des déterminants génétiques favorisant leur adaptation aux insectes. Cette hypothèse est notamment soutenue par la détection de cette bactérie au sein de différentes espèces d'insectes dont la mouche blanche *Bemisia tabacci* (Singh et al., 2012), la noctuelle de la tomate *Helicoverpa armigera* (Gayatri Priya et al., 2012; Malhotra et al., 2012) mais également chez des insectes hématophages comme la mouche charbonneuse *Stomoxys calcitrans* (Lysyk et al., 1999), différentes espèces de glossines (Geiger et al., 2009, 2011) ou encore le poux *Pediculus humanus humanus* (La Scola and Raoult, 2004; Kempf et al., 2012). L'interaction la mieux décrite concerne la mouche charbonneuse qui est dépendante de l'acquisition d'*Acinetobacter* au cours de son stade larvaire pour poursuivre son développement (Lysyk et al., 1999). Il a également été démontré la présence d'une

activité estérasique participant à la dégradation d'insecticides comme la cypermethrine, chez une souche d'*Acinetobacter* isolée de la noctuelle de la tomate (Malhotra et al., 2012). Ce genre bactérien étant par ailleurs associé à de nombreuses activités de dégradation d'autres composés xénobiotiques (Lal and Khanna, 1996), une fonction de détoxification médiée par la bactérie, pourrait alors être envisagée chez *Ae. albopictus*. Cette hypothèse semble d'autant plus vraisemblable que ce moustique, à la différence de certaines espèces, a la capacité de coloniser des zones polluées contribuant ainsi à étendre son aire de répartition. L'étude du génome initiée avec le séquençage d'isolats de moustique (Annexe 2) pourrait nous fournir de nouveaux éléments sur les traits fonctionnels bactériens potentiellement impliqués dans l'adaptation à leur hôte moustique. Enfin, nos travaux ont également mis en évidence une plus forte prévalence d'*Acinetobacter* chez les individus mâles. Ce résultat pourrait s'expliquer par les différences écologiques et métaboliques entre les deux sexes (e.g. les mâles se nourrissent uniquement d'hydrates de carbone d'origine végétale tandis que les femelles ont également besoin de sang pour l'accomplissement de l'ovogenèse). D'une façon générale, ces résultats méritent d'être poursuivis afin de mieux comprendre les modalités d'association d'*Acinetobacter* avec *Ae. albopictus*. Plus précisément, il serait intéressant de déterminer son mode d'acquisition, sa capacité à se maintenir dans les populations et son impact sur les traits d'histoire de vie du moustique.

La bactérie *Asaia* appartient au groupe fonctionnel des AAB (Acid Acetic Bacteria), qui comprend l'ensemble des bactéries capables de métaboliser l'éthanol en acide acétique (Yamada et al., 2000; Crotti et al., 2010). Elle a déjà été identifiée chez différentes espèces de moustiques incluant *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti, Cx. quinquefasciatus* et différentes espèces d'*Anopheles* (Chouaia et al., 2010; Gusmão et al., 2010; Zouache et al., 2011; Boissière et al., 2012; Osei-Poku et al., 2012; Ramirez et al., 2012). L'étude récente du génome d'*Asaia* isolée de moustiques *Anopheles stephensi* et des génomes d'autres membres du groupe des AAB symbiotes ou non d'insectes a révélé l'acquisition d'oxydases terminales à forte affinité pour l'oxygène chez tous les membres de ce groupe (Chouaia et al., 2014). Cette acquisition aurait alors permis aux AAB, issues d'un ancêtre commun anaérobie strict, de s'adapter à des pressions partielles en oxygène variables leur permettant ainsi de coloniser des habitats différents comme le nectar des fleurs ou le tube digestif des insectes (Chouaia et al., 2014). Contrairement à ce qui a été observé chez les espèces du genre *Anopheles* où la bactérie aurait une prévalence proche de 100% (Favia et al., 2007; Crotti et al., 2009; Chouaia et al., 2010; Damiani et al., 2010; Hughes et al., 2014), nos travaux ont révélé une infection relativement plus réduite chez *Ae. albopictus* (~46 % d'infection sur les populations de Madagascar). De plus, notre analyse par séquençage haut-débit a montré que la bactérie pouvait être dominante au sein de l'intestin moyen et abondante (>10%) au sein de la carcasse de certains individus qui présentaient par ailleurs

une diminution de l'abondance relative en *Wolbachia*. Etant donné que des études ont montré une co-localisation des deux bactéries au sein d'ovaires ou de testicules de moustique, l'hypothèse d'une interaction antagoniste entre les deux bactéries pourrait être envisagée. En effet, une étude récente portant sur les moustiques *An. gambiae* et *An. stephensi*, a démontré qu'une incompatibilité pouvait opérer entre les deux genres bactériens chez un même individu (Hughes et al., 2014). Plus précisément, les moustiques *An. gambiae* présentaient un succès de transinfection par *Wolbachia* extrêmement modéré en présence d'*Asaia.* De plus, il avait également été observé qu'*Asaia* pouvait inhiber la transmission verticale de *Wolbachia.* Si nous partons du postulat que l'interaction antagoniste *Asaia* – *Wolbachia* est généralisable, alors deux hypothèses pourraient expliquer la forte prévalence de *Wolbachia* (~100%) et la faible prévalence d'*Asaia* (~46%) chez *Ae. albopictus*: (i) *Wolbachia* serait plus compétitive qu'*Asaia* chez ce moustique, (ii) *Wolbachia* serait moins compétitive mais aurait envahi les moustiques du fait de leur faible risque d'infection par *Asaia*. Si cette dernière hypothèse est vérifiée, elle pourrait expliquer pourquoi *Wolbachia* colonise rarement les moustiques *Anopheles,* ces derniers étant infectés par des densités importantes de la bactérie *Asaia* au sein de leur intestin moyen, leurs glandes salivaires et surtout leurs organes reproducteurs (Favia et al., 2007; Crotti et al., 2009; Chouaia et al., 2010; Damiani et al., 2010; Hughes et al., 2014). Pour complêter nos connaissances sur les bases génétiques de ce modèle, nous bénéficions désormais du génome séquencé d'une souche d'*Asaia* isolée du moustique tigre (Annexe 2).

Un résultat novateur de nos travaux a été la découverte, dans l'intestin moyen du moustique tigre, de phylotypes dominants associés à des bactéries du genre *Dysgonomonas*. Leur présence a été détectée au sein de tous les échantillons étudiés quelle que soit leur origine. Ce genre bactérien du phylum des *Bacteroidetes* a été découvert récemment chez l'homme (Hofstad et al., 2000). Toutes les souches cultivées présentent une croissance lente et un métabolisme aéro-anaérobie facultatif (Krieg et al., 2011; Yang et al., 2014). Ce genre bactérien a également été retrouvé associé à une large variété d'insectes et d'animaux dont certaines espèces de termites (*Coptotermes formosanus*, *Macrotemes barneyi*) (Yang et al., 2014; Zhang et al., 2014), la mouche verte (*Lucilia sericata*) (Wei et al., 2014), la mouche des fruits (*Drosphila melanogaster*) (Chandler et al., 2011), le charançon rouge des palmiers (*Rynchophorus ferrugineus*) (Tagliavia et al., 2014) mais aussi le poisson bar (*Dicentrachus labrax*) (Carda-Diéguez et al., 2014). *Dysgonomonas* serait capable d'infecter différentes espèces de *Drosophila* indépendamment de leur mode de nutrition ou leur origine géographique (Chandler et al., 2011). En dehors des phytophages, cette bactérie a également été identifiée chez des moustiques adultes *An. stephensi* mais également des larves de *Culex tarsalis* à une abondance relative modérée (6%) de leur microbiote (Rani et al., 2009; Duguma et al., 2013). Par ailleurs, cette bactérie

pourrait jouer un rôle dans la nutrition de son hôte. En effet, la capacité de *Dysgonomonas* à produire des vitamines B_{12} a été proposée comme un mécanisme favorisant sa sélection chez le termite (Husseneder et al., 2009). De plus, chez la mouche soldat noire *Hermetia illucens*, des études métagénomiques ont mis en évidence une nouvelle cellulase provenant de *Dysgonomonas mossii.* Cette cellulase appartiendrait à la famille des glycosyl hydrolases 5 et contribuerait par ce biais à la dégradation de la matière organique ingérée par l'insecte (Lee et al., 2014). Au vu de ces observations, une perspective intéressante à nos travaux serait d'isoler la bactérie à partir d'*Ae. albopictus* et de séquencer son génome afin de révéler les fonctions potentielles qui lui sont associées et plus largement de déterminer son rôle dans la biologie du moustique tigre.

Outre leur caractère commensal, il est important de préciser que certaines espèces associées aux genres *Acinetobacter, Asaia* et *Dysgonomonas* peuvent être impliquées dans des infections opportunistes (Hironaga et al., 2008; Alauzet et al., 2010; Lawson et al., 2010; Doughari et al., 2011). C'est le cas notamment des espèces *Acinetobacter baumannii* et *Acinetobacter lwoffii* (Doughari et al., 2011) qui ont été isolées de moustiques de l'île de Madagascar (Minard et al., 2013). De plus, étant donné que des études ont montré la localisation de certaines de ces bactéries (*Asaia* et *Acinetobacter*) au sein des glandes salivaires d'*Ae. albopictus*, il n'est pas exclu qu'elles puissent être libérées avec la salive lors de la piqûre du moustique (Crotti et al., 2009; Zouache et al., 2009). Une telle hypothèse a d'ailleurs déjà été avancée dans le cas du pou naturellement infecté par l'espèce *A. baumannii* et pour laquelle une forte identité entre les souches provenant de l'insecte et celles de patients parasités avait été mise en évidence (Kempf et al., 2012). Cependant, des essais d'infections expérimentales sur lapins n'ont pas permis de confirmer la transmission vectorielle de la bactérie par le pou (Houhamdi and Raoult, 2006). De même, une enquête épidémiologique sur des sujets à risque, fortement exposés aux moustiques, n'a pas permis de détecter la présence d'*Asaia* chez ces individus (Epis et al., 2012). A ce jour, seule une étude de génomique comparative a permis de mettre en évidence la très probable implication des moustiques dans la transmission de bactéries pathogènes. Il s'agit de l'espèce *Elizabethkingiia anophelis* (agent étiologique de méningites) dont le génome des souches isolées de patients et des moustiques *Anopheles gambiae* présentent une forte similarité, notamment un partage de gènes de virulence et de résistances aux antibiotiques (Frank et al., 2013; Teo et al., 2014).

Enfin, les souches cultivables qui ne présenteraient pas de risques infectieux offrent également de nouvelles perspectives en matière de lutte antivectorielle. En effet, leur forte prévalence associée à leur détection au sein d'organes (intestin moyen, glandes salivaires, ovaires) de multiplication des pathogènes, notamment viraux, sont deux arguments en faveur de leur utilisation pour des applications de lutte via des moustiques

« symbiotiquement modifiés ». Cette méthode consiste à transfecter une population vectrice par un symbiote sauvage ou génétiquement modifié (paratransgénèse), exprimant un ou plusieurs gènes codant des protéines susceptibles d'interférer avec les pathogènes transmis ou de modifier la durée de vie de l'insecte (antiviraux, antiparasitaires, extinctions de gènes…) (Coutinho-Abreu et al., 2010). Dans ce contexte, l'utilisation d'*Asaia* a déjà été proposée comme outil de paratransgénèse contre *Plasmodium* en raison de sa très forte stabilité chez les moustiques *Anopheles* (Favia et al., 2008).

En conclusion, il est important de poursuivre nos investigations sur ces symbiotes cultivables (*Acinetobacter*, *Asaia*, *Dysgonomonas*) qui pourraient nous fournir de nouvelles pistes dans la compréhension de la biologie du moustique tigre tout en ouvrant de nouvelles perspectives de lutte antivectorielle.

Le microbiote bactérien d'Ae. albopictus : un partenaire singulier

Notre approche de méta-taxogénomique a permis de fournir, pour la première fois, une description exhaustive et sans *a priori* de la structure du microbiote bactérien associé au moustique tigre (individus entiers et intestins moyens). L'utilisation de méthodes de séquençage haut débit a permis d'atteindre une profondeur inégalée dans la description des différents taxons bactériens et des facteurs de variation. Toutefois, l'interprétation des données qui découlent de ce type d'analyse nécessite de tenir compte de différents biais qui lui sont associé. En effet, ces approches nécessitent généralement une étape d'amplification d'un gène d'intérêt, elle-même sous l'influence de différents facteurs (choix des amorces, conditions d'amplification, accessibilité de la matrice…). Des études basées sur l'amplification d'un gène d'intérêt tel que le gène codant l'ARNr 16S ont montré que cette étape était un point critique dans la génération d'erreurs (substitutions, insertions, délétions) et de chimères (mélange de deux séquences différentes) (Schloss et al., 2011). De telles erreurs sont, de surcroit, susceptibles d'être générées lors du séquençage haut-débit, auxquelles vont s'ajouter des erreurs spécifiques à la technologie utilisée (e.g. erreurs sur les homopolymères avec la technologie de pyroséquençage 454). Il est donc important de prendre ces biais en considération dans les analyses de diversité (notamment en sous échantillonnant les séquences lors de l'analyse), d'autant plus qu'ils sont proportionnels au nombre de séquences générées (Schloss et al., 2011). D'autre part, notre étude renforce, une fois de plus, l'importance de réaliser un témoin négatif lors des analyses de diversité, de manière à évaluer l'apport des contaminations exogènes (manipulation, réactifs …) (Salter et al., 2014).

Lors de notre étude pilote sur moustique entier, nous avons mis en évidence un microbiote relativement peu complexe et très majoritairement dominé par *Wolbachia.* Par la suite, l'étude ciblée de l'intestin moyen a permis de mettre en avant une diversité plus

importante. Nos travaux ont ainsi pu illustrer la difficulté et l'intérêt des approches méta-taxogénomiques en présence d'un symbiote majoritaire et cela malgré le nombre considérable de séquences obtenues. Un profil similaire a été observé dans le cadre de l'étude du microbiote de la mouche tsé-tsé, dont les analyses ont révélé une dominance de l'endosymbiote bactérien *Wigglesworthia glossinida* (Aksoy et al., 2014). Pour lever ce verrou et révéler la présence de symbiotes non dominants (mais tout aussi importants à considérer dans le cadre de la compréhension des interactions hôte-microbiote), une alternative visait à soustraire spécifiquement les séquences de *Wolbachia*. L'utilisation de stratégie de « la sonde bloquante » (Vestheim et al., 2011) n'a malheureusement pas permis d'obtenir une efficacité suffisante, sans compter l'apport de contaminations générées par la sonde *per se*. D'autres stratégies pourraient être envisagées pour contourner cette difficulté, comme l'utilisation de sondes double amorces comprenant un bloqueur d'élongation relié à un bloqueur d'hybridation (Vestheim and Jarman, 2008; Vestheim et al., 2011) ou encore une soustraction des séquences par capture ciblée (Denonfoux et al., 2013).

Nous avons ensuite fait le choix de cibler l'intestin moyen qui constitue non seulement un organe clef dans les interactions entre l'hôte et son microbiote, mais qui est également la barrière majeure de passage des virus vectorisés vers l'hémolymphe. Cette analyse ciblée de l'intestin moyen a permis d'accéder à une diversité plus importante de taxons bactériens et de mettre en évidence un réseau majeur de co-occurences de symbiotes, essentiellement associé aux populations d'*Ae. albopictus* d'origine vietnamienne. Ce réseau comprenait de nombreuses bactéries de la famille des *Sphingomonadaceae* dont certaines espèces modèles ont été déjà séquencées et ont révélé un large panel d'activités cataboliques (Aylward et al., 2013). Parmi ces activités, on retrouve notamment la capacité à dégrader les noyaux benzéniques, caractéristiques des hydrocarbures polyaromatiques, des insecticides ou de métabolites secondaires des plantes. Un rôle clef de ces bactéries pourrait alors être envisagé dans un processus de détoxification des moustiques en dégradant notamment les insecticides, comme les imagocides deltaméthrine et fénylthrotion, ou encore les métabolites secondaires toxiques des plantes vasculaires à partir desquels les moustiques se nourrissent (composés phénoliques…).

Nos travaux ont par ailleurs révélé la présence d'un microbiote bactérien diversifié localisé dans l'intestin moyen. Or, le tube digestif des moustiques constitue un environnement hostile et sélectif pour les bactéries. Même si le mode de nutrition des moustiques assure aux bactéries un apport régulier en sucres simples et en protéines, leur tube digestif possède un pH très alcalin (entre 8,5 et 10) en raison de la présence d'une anhydrase carbonique (Corena et al., 2005; Saboia-Vahia et al., 2014), une pression partielle en oxygène probablement faible par analogie avec d'autres modèles d'insectes (Brune, 1998; Sudakaran et al., 2012; Šustr et al., 2014) et une température variable modulée par l'environnement

extérieur (espèce ectotherme). De plus, le processus de digestion et le système immunitaire vont également agir sur la microflore résidente en sélectionnant certains taxons via l'action d'enzymes digestives (trypsine, chymotrypsine…), de peptides antimicrobiens ou encore de formes réactives de l'oxygène et de l'azote (Buchon et al., 2013). Certains de ces facteurs étant directement sous l'influence de l'hôte, il est probable que son génotype impacte le microbiote. Cependant, comme en témoigne notre analyse de la structure des microbiotes de l'espèce cryptique et d'*Ae. albopictus*, il est possible que la majorité de ces facteurs agissent au sein de l'ensemble du sous-groupe *Ae. albopictus.* Un échantillonnage plus étendu pourrait apporter des éléments tangibles à cette hypothèse. Au niveau de l'espèce *Ae. albopictus*, malgré une similarité apparente de l'ensemble des populations, nous avons détecté une réduction et une homogénéisation de la diversité bactérienne au sein des populations invasives de France Métropolitaine comparée aux populations autochtones du Vietnam. De plus, ces populations invasives présentaient une réduction de leur richesse allélique et de leur diversité génétique. Ces deux observations sont corrélées, mais ne sont pas obligatoirement liées. En effet, la réduction de diversité bactérienne pourrait notamment être expliquée par l'impact des conditions environnementales et éco-climatiques différentes dans les régions d'étude (température, humidité, végétation, hôtes…). Mieux encore, si un lien de cause à effet reliait la structure des communautés bactériennes à la diversité génétique des populations, se poserait alors la question des déterminants génétiques impliqués dans la sélection du microbiote (Ramirez et al., 2012). Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de comparer la diversité bactérienne de populations de laboratoire consanguines ou non. Il pourrait également être intéressant de mesurer l'effet de variables environnementales (sources nutritives, température, pollution…) sur la structuration du microbiote, en conditions de laboratoire. De surcroît, une meilleure compréhension des mécanismes de régulation du microbiote bactérien est un enjeu majeur pour l'étude des facteurs qui gouvernent la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus.* En effet, un effet du virus CHIKV a précédemment été montré sur la structuration des communautés bactérienne au sein du moustique tigre (Zouache et al., 2012), mais la réciproque pourrait également être envisagée. Il est d'ailleurs avéré chez de nombreux insectes modèles, que les microorganismes peuvent interférer, de manière indirecte, avec les pathogènes transmis. Différents mécanismes d'interférence ont été proposés : (i) activation du système immunitaire (effet de priming), (ii) bloquage physique du passage des pathogènes à travers l'épithélium (effet de barrière), (iii) production de composés antimicrobiens (antagonisme) ou encore (iv) compétition pour les ressources trophiques ou l'occupation des niches (Cirimotich, Ramirez, et al., 2011; Weiss and Aksoy, 2011). L'interférence médiée par le microbiote intestinal contre les virus a été peu étudiée chez les moustiques en comparaison de l'interférence vis-à-vis des parasites eucaryotes (Cirimotich, Dong, et al., 2011; Bahia et

al., 2014). Cependant, différents indices permettent de suspecter que ce phénotype d'interférence serait généralisable aux virus. Par exemple, il a été montré que le moustique *Ae. aegypti* était beaucoup plus susceptible au virus DENV-2 après un traitement antibiotique, perturbant le microbiote, en comparaison des individus non traités (Xi et al., 2008). Une étude a également montré une infectiosité plus réduite du virus de Lacross lorsque celui-ci était mis en contact de bactéries isolées du tube digestif d'*Ae. albopictus,* suggérant ainsi la production de composés antiviraux par les bactéries (Joyce et al., 2011). A l'inverse, dans certains cas, il a été observé que le microbiote bactérien intestinal pouvait aussi faciliter la multiplication des pathogènes et / ou leur passage vers l'hémolymphe (Kliot and Ghanim, 2013). Ainsi, une perspective intéressante à nos travaux serait de comparer la compétence vectorielle des moustiques *Ae. albopictus* en fonction de la composition de leur microbiote.

En conclusion, les résultats de nos travaux contribuent à la description des communautés bactériennes associées au moustique tigre. Si les approches de Méta-taxogénomique renseignent sur la diversité taxonomique des communautés, elles ne sont pas adaptées à l'étude de la diversité fonctionnelle. Une perspective intéressante à nos travaux serait le développement d'approches métagénomiques ou métatranscriptomiques (séquençage haut débit de l'ADN ou de l'ARN bactérien) permettant de renseigner sur le potentiel fonctionnel des communautés. Dans cette éventualité, nous avons débuté le développement d'un protocole d'isolement de la fraction bactérienne (Annexe 3). Cependant, en dehors du microbiote bactérien, les moustiques hébergent également des microorganismes eucaryotes. Des travaux ont été entrepris pour étendre également nos travaux à ces microorganismes (champignons, algues, protistes) dont certains taxons comme le protozoaire symbiotique *Ascogregarina taiwannensis* (Lantova and Volf, 2014) (voir Annexe 1). La connaissance de tous ces acteurs pourrait fournir de nouveaux éléments dans la compréhension du fonctionnement de l'holobionte vecteur.

Références bibliographiques

A J Cornel, R.H.H. (1991) *Aedes albopictus* in Africa? First records of live specimens in imported tires in Cape Town. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **7**: 107–8.

Adhami, J. and Reiter, P. (1998) Introduction and establishment of *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* skuse (Diptera: Culicidae) in Albania. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **14**: 340–343.

Akman Gunduz, E. and Douglas, A.E. (2009) Symbiotic bacteria enable insect to use a nutritionally inadequate diet. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **276**: 987–991.

Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., and Aksoy, S. (2002) Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat. Genet.* **32**: 402–407.

Aksoy, E., Telleria, E.L., Echodu, R., Wu, Y., Okedi, L.M., Weiss, B.L., et al. (2014) Analysis of multiple Tsetse fly populations in Uganda reveals limited diversity and species-specific gut microbiota. *Appl. Environ. Microbiol.* **80**: 4301–4312.

Aksoy, S. (1995) *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., taxa consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of tsetse flies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 848–851.

Alauzet, C., Teyssier, C., Jumas-Bilak, E., Gouby, A., Chiron, R., Rabaud, C., et al. (2010) *Gluconobacter* as well as *Asaia* species, newly emerging opportunistic human pathogens among acetic acid bacteria. *J. Clin. Microbiol.* **48**: 3935–3942.

De Albuquerque, A.L., Magalhães, T., and Ayres, C.F.J. (2011) High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipientis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106**: 773–776.

Aliabadi, B.W. and Juliano, S.A. (2002) Escape from gregarine parasites affects the competitive interactions of an invasive mosquito. *Biol. Invasions* **4**: 283–297.

Allgood, D.W. and Yee, D.A. (2014) Influence of resource levels, organic compounds and laboratory colonization on interspecific competition between the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus* (Stegomyia albopicta) and the southern house mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Med. Vet. Entomol.*

Anderson, R.C. (2000) Nematode parasites of vertebrates: their development and transmission CABI.

Andersson, A.F., Lindberg, M., Jakobsson, H., Bäckhed, F., Nyrén, P., and Engstrand, L. (2008) Comparative analysis of human gut microbiota by barcoded pyrosequencing. *PLoS ONE* **3**: e2836.

Andreotti, R., Perez de Leon, A.A., Dowd, S.E., Guerrero, F.D., Bendele, K.G., and Scoles, G.A. (2011) Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus* (Boophilus) *microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol.* **11**: 6.

Anselme, C., Pérez-Brocal, V., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Charif, D., Latorre, A., et al. (2008) Identification of the weevil immune genes and their expression in the bacteriome tissue. *BMC Biol.* **6**: 43.

Arankalle, V.A., Shrivastava, S., Cherian, S., Gunjikar, R.S., Walimbe, A.M., Jadhav, S.M., et al. (2007) Genetic divergence of Chikungunya viruses in India (1963-2006) with special reference to the 2005-2006 explosive epidemic. *J. Gen. Virol.* **88**: 1967–1976.

Armbruster, P., Damsky, W.E., Giordano, R., Birungi, J., Munstermann, L.E., and Conn, J.E. (2003) Infection of New- and Old-World *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) by the Intracellular parasite *Wolbachia*: Implications for host mitochondrial DNA Evolution. *J. Med. Entomol.* **40**: 356–360.

Asaad, A.M., Al-Ayed, M.S.Z., and Qureshi, M.A. (2013) Emergence of unusual nonfermenting Gram-negative nosocomial pathogens in a Saudi hospital. *Jpn. J. Infect. Dis.* **66**: 507–511.

Ashton Acton, Q. (2012) Advances in Sphingomonadaceae research and application: 2012 Edition: ScholarlyBrief ScholarlyEditions.

Atyame, C.M., Delsuc, F., Pasteur, N., Weill, M., and Duron, O. (2011) Diversification of *Wolbachia* endosymbiont in the *Culex pipiens* mosquito. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 2761–2772.

Aylward, F.O., McDonald, B.R., Adams, S.M., Valenzuela, A., Schmidt, R.A., Goodwin, L.A., et al. (2013) Comparison of 26 Sphingomonad genomes reveals diverse environmental adaptations and biodegradative capabilities. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 3724–3733.

Bahia, A.C., Dong, Y., Blumberg, B.J., Mlambo, G., Tripathi, A., BenMarzouk-Hidalgo, O.J., et al. (2014) Exploring *Anopheles* gut bacteria for *Plasmodium* blocking activity. *Environ. Microbiol.* **16**: 2980–2994.

Baird, N.A., Etter, P.D., Atwood, T.S., Currey, M.C., Shiver, A.L., Lewis, Z.A., et al. (2008) Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PloS One* **3**: e3376.

Baker, G.C., Smith, J.J., and Cowan, D.A. (2003) Review and re-analysis of domain-specific 16S primers. *J. Microbiol. Methods* **55**: 541–555.

Baldini, F., Segata, N., Pompon, J., Marcenac, P., Robert Shaw, W., Dabiré, R.K., et al. (2014) Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles* gambiae. *Nat. Commun.* **5**:

Balfour Kirk, J. (1928) The incidence of filariasis in Port Louis, Mauritius. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **22**: 263–268.

Bara, J. j., Clark, T. m., and Remold, S. k. (2014) Utilization of larval and pupal detritus by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *J. Vector Ecol.* **39**: 44–47.

Bartlett-Healy, K., Unlu, I., Obenauer, P., Hughes, T., Healy, S., Crepeau, T., et al. (2012) Larval mosquito habitat utilization and community dynamics of *Aedes albopictus* and *Aedes japonicus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **49**: 813–824.

Behar, A., Yuval, B., and Jurkevitch, E. (2005) Enterobacteria-mediated nitrogen fixation in natural populations of the fruit fly *Ceratitis capitata*. *Mol. Ecol.* **14**: 2637–2643.

Bellini, R., Balestrino, F., Medici, A., Gentile, G., Veronesi, R., and Carrieri, M. (2013) Mating Competitiveness of *Aedes albopictus* radio-sterilized males in large enclosures exposed to natural conditions. *J. Med. Entomol.* **50**: 94–102.

Bellini, R., Calvitti, M., Medici, A., Carrieri, M., Celli, G., and Maini, S. (2007) Use of the Sterile Insect Technique against *Aedes albopictus* in Italy: first results of a pilot trial in *Area-Wide Control of Insect Pests*. Springer Netherlands, pp. 505–515.

Benedict, M.Q. and Robinson, A.S. (2003) The first releases of transgenic mosquitoes: an argument for the sterile insect technique. *Trends Parasitol.* **19**: 349–355.

Benemann, J.R. (1973) Nitrogen Fixation in Termites. *Science* **181**: 164–165.

Benson, A.K., Kelly, S.A., Legge, R., Ma, F., Low, S.J., Kim, J., et al. (2010) Individuality in gut microbiota composition is a complex polygenic trait shaped by multiple environmental and host genetic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**: 18933–18938.

Bernalier, A., Willems, A., Leclerc, M., Rochet, V., and Collins, M.D. (1996) *Ruminococcus hydrogenotrophicus* sp. nov., a new H2/CO2-utilizing acetogenic bacterium isolated from human feces. *Arch. Microbiol.* **166**: 176–183.

Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., and Xi, Z. (2010) The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* **6**: e1000833.

Bilal, H., Hassan, S.A., and Khan, I.A. (2012) Isolation and efficacy of entomopathogenic fungus (*Metarhizium anisopliae*) for the control of *Aedes albopictus* Skuse larvae: suspected dengue vector in Pakistan. *Asian Pac. J. Trop. Biomed.* **2**: 298–300.

Birungi, J. and Munstermann, L.E. (2002) Genetic structure of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) populations based on mitochondrial ND5 sequences: Evidence for an independent invasion into Brazil and United States. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **95**: 125–132.

Bisi, D.C. and Lampe, D.J. (2011) Secretion of anti-Plasmodium effector proteins from a natural *Pantoea agglomerans* isolate by using PelB and HlyA secretion signals. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 4669–4675.

Boessenkool, S., Epp, L.S., Haile, J., Bellemain, E., Edwards, M., Coissac, E., et al. (2012) Blocking human contaminant DNA during PCR allows amplification of rare mammal species from sedimentary ancient DNA. *Mol. Ecol.* **21**: 1806–1815.

Boissière, A., Tchioffo, M.T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S.E., et al. (2012) Midgut microbiota of the malaria mosquito vector *Anopheles gambiae* and interactions with *Plasmodium falciparum* infection. *PLoS Pathog.* **8**: e1002742.

Bonizzoni, M., Gasperi, G., Chen, X., and James, A.A. (2013) The invasive mosquito species *Aedes albopictus*: current knowledge and future perspectives. *Trends Parasitol.* **29**: 460–468.

Bordenstein, S.R., O'Hara, F.P., and Werren, J.H. (2001) *Wolbachia*-induced incompatibility precedes other hybrid incompatibilities in *Nasonia*. *Nature* **409**: 707–710.

Bourtzis, K., Dobson, S.L., Xi, Z., Rasgon, J.L., Calvitti, M., Moreira, L.A., et al. (2014) Harnessing mosquito-*Wolbachia* symbiosis for vector and disease control. *Acta Trop.* **132 Suppl**: S150–163.

Boyer, S., Gilles, J., Merancienne, D., Lemperiere, G., and Fontenille, D. (2011) Sexual performance of male mosquito *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* **25**: 454–459.

Brady, O.J., Johansson, M.A., Guerra, C.A., Bhatt, S., Golding, N., Pigott, D.M., et al. (2013) Modelling adult *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* survival at different temperatures in laboratory and field settings. *Parasit. Vectors* **6**: 351.

Braig, H.R., Zhou, W., Dobson, S.L., and O'Neill, S.L. (1998) Cloning and characterization of a gene encoding the major surface protein of the bacterial endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *J. Bacteriol.* **180**: 2373–2378.

Braks, M.A.H., Honório, N.A., Lounibos, L.P., Lourenço-De-Oliveira, R., and Juliano, S.A. (2004) Interspecific competition between two invasive species of container mosquitoes, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae), in Brazil. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **97**: 130–139.

Breeuwer, J.A. and Werren, J.H. (1990) Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* **346**: 558–560.

Brownlie, J.C., Cass, B.N., Riegler, M., Witsenburg, J.J., Iturbe-Ormaetxe, I., McGraw, E.A., and O'Neill, S.L. (2009) Evidence for metabolic provisioning by a common invertebrate endosymbiont, *Wolbachia pipientis*, during periods of nutritional stress. *PLoS Pathog* **5**: e1000368.

Brucker, R.M. and Bordenstein, S.R. (2012) Speciation by symbiosis. *Trends Ecol. Evol.* **27**: 443–451.

Brucker, R.M. and Bordenstein, S.R. (2013) The capacious hologenome. *Zoology* **116**: 260–261.

Brucker, R.M. and Bordenstein, S.R. (2013) The hologenomic basis of speciation: gut bacteria cause hybrid lethality in the genus Nasonia. *Science* **341**: 667–669.

Brucker, R.M. and Bordenstein, S.R. (2012) The roles of host evolutionary relationships (genus: *Nasonia*) and development in structuring microbial communities. *Evolution* **66**: 349–362.

Brumin, M., Kontsedalov, S., and Ghanim, M. (2011) Rickettsia influences thermotolerance in the whitefly *Bemisia tabaci* B biotype. *Insect Sci.* **18**: 57–66.

Brune, A. (2014) Symbiotic digestion of lignocellulose in termite guts. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**: 168–180.

Brune, A. (1998) Termite guts: the world's smallest bioreactors. *Trends Biotechnol.* **16**: 16–21.

Buchon, N., Broderick, N.A., and Lemaitre, B. (2013) Gut homeostasis in a microbial world: insights from *Drosophila melanogaster*. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 615–626.

Burnham, K.D., Baldridge, R.S., Duhrkopf, R.E., and Vodopich, D.S. (1994) Laboratory study of predation by *Solenopsis invicta* (Hymenoptera: Formicidae) on eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **31**: 770–771.

C Aranda, R.E. (2006) First record and establishment of the mosquito *Aedes albopictus* in Spain. *Med. Vet. Entomol.* **20**: 150–2.

Calvitti, M., Moretti, R., Porretta, D., Bellini, R., and Urbanelli, S. (2009) Effects on male fitness of removing *Wolbachia* infections from the mosquito *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* **23**: 132–140.

Calvitti, M., Moretti, R., Skidmore, A.R., and Dobson, S.L. (2012) *Wolbachia* strain wPip yields a pattern of cytoplasmic incompatibility enhancing a *Wolbachia*-based suppression strategy against the disease vector *Aedes albopictus*. *Parasit. Vectors* **5**: 254.

Caminade, C., Medlock, J.M., Ducheyne, E., McIntyre, K.M., Leach, S., Baylis, M., and Morse, A.P. (2012) Suitability of european climate for the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*: recent trends and future scenarios. *J. R. Soc. Interface* **9**: 2708–2717.

Cancrini, G., Pietrobelli, M., Frangipane di Regalbono, A.F., Tampieri, M.P., and della Torre, A. (1995) Development of *Dirofilaria* and *Setaria* nematodes in *Aedes albopictus*. *Parassitologia* **37**: 141–145.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Huntley, J., Fierer, N., et al. (2012) Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J.* **6**: 1621–1624.

Caporaso, J.G., Lauber, C.L., Walters, W.A., Berg-Lyons, D., Lozupone, C.A., Turnbaugh, P.J., et al. (2011) Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl 1**: 4516–4522.

Carda-Diéguez, M., Mira, A., and Fouz, B. (2014) Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiol. Ecol.* **87**: 451–459.

Chambers, M.C. and Schneider, D.S. (2012) Pioneering immunology: insect style. *Curr. Opin. Immunol.* **24**: 10–14.

Chandel, K., Mendki, M.J., Parikh, R.Y., Kulkarni, G., Tikar, S.N., Sukumaran, D., et al. (2013) Midgut microbial community of *Culex quinquefasciatus* mosquito populations from India. *PloS One* **8**: e80453.

Chandler, J.A., Lang, J.M., Bhatnagar, S., Eisen, J.A., and Kopp, A. (2011) Bacterial communities of diverse *Drosophila* species: ecological context of a host-microbe model system. *PLoS Genet.* **7**: e1002272.

Charles, H., Heddi, A., and Rahbe, Y. (2001) A putative insect intracellular endosymbiont stem clade, within the Enterobacteriaceae, infered from phylogenetic analysis based on a heterogeneous model of DNA evolution. *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. III - Sci. Vie* **324**: 489–494.

Charrel, R.N., de Lamballerie, X., and Raoult, D. (2007) Chikungunya outbreaks--the globalization of vectorborne diseases. *N. Engl. J. Med.* **356**: 769–771.

Chen, W.J. and Yang, C.H. (1996) Developmental synchrony of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) within *Aedes albopictus* (Diptera: Cuclicidae). *J. Med. Entomol.* **33**: 212–215.

Chouaia, B., Gaiarsa, S., Crotti, E., Comandatore, F., Degli Esposti, M., Ricci, I., et al. (2014) Acetic acid bacteria genomes reveal functional traits for adaptation to life in insect guts. *Genome Biol. Evol.* **6**: 912–920.

Chouaia, B., Rossi, P., Montagna, M., Ricci, I., Crotti, E., Damiani, C., et al. (2010) Molecular evidence for multiple infections as revealed by typing of *Asaia* bacterial symbionts of four mosquito species. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 7444–7450.

Chrostek, E., Marialva, M.S.P., Esteves, S.S., Weinert, L.A., Martinez, J., Jiggins, F.M., and Teixeira, L. (2013) *Wolbachia* variants induce differential protection to viruses in *Drosophila melanogaster*: a phenotypic and phylogenomic analysis. *PLoS Genet.* **9**: e1003896.

Cirimotich, C.M., Dong, Y., Clayton, A.M., Sandiford, S.L., Souza-Neto, J.A., Mulenga, M., and Dimopoulos, G. (2011) Natural microbe-mediated refractoriness to *Plasmodium* infection in *Anopheles gambiae*. *Science* **332**: 855–858.

Cirimotich, C.M., Ramirez, J.L., and Dimopoulos, G. (2011) Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe* **10**: 307–310.

Le Clec'h, W., Chevalier, F.D., Genty, L., Bertaux, J., Bouchon, D., and Sicard, M. (2013) Cannibalism and predation as paths for horizontal passage of *Wolbachia* between terrestrial isopods. *PLoS ONE* **8**: e60232.

Clements, A.N. (1992) The biology of mosquitoes: Development, nutrition and reproduction Chapman & Hall.
Clements, A.N. (1999) The biology of mosquitoes: sensory reception and behaviour CABI.
Clements, A.N. (2011) The biology of mosquitoes: viral, arboviral and bacterial pathogens CABI.
Coates, R., Moran, J., and Horsburgh, M.J. (2014) Staphylococci: colonizers and pathogens of human skin. *Future Microbiol.* **9**: 75–91.
Corena, M. del P., VanEkeris, L., Salazar, M.I., Bowers, D., Fiedler, M.M., Silverman, D., et al. (2005) Carbonic anhydrase in the adult mosquito midgut. *J. Exp. Biol.* **208**: 3263–3273.
Coutinho-Abreu, I.V., Zhu, K.Y., and Ramalho-Ortigao, M. (2010) Transgenesis and paratransgenesis to control insect-borne diseases: Current status and future challenges. *Parasitol. Int.* **59**: 1–8.
Cox-Foster, D.L., Conlan, S., Holmes, E.C., Palacios, G., Evans, J.D., Moran, N.A., et al. (2007) A metagenomic survey of microbes in honey bee colony collapse disorder. *Science* **318**: 283–287.
Crotti, E., Damiani, C., Pajoro, M., Gonella, E., Rizzi, A., Ricci, I., et al. (2009) *Asaia*, a versatile acetic acid bacterial symbiont, capable of cross-colonizing insects of phylogenetically distant genera and orders. *Environ. Microbiol.* **11**: 3252–3264.
Crotti, E., Rizzi, A., Chouaia, B., Ricci, I., Favia, G., Alma, A., et al. (2010) Acetic acid bacteria, newly emerging symbionts of insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 6963–6970.
D'Auria, G., Peris-Bondia, F., Džunková, M., Mira, A., Collado, M.C., Latorre, A., and Moya, A. (2013) Active and secreted IgA-coated bacterial fractions from the human gut reveal an under-represented microbiota core. *Sci. Rep.* **3**: 3515.
Dai, J.X., Liu, X.M., and Wang, Y.J. (2014) Diversity of endophytic bacteria in *Caragana microphylla* grown in the desert grassland of the Ningxia Hui autonomous region of China. *Genet. Mol. Res. GMR* **13**: 2349–2358.
Dalla Pozza, G. and Majori, G. (1992) First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **8**: 318–320.
Damiani, C., Ricci, I., Crotti, E., Rossi, P., Rizzi, A., Scuppa, P., et al. (2010) Mosquito-bacteria symbiosis: the case of *Anopheles gambiae* and *Asaia*. *Microb. Ecol.* **60**: 644–654.
Daugherty, M.P., Alto, B.W., and Juliano, S.A. (2000) Invertebrate carcasses as a resource for competing *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **37**: 364.
Dedeine, F., Boulétreau, M., and Vavre, F. (2005) *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in A. tabida. *Heredity* **95**: 394–400.
Dedeine, F., Vavre, F., Shoemaker, D.D., and Boulétreau, M. (2004) Intra-individual coexistence of a *Wolbachia* strain required for host oogenesis with two strains inducing cytoplasmic incompatibility in the wasp *Asobara tabida*. *Evol. Int. J. Org. Evol.* **58**: 2167–2174.
Delatte, H., Paupy, C., Dehecq, J.S., Thiria, J., Failloux, A.B., and Fontenille, D. (2008) *Aedes albopictus*, vector of chikungunya and dengue viruses in Reunion Island: biology and control. *Parasite Paris Fr.* **15**: 3–13.
Denlinger, D.L. and Armbruster, P.A. (2014) Mosquito diapause. *Annu. Rev. Entomol.* **59**: 73–93.
Denonfoux, J., Parisot, N., Dugat-Bony, E., Biderre-Petit, C., Boucher, D., Morgavi, D.P., et al. (2013) Gene capture coupled to high-throughput sequencing as a strategy for targeted metagenome exploration. *DNA Res. Int. J. Rapid Publ. Rep. Genes Genomes* **20**: 185–196.
Dettman, J.R., Rodrigue, N., Aaron, S.D., and Kassen, R. (2013) Evolutionary genomics of epidemic and nonepidemic strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**: 21065–21070.

Dicksved, J., Halfvarson, J., Rosenquist, M., Järnerot, G., Tysk, C., Apajalahti, J., et al. (2008) Molecular analysis of the gut microbiota of identical twins with Crohn's disease. *ISME J.* **2**: 716–727.

Dillon, R.J. and Dillon, V.M. (2004) The gut bacteria of insects: nonpathogenic interactions. *Annu. Rev. Entomol.* **49**: 71–92.

Dinparast Djadid, N., Jazayeri, H., Raz, A., Favia, G., Ricci, I., and Zakeri, S. (2011) Identification of the midgut microbiota of *An. stephensi* and *An. maculipennis* for their application as a paratransgenic tool against malaria. *PloS One* **6**: e28484.

Dlugosch, K.M. and Parker, I.M. (2008) Founding events in species invasions: genetic variation, adaptive evolution, and the role of multiple introductions. *Mol. Ecol.* **17**: 431–449.

Dobson, S.L., Bourtzis, K., Braig, H.R., Jones, B.F., Zhou, W., Rousset, F., and O'Neill, S.L. (1999) *Wolbachia* infections are distributed throughout insect somatic and germ line tissues. *Insect Biochem. Mol. Biol.* **29**: 153–160.

Dobson, S.L., Marsland, E.J., and Rattanadechakul, W. (2002) Mutualistic *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus*: accelerating cytoplasmic drive. *Genetics* **160**: 1087–1094.

Dobson, S.L., Marsland, E.J., and Rattanadechakul, W. (2001) *Wolbachia*-Induced cytoplasmic incompatibility in single- and superinfected *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **38**: 382–387.

Dobson, S.L., Rattanadechakul, W., and Marsland, E.J. (2004) Fitness advantage and cytoplasmic incompatibility in *Wolbachia* single- and superinfected *Aedes albopictus*. *Heredity* **93**: 135–142.

Dong, Y., Manfredini, F., and Dimopoulos, G. (2009) Implication of the mosquito midgut microbiota in the defense against malaria parasites. *PLoS Pathog.* **5**: e1000423.

Doughari, H.J., Ndakidemi, P.A., Human, I.S., and Benade, S. (2011) The ecology, biology and pathogenesis of *Acinetobacter* spp.: An Overview. *Microbes Environ. JSME*.

Douglas, A.E. (1989) Mycetocyte symbiosis in insects. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **64**: 409–434.

Douglas, A.E. (2009) The microbial dimension in insect nutritional ecology. *Funct. Ecol.* **23**: 38–47.

Douglas, A.E., Bouvaine, S., and Russell, R.R. (2011) How the insect immune system interacts with an obligate symbiotic bacterium. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **278**: 333–338.

Duguma, D., Rugman-Jones, P., Kaufman, M.G., Hall, M.W., Neufeld, J.D., Stouthamer, R., and Walton, W.E. (2013) Bacterial communities associated with *Culex* Mosquito larvae and two emergent aquatic plants of bioremediation importance. *PLoS ONE* **8**: e72522.

Duhrkopf, R.E., Baldridge, R.S., Crino, O.L., and Dillen, J. (2011) Predation by *Solenopsis invicta* Buren (Hymenoptera: Formicidae) on eggs, larvae, and pupae of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae). *Southwest. Entomol.* **36**: 119–124.

Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., et al. (2001) Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and "HGE agent" as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 2145–2165.

Dunbar, H.E., Wilson, A.C.C., Ferguson, N.R., and Moran, N.A. (2007) Aphid thermal tolerance is governed by a point mutation in bacterial symbionts. *PLoS Biol* **5**: e96.

Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., and Hurst, G.D. (2008) The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol.* **6**: 27.

Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**: 1792–1797.

Effler, P.V., Pang, L., Kitsutani, P., Vorndam, V., Nakata, M., Ayers, T., et al. (2005) Dengue fever, Hawaii, 2001-2002. *Emerg. Infect. Dis.* **11**: 742–749.

Egizi, A., Healy, S.P., and Fonseca, D.M. (2013) Rapid blood meal scoring in anthropophilic *Aedes albopictus* and application of PCR blocking to avoid pseudogenes. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **16**: 122–128.

Engel, P. and Moran, N.A. (2013) The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiol. Rev.* **37**: 699–735.

Engelstädter, J. and Hurst, G.D.D. (2009) The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **40**: 127–149.

Epis, S., Gaibani, P., Ulissi, U., Chouaia, B., Ricci, I., Damiani, C., et al. (2012) Do mosquito-associated bacteria of the genus *Asaia* circulate in humans? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **31**: 1137–1140.

Estrada-Franco, J.G. and Craig, G.B. (1995) Biology, disease relationships, and control of *Aedes albopictus* pan American health organization, pan American sanitary bureau, regional office of the World Health Organization.

Favia, G., Ricci, I., Damiani, C., Raddadi, N., Crotti, E., Marzorati, M., et al. (2007) Bacteria of the genus *Asaia* stably associate with *Anopheles stephensi*, an Asian malarial mosquito vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**: 9047–9051.

Favia, G., Ricci, I., Marzorati, M., Negri, I., Alma, A., Sacchi, L., et al. (2008) Bacteria of the genus *Asaia*: a potential paratransgenic weapon against malaria. *Adv. Exp. Med. Biol.* **627**: 49–59.

Feldhaar, H. (2011) Bacterial symbionts as mediators of ecologically important traits of insect hosts. *Ecol. Entomol.* **36**: 533–543.

Ferrari, J. and Vavre, F. (2011) Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **366**: 1389–1400.

Focks, D.A. (2007) *Toxorhynchites* as biocontrol agents. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **23**: 118–127.

Fondi, M., Bacci, G., Brilli, M., Papaleo, M.C., Mengoni, A., Vaneechoutte, M., et al. (2010) Exploring the evolutionary dynamics of plasmids: the *Acinetobacter* pan-plasmidome. *BMC Evol Biol* **10**: 59–59.

Fontenille, D. and Rodhain, F. (1989) Biology and distribution of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* in Madagascar. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **5**: 219–225.

Forattini, O.P. (1986) Identificação de *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse) no Brasil. *Rev. Saúde Pública* **20**:

Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., et al. (2005) The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS Biol.* **3**:

Foster, W.A. (1995) Mosquito sugar feeding and reproductive energetics. *Annu. Rev. Entomol.* **40**: 443–474.

Franche, C., Lindström, K., and Elmerich, C. (2009) Nitrogen-fixing bacteria associated with leguminous and non-leguminous plants. *Plant Soil* **321**: 35–59.

Francis, A.P. and Currie, D.J. (2003) A globally consistent richness-climate relationship for angiosperms. *Am. Nat.* **161**: 523–536.

Frank, T., Gody, J.C., Nguyen, L.B.L., Berthet, N., Fleche-Mateos, A.L., Bata, P., et al. (2013) First case of *Elizabethkingia anophelis meningitis* in the Central African Republic. *The Lancet* **381**: 1876.

Fukuda, T., Willis, O.R., and Barnard, D.R. (1997) Parasites of the Asian tiger mosquito and other container-inhabiting mosquitoes (Diptera:Culicidae) in northcentral Florida. *J. Med. Entomol.* **34**: 226–233.

Gagen, E.J., Denman, S.E., Padmanabha, J., Zadbuke, S., Al Jassim, R., Morrison, M., and McSweeney, C.S. (2010) Functional gene analysis suggests different acetogen populations in the bovine rumen and tammar wallaby forestomach. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 7785–7795.

Garcia, J.J., Fukuda, T., and Becnel, J.J. (1994) Seasonality, prevalence and pathogenicity of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in mosquitoes from Florida. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **10**: 413–418.

Garrity, G., Brenner, D.J., Staley, J.T., Krieg, N.R., Boone, D.R., Vos, P.D., et al. (2006) Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology: Volume Two: The Proteobacteria (Part C) Springer.

Gaston, K.J. (1991) The magnitude of global insect species richness. *Conserv. Biol.* **5**: 283–296.

Gavotte, L., Mercer, D.R., Vandyke, R., Mains, J.W., and Dobson, S.L. (2009) *Wolbachia* infection and resource competition effects on immature *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **46**: 451–459.

Gayatri Priya, N., Ojha, A., Kajla, M.K., Raj, A., and Rajagopal, R. (2012) Host plant induced variation in gut bacteria of *Helicoverpa armigera*. *PLoS ONE* **7**: e30768.

Geiger, A., Fardeau, M.-L., Grebaut, P., Vatunga, G., Josénando, T., Herder, S., et al. (2009) First isolation of *Enterobacter*, *Enterococcus*, and *Acinetobacter* spp. as inhabitants of the tsetse fly (*Glossina palpalis* palpalis) midgut. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **9**: 1364–1370.

Geiger, A., Fardeau, M.-L., Njiokou, F., Joseph, M., Asonganyi, T., Ollivier, B., and Cuny, G. (2011) Bacterial diversity associated with populations of *Glossina* spp. from Cameroon and distribution within the Campo sleeping sickness focus. *Microb. Ecol.*

Gerardo, N.M., Altincicek, B., Anselme, C., Atamian, H., Barribeau, S.M., Vos, M. de, et al. (2010) Immunity and other defenses in pea aphids, *Acyrthosiphon pisum*. *Genome Biol.* **11**: R21.

Gomes, A. de C., Gotlieb, S.L., Marques, C.C., de Paula, M.B., and Marques, G.R. (1995) Duration of larval and pupal development stages of *Aedes albopictus* in natural and artificial containers. *Rev. Saúde Pública* **29**: 15–19.

Goris, J., Konstantinidis, K.T., Klappenbach, J.A., Coenye, T., Vandamme, P., and Tiedje, J.M. (2007) DNA-DNA hybridization values and their relationship to whole-genome sequence similarities. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **57**: 81–91.

Gouy, M., Guindon, S., and Gascuel, O. (2010) SeaView Version 4: A Multiplatform Graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 221–224.

Grant L. Hughes, B.L.D. (2014) Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*

Gratz, N.G. (2004) Critical review of the vector status of *Aedes albopictus*. *Med. Vet. Entomol.* **18**: 215–227.

Gubler, D.J. (1998) Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**: 480–496.

Guerrero, R., Margulis, L., and Berlanga, M. (2013) Symbiogenesis: the holobiont as a unit of evolution. *Int. Microbiol. Off. J. Span. Soc. Microbiol.* **16**: 133–143.

Gusmão, D.S., Santos, A.V., Marini, D.C., Bacci, M., Jr, Berbert-Molina, M.A., and Lemos, F.J.A. (2010) Culture-dependent and culture-independent characterization of microorganisms associated with *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) (L.) and dynamics of bacterial colonization in the midgut. *Acta Trop.* **115**: 275–281.

Guy, B., Barrere, B., Malinowski, C., Saville, M., Teyssou, R., and Lang, J. (2011) From research to phase III: Preclinical, industrial and clinical development of the Sanofi Pasteur tetravalent dengue vaccine. *Vaccine* **29**: 7229–7241.

Hacker, J. and Carniel, E. (2001) Ecological fitness, genomic islands and bacterial pathogenicity. *EMBO Rep.* **2**: 376–381.

Halstead, S.B. (2007) Dengue. *Lancet* **370**: 1644–1652.

Hamdan, H., Sofian-Azirun, M., Nazni, W.A., and Lee, H.L. (2005) Insecticide resistance development in *Culex quinquefasciatus* (Say), *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) larvae against malathion, permethrin and temephos. *Trop. Biomed.* **22**: 45–52.

Hamon, J. (1956) Seconde note sur la biologie des moustiques de l'île de la Réunion. *Ann. Parasitol. Hum. Comparée* **31**: 598–606.
Hansom, S.M. and Craig, G.B. (1994) Cold Acclimation, diapause, and geographic origin affect cold hardiness in eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **31**: 192–201.
Harbach, R.E. (2004) The classification of genus *Anopheles* (Diptera: Culicidae): a working hypothesis of phylogenetic relationships. *Bull. Entomol. Res.* **94**: 537–553.
Harmon, J.P., Moran, N.A., and Ives, A.R. (2009) Species response to environmental change: impacts of food web interactions and evolution. *Science* **323**: 1347–1350.
Hawley, W.A. (1988) The biology of *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc. Suppl.* **1**: 1–39.
Heddi, A., Charles, H., Khatchadourian, C., Bonnot, G., and Nardon, P. (1998) Molecular characterization of the principal symbiotic bacteria of the weevil *Sitophilus oryzae*: a peculiar G + C content of an endocytobiotic DNA. *J. Mol. Evol.* **47**: 52–61.
Hedges, L.M., Brownlie, J.C., O'Neill, S.L., and Johnson, K.N. (2008) *Wolbachia* and virus protection in insects. *Science* **322**: 702.
Hernández-Martínez, P., Naseri, B., Navarro-Cerrillo, G., Escriche, B., Ferré, J., and Herrero, S. (2010) Increase in midgut microbiota load induces an apparent immune priming and increases tolerance to *Bacillus thuringiensis*. *Environ. Microbiol.* **12**: 2730–2737.
Hill, L.A., Davis, J.B., Hapgood, G., Whelan, P.I., Smith, G.A., Ritchie, S.A., et al. (2008) Rapid identification of *Aedes albopictus*, *Aedes scutellaris*, and *Aedes aegypti* life stages using real-time polymerase chain reaction assays. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **79**: 866–875.
Hillyer, J.F. (2010) Mosquito immunity. *Adv. Exp. Med. Biol.* **708**: 218–238.
Hironaga, M., Yamane, K., Inaba, M., Haga, Y., and Arakawa, Y. (2008) Characterization and antimicrobial susceptibility of *Dysgonomonas capnocytophagoides* isolated from human blood sample. *Jpn. J. Infect. Dis.* **61**: 212–213.
Hochedez, P., Canestri, A., Lecso, M., Valin, N., Bricaire, F., and Caumes, E. (2009) Skin and soft tissue infections in returning travelers. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **80**: 431–434.
Hofstad, T., Olsen, I., Eribe, E.R., Falsen, E., Collins, M.D., and Lawson, P.A. (2000) *Dysgonomonas* gen. nov. to accommodate *Dysgonomonas gadei* sp. nov., an organism isolated from a human gall bladder, and *Dysgonomonas capnocytophagoides* (formerly CDC group DF-3). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 6**: 2189–2195.
Hongoh, Y., Deevong, P., Inoue, T., Moriya, S., Trakulnaleamsai, S., Ohkuma, M., et al. (2005) Intra- and interspecific comparisons of bacterial diversity and community structure support coevolution of gut microbiota and termite Host. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 6590–6599.
Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.-Y., and Fukatsu, T. (2009) *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 200911476.
Houhamdi, L. and Raoult, D. (2006) Experimental infection of human body lice with *Acinetobacter baumannii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **74**: 526–531.
Hu, S., Guo, Z., Li, T., Carpenter, E.J., Liu, S., and Lin, S. (2014) Detecting in situ copepod diet diversity using molecular technique: development of a copepod/symbiotic ciliate-excluding eukaryote-inclusive PCR protocol. *PloS One* **9**: e103528.
Huang, Y.-M. (1972) Contributions to the Mosquito Fauna of Southeast Asia. XIV. The Subgenus Stegomyia of *Aedes* in Southeast Asia I - The Scutellaris Group of Species.
Huang, Y.-M. (1979) Medical Entomology Studies - XI. The subgenus stegomyia of *Aedes* in the oriental region with keys to the species (Diptera: Culicidae).
Hughes, G.L., Dodson, B.L., Johnson, R.M., Murdock, C.C., Tsujimoto, H., Suzuki, Y., et al. (2014) Native microbiome impedes vertical transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 12498–12503.

Hurst, G.D.D. and Jiggins, F.M. (2005) Problems with mitochondrial DNA as a marker in population, phylogeographic and phylogenetic studies: the effects of inherited symbionts. *Proc. Biol. Sci.* **272**: 1525–1534.

Husseneder, C., Berestecky, J.M., and Grace, J.K. (2009) Changes in composition of culturable bacteria community in the gut of the *Formosan subterranean* Termite depending on rearing conditions of the host. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **102**: 498–507.

Islam, M.S. and Dobson, S.L. (2006) *Wolbachia* effects on *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) immature survivorship and development. *J. Med. Entomol.* **43**: 689–695.

Issack, M.I., Pursem, V.N., Barkham, T.M.S., Ng, L.C., Inoue, M., and Manraj, S.S. (2010) Reemergence of dengue in Mauritius. *Emerg. Infect. Dis.* **16**: 716–718.

Johnson, null and V Barbehenn R, null (2000) Oxygen levels in the gut lumens of herbivorous insects. *J. Insect Physiol.* **46**: 897–903.

Joyce, C.R. (1961) Potentialities for Accidental establishment of exotic mosquitoes in Hawaii.

Joyce, J.D., Nogueira, J.R., Bales, A.A., Pittman, K.E., and Anderson, J.R. (2011) Interactions between La Crosse virus and bacteria isolated from the digestive tract of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **48**: 389–394.

Juliano, S.A. (2009) Species interactions among larval mosquitoes: context dependence across habitat gradients. *Annu. Rev. Entomol.* **54**: 37–56.

Juliano, S.A. and Lounibos, L.P. (2005) Ecology of invasive mosquitoes: effects on resident species and on human health. *Ecol. Lett.* **8**: 558–574.

Kaltenpoth, M., Göttler, W., Herzner, G., and Strohm, E. (2005) Symbiotic bacteria protect wasp larvae from fungal infestation. *Curr. Biol.* **15**: 475–479.

Kaltenpoth, M., Roeser-Mueller, K., Koehler, S., Peterson, A., Nechitaylo, T.Y., Stubblefield, J.W., et al. (2014) Partner choice and fidelity stabilize coevolution in a Cretaceous-age defensive symbiosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**: 6359–6364.

Kaltenpoth, M., Schmitt, T., Polidori, C., Koedam, D., and Strohm, E. (2010) Symbiotic streptomycetes in antennal glands of the South American digger wasp genus *Trachypus* (Hymenoptera, Crabronidae). *Physiol. Entomol.* **35**: 196–200.

Kambhampati, S., Black, W.C., 4th, and Rai, K.S. (1991) Geographic origin of the US and Brazilian *Aedes albopictus* inferred from allozyme analysis. *Heredity* **67 (Pt 1)**: 85–93.

Kambhampati, S., Rai, K.S., and Burgun, S.J. (1993) Unidirectional Cytoplasmic Incompatibility in the Mosquito, *Aedes albopictus*. *Evolution* **47**: 673.

Karunaratne, S.H.P.P., Weeraratne, T.C., Perera, M.D.B., and Surendran, S.N. (2013) Insecticide resistance and, efficacy of space spraying and larviciding in the control of dengue vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in Sri Lanka. *Pestic. Biochem. Physiol.* **107**: 98–105.

Kaufman, M.G. and Fonseca, D.M. (2014) Invasion biology of *Aedes japonicus japonicus* (Diptera: Culicidae). *Annu. Rev. Entomol.* **59**: 31–49.

Kempf, M., Abdissa, A., Diatta, G., Trape, J.-F., Angelakis, E., Mediannikov, O., et al. (2012) Detection of *Acinetobacter baumannii* in human head and body lice from Ethiopia and identification of new genotypes. *Int. J. Infect. Dis.* **16**: e680–e683.

Kesavaraju, B., Leisnham, P.T., Keane, S., Delisi, N., and Pozatti, R. (2014) Interspecific Competition between *Aedes albopictus* and *A. sierrensis*: Potential for Competitive Displacement in the Western United States. *PLoS ONE* **9**: e89698.

Kikuchi, Y. (2009) Endosymbiotic bacteria in insects: their diversity and culturability. *Microbes Environ. JSME* **24**: 195–204.

Kikuchi, Y., Hayatsu, M., Hosokawa, T., Nagayama, A., Tago, K., and Fukatsu, T. (2012) Symbiont-mediated insecticide resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201200231.

Kitrayapong, P., Baimai, V., and O'Neill, S.L. (2002) Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 108–111.

Kittayapong, P., Baisley, K.J., Sharpe, R.G., Baimai, V., and O'Neill, S.L. (2002a) Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 103–107.

Kittayapong, P., Baisley, K.J., Sharpe, R.G., Baimai, V., and O'Neill, S.L. (2002b) Maternal transmission efficiency of *Wolbachia* superinfections in *Aedes albopictus* populations in Thailand. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **66**: 103–107.

Kliot, A. and Ghanim, M. (2013) The role of bacterial chaperones in the circulative transmission of plant viruses by insect vectors. *Viruses* **5**: 1516–1535.

Klobucar, A., Merdić, E., Benić, N., Baklaić, Z., and Krcmar, S. (2006) First record of *Aedes albopictus* in Croatia. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **22**: 147–148.

Köhler, T., Dietrich, C., Scheffrahn, R.H., and Brune, A. (2012) High-resolution analysis of gut environment and bacterial microbiota reveals functional compartmentation of the gut in wood-feeding higher termites (*Nasutitermes* spp.). *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 4691–4701.

Koroiva, R., Souza, C.W.O., Toyama, D., Henrique-Silva, F., and Fonseca-Gessner, A.A. (2013) Lignocellulolytic enzymes and bacteria associated with the digestive tracts of *Stenochironomus* (Diptera: Chironomidae) larvae. *Genet. Mol. Res.* **12**:

Koukou, K., Pavlikaki, H., Kilias, G., Werren, J.H., Bourtzis, K., and Alahiotis, S.N. (2006) Influence of antibiotic treatment and *Wolbachia* curing on sexual isolation among *Drosophila melanogaster* cage populations. *Evolution* **60**: 87–96.

Kremer, N., Voronin, D., Charif, D., Mavingui, P., Mollereau, B., and Vavre, F. (2009) *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog.* **5**: e1000630.

Krieg, N.R., Parte, A., Ludwig, W., Whitman, W.B., Hedlund, B.P., Paster, B.J., et al. (2011) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 4: The Bacteroidetes, Spirochaetes, Tenericutes (Mollicutes), Acidobacteria, Fibrobacteres, Fusobacteria, Dictyoglomi, Gemmatimonadetes, Lentisphaerae, Verrucomicrobia, Chlamydiae, and Planctomycetes Springer Science & Business Media.

Kuranouchi, T., Nakamura, T., Shimamura, S., Kojima, H., Goka, K., Okabe, K., and Mochizuki, A. (2006) Nitrogen fixation in the stag beetle, *Dorcus* (Macrodorcus) *rectus* (Motschulsky) (Col., Lucanidae). *J. Appl. Entomol.* **130**: 471–472.

Labbé, G.M.C., Scaife, S., Morgan, S.A., Curtis, Z.H., and Alphey, L. (2012) Female-Specific Flightless (fsRIDL) Phenotype for Control of *Aedes albopictus*. *PLoS Negl Trop Dis* **6**: e1724.

Laird, M., Calder, L., Thornton, R.C., Syme, R., Holder, P.W., and Mogi, M. (1994) Japanese *Aedes albopictus* among four mosquito species reaching New Zealand in used tires. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **10**: 14–23.

Lal, B. and Khanna, S. (1996) Degradation of crude oil by *Acinetobacter calcoaceticus* and *Alcaligenes odorans*. *J. Appl. Bacteriol.* **81**: 355–362.

De Lamballerie, X., Leroy, E., Charrel, R.N., Ttsetsarkin, K., Higgs, S., and Gould, E.A. (2008) Chikungunya virus adapts to tiger mosquito via evolutionary convergence: a sign of things to come? *Virol. J.* **5**: 33.

Lambrecht, F.L. and Vanombren S (1971) Mosquitoes of the Chagos Archipelago, Indian Ocean. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* **2**: 483–5.

Lambrechts, L., Scott, T.W., and Gubler, D.J. (2010) Consequences of the expanding global distribution of *Aedes albopictus* for dengue virus transmission. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **4**: e646.

Lantova, L. and Volf, P. (2014) Mosquito and sand fly gregarines of the genus *Ascogregarina* and *Psychodiella* (Apicomplexa: Eugregarinorida, Aseptatorina) - Overview of their taxonomy, life cycle, host specificity and pathogenicity. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*

LaPointe, D.A. (2007) Current and potential impacts of mosquitoes and the pathogens they vector in the Pacific Region.

Laven, H. (1967) A possible model for speciation by cytoplasmic isolation in the *Culex pipiens* complex. *Bull. World Health Organ.* **37**: 263–266.

Lawson, P.A., Carlson, P., Wernersson, S., Moore, E.R.B., and Falsen, E. (2010) *Dysgonomonas hofstadii* sp. nov., isolated from a human clinical source. *Anaerobe* **16**: 161–164.

Lee, C.-M., Lee, Y.-S., Seo, S.-H., Yoon, S.-H., Kim, S.-J., Hahn, B.-S., et al. (2014) Screening and characterization of a novel cellulase gene from the gut microflora of *Hermetia illucens* using metagenomic library. *J. Microbiol. Biotechnol.*

Leroy, E.M., Nkoghe, D., Ollomo, B., Nze-Nkogue, C., Becquart, P., Grard, G., et al. (2009) Concurrent chikungunya and dengue virus infections during simultaneous outbreaks, Gabon, 2007. *Emerg. Infect. Dis.* **15**: 591–593.

Linley, J.R. (1989) Comparative fine structure of the eggs of Aedes albopictus, *Ae. aegypti*, and *Ae. bahamensis* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **26**: 510–521.

Linnenbrink, M., Wang, J., Hardouin, E.A., Künzel, S., Metzler, D., and Baines, J.F. (2013) The role of biogeography in shaping diversity of the intestinal microbiota in house mice. *Mol. Ecol.* **22**: 1904–1916.

Liu, H., Cupp, E.W., Guo, A., and Liu, N. (2004) Insecticide resistance in Alabama and Florida mosquito strains of *Aedes albopictus*. *J. Med. Entomol.* **41**: 946–952.

Lizé, A., McKay, R., and Lewis, Z. (2014) Kin recognition in *Drosophila*: the importance of ecology and gut microbiota. *ISME J.* **8**: 469–477.

Lo, N. and Eggleton, P. (2011) Termite phylogenetics and co-cladogenesis with symbionts. *Biology of Termites: a Modern Synthesis*. Springer Netherlands, pp. 27–50.

Login, F.H., Balmand, S., Vallier, A., Vincent-Monégat, C., Vigneron, A., Weiss-Gayet, M., et al. (2011) Antimicrobial Peptides Keep Insect Endosymbionts Under Control. *Science* **334**: 362–365.

Login, F.H. and Heddi, A. (2013) Insect immune system maintains long-term resident bacteria through a local response. *J. Insect Physiol.* **59**: 232–239.

Lounibos, L.P. (2002) Invasions by insect vectors of human disease. *Annu. Rev. Entomol.* **47**: 233–266.

Löwenberg Neto, P. and Navarro-Silva, M.A. (2004) Development, longevity, gonotrophic cycle and oviposition of *Aedes albopictus* Skuse (Diptera: Culicidae) under cyclic temperatures. *Neotrop. Entomol.* **33**: 29–33.

Lysyk, T.J., Kalischuk-Tymensen, L., Selinger, L.B., Lancaster, R.C., Wever, L., and Cheng, K.J. (1999) Rearing stable fly larvae (Diptera: Muscidae) on an egg yolk medium. *J. Med. Entomol.* **36**: 382–388.

Mains, J.W., Brelsfoard, C.L., Crain, P.R., Huang, Y., and Dobson, S.L. (2013) Population impacts of *Wolbachia* on *Aedes albopictus*. *Ecol. Appl. Publ. Ecol. Soc. Am.* **23**: 493–501.

Malar Sivanathan, M. (2006) The ecology and biology of *Aedes aegypti* (L.) and *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera : Culicidae) and the resistance status of *Aedes albopictus* (field strain) against organophosphates in Penang, Malaysia.

Malhotra, J., Dua, A., Saxena, A., Sangwan, N., Mukherjee, U., Pandey, N., et al. (2012) Genome sequence of *Acinetobacter* sp. strain HA, isolated from the gut of the polyphagous insect pest *Helicoverpa armigera*. *J. Bacteriol.* **194**: 5156.

Marten, G.G. (1990) Evaluation of cyclopoid copepods for *Aedes albopictus* control in tires. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **6**: 681–688.

Martinez, J., Longdon, B., Bauer, S., Chan, Y.-S., Miller, W.J., Bourtzis, K., et al. (2014) Symbionts commonly provide broad spectrum resistance to viruses in insects: a comparative analysis of *Wolbachia* Strains. *PLoS Pathog* **10**: e1004369.

Masella, A.P., Bartram, A.K., Truszkowski, J.M., Brown, D.G., and Neufeld, J.D. (2012) PANDAseq: paired-end assembler for illumina sequences. *BMC Bioinformatics* **13**: 31.

Mattingly, P.F. and Brown, E.S. (1955) The Mosquitos (Diptera: Culicidae) of the Seychelles. *Bull. Entomol. Res.* **46**: 69–110.

McCutcheon, J.P., McDonald, B.R., and Moran, N.A. (2009) Convergent evolution of metabolic roles in bacterial co-symbionts of insects. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 15394–15399.

McLain, D.K., Rai, K.S., and Fraser, M.J. (1987) Intraspecific and interspecific variation in the sequence and abundance of highly repeated DNA among mosquitoes of the *Aedes albopictus* subgroup. *Heredity* **58 (Pt 3)**: 373–381.

McMeniman, C.J., Lane, R.V., Cass, B.N., Fong, A.W.C., Sidhu, M., Wang, Y.-F., and O'Neill, S.L. (2009) Stable introduction of a life-shortening *Wolbachia* infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science* **323**: 141–144.

Medlock, J.M., Hansford, K.M., Schaffner, F., Versteirt, V., Hendrickx, G., Zeller, H., and Van Bortel, W. (2012) A review of the invasive mosquitoes in Europe: ecology, public health risks, and control options. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* **12**: 435–447.

Mengoni, A., Ricci, S., Brilli, M., Baldi, F., and Fani, R. (2007) Sequencing and analysis of plasmids pAV1 and pAV2 of *Acinetobacter venetianus* VE-C3 involved in diesel fuel degradation. *Ann. Microbiol.* **57**: 521–526.

Metzker, M.L. (2010) Sequencing technologies — the next generation. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 31–46.

Miller, M.R., Dunham, J.P., Amores, A., Cresko, W.A., and Johnson, E.A. (2007) Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Res.* **17**: 240–248.

Minard, G., Mavingui, P., and Moro, C.V. (2013) Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit. Vectors* **6**: 146.

Minard, G., Tran, F.-H., Dubost, A., Tran-Van, V., Mavingui, P., and Valiente Moro, C. (2014) Pyrosequencing 16S rRNA genes of bacteria associated with wild tiger mosquito *Aedes albopictus*: a pilot study. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**: 59.

Minard, G., Tran, F.H., Raharimalala, F.N., Hellard, E., Ravelonandro, P., Mavingui, P., and Valiente Moro, C. (2013) Prevalence, genomic and metabolic profiles of *Acinetobacter* and *Asaia* associated with field-caught *Aedes albopictus* from Madagascar. *FEMS Microbiol. Ecol.* **83**: 63–73.

Miyagi, I., Toma, T., and Mogi, M. (1992) Biological control of container-breeding mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*, in a Japanese island by release of *Toxorhynchites splendens* adults. *Med. Vet. Entomol.* **6**: 290–300.

Moll, R.M., Romoser, W.S., Modrzakowski, M.C., Moncayo, A.C., and Lerdthusnee, K. (2001) Meconial peritrophic membranes and the fate of midgut bacteria during mosquito (Diptera: Culicidae) metamorphosis. *J. Med. Entomol.* **38**: 29–32.

Montllor, C.B., Maxmen, A., and Purcell, A.H. (2002) Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrthosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.* **27**: 189–195.

Moore, C.G. and Mitchell, C.J. (1997) *Aedes albopictus* in the United States: ten-year presence and public health implications. *Emerg. Infect. Dis.* **3**: 329–334.

Morales, S.E. and Holben, W.E. (2011) Linking bacterial identities and ecosystem processes: can "omic" analyses be more than the sum of their parts? *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**: 2–16.

Moran, N.A., Degnan, P.H., Santos, S.R., Dunbar, H.E., and Ochman, H. (2005) The players in a mutualistic symbiosis: Insects, bacteria, viruses, and virulence genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**: 16919–16926.

Moran, N.A., Hansen, A.K., Powell, J.E., and Sabree, Z.L. (2012) Distinctive gut microbiota of honey bees assessed using deep sampling from individual worker bees. *PloS One* **7**: e36393.

Vaz-Moreira, I., Nunes, O.C., and Manaia, C.M. (2011) Diversity and Antibiotic Resistance Patterns of Sphingomonadaceae Isolates from Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 5697–5706.

Moreira, L.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J.A., Lu, G., Pyke, A.T., Hedges, L.M., et al. (2009) A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and *Plasmodium*. *Cell* **139**: 1268–1278.

Mousson, L., Dauga, C., Garrigues, T., Schaffner, F., Vazeille, M., and Failloux, A.-B. (2005) Phylogeography of *Aedes* (Stegomyia) *aegypti* (L.) and *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) based on mitochondrial DNA variations. *Genet. Res.* **86**: 1–11.

Mousson, L., Martin, E., Zouache, K., Madec, Y., Mavingui, P., and Failloux, A.B. (2010) *Wolbachia* modulates Chikungunya replication in *Aedes albopictus*. *Mol. Ecol.* **19**: 1953–1964.

Mousson, L., Zouache, K., Arias-Goeta, C., Raquin, V., Mavingui, P., and Failloux, A.-B. (2012) The native *Wolbachia* Symbionts limit transmission of Dengue virus in *Aedes albopictus*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1989.

Mullins, D.E. and Cochran, D.G. (1974) Nitrogen Metabolism in the American Cockroach: An Examination of Whole Body and Fat Body Regulation of Cations in Response to Nitrogen Balance. *J. Exp. Biol.* **61**: 557–570.

Munson, M.A., Baumann, P., and Kinsey, M.G. (1991) Buchnera gen. nov. and Buchnera aphidicola sp. nov., a taxon consisting of the mycetocyte-associated, primary endosymbionts of *Aphids*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **41**: 566–568.

Murrell, E.G. and Juliano, S.A. (2008) Detritus type alters the outcome of interspecific competition between *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **45**: 375–383.

Nazni, W.A., Seleena, B., Lee, H.L., Jeffery, J., T Rogayah, T. a. R., and Sofian, M.A. (2005) Bacteria fauna from the house fly, *Musca domestica* (L.). *Trop. Biomed.* **22**: 225–231.

Ni, J. and Tokuda, G. (2013) Lignocellulose-degrading enzymes from termites and their symbiotic microbiota. *Biotechnol. Adv.* **31**: 838–850.

Nikoh, N., Hosokawa, T., Moriyama, M., Oshima, K., Hattori, M., and Fukatsu, T. (2014) Evolutionary origin of insect–*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 201409284.

Noda, S., Ohkuma, M., Usami, R., Horikoshi, K., and Kudo, T. (1999) Culture-independent characterization of a gene responsible for nitrogen fixation in the symbiotic microbial community in the gut of the termite *Neotermes koshunensis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4935–4942.

Nogge, G. (1976) Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. *Experientia* **32**: 995–996.

Ochman, H., Worobey, M., Kuo, C.-H., Ndjango, J.-B.N., Peeters, M., Hahn, B.H., and Hugenholtz, P. (2010) Evolutionary relationships of wild hominids recapitulated by gut microbial communities. *PLoS Biol.* **8**: e1000546.

Oh, D.-C., Poulsen, M., Currie, C.R., and Clardy, J. (2009) Dentigerumycin: a bacterial mediator of an ant-fungus symbiosis. *Nat. Chem. Biol.* **5**: 391–393.

Oksanen, J., Blanchet, F.G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P.R., O'Hara, R.B., et al. (2013) vegan: Community Ecology Package.

Oliver, K.M., Russell, J.A., Moran, N.A., and Hunter, M.S. (2003) Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**: 1803–1807.

Osei-Poku, J., Mbogo, C.M., Palmer, W.J., and Jiggins, F.M. (2012) Deep sequencing reveals extensive variation in the gut microbiota of wild mosquitoes from Kenya. *Mol. Ecol.* **21**: 5138–5150.

Ozcan, N., Dal, T., Tekin, A., Kelekci, S., Can, S., Ezin, O., et al. (2013) Is *Chryseobacterium indologenes* a shunt-lover bacterium? A case report and review of the literature. *Infez. Med. Riv. Period. Eziologia Epidemiol. Diagn. Clin. E Ter. Delle Patol. Infett.* **21**: 312–316.

Pais, R., Lohs, C., Wu, Y., Wang, J., and Aksoy, S. (2008) The obligate mutualist *Wigglesworthia glossinidia* influences reproduction, digestion, and immunity processes of its host, the tsetse fly. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**: 5965–5974.

Parola, P., de Lamballerie, X., Jourdan, J., Rovery, C., Vaillant, V., Minodier, P., et al. (2006) Novel Chikungunya Virus Variant in Travelers Returning from Indian Ocean Islands. *Emerg. Infect. Dis.* **12**: 1493–1499.

Patsoula, E., Samanidou-Voyadjoglou, A., Spanakos, G., Kremastinou, J., Nasioulas, G., and Vakalis, N.C. (2006) Molecular and morphological characterization of *Aedes albopictus* in northwestern Greece and differentiation from *Aedes cretinus* and *Aedes aegypti*. *J. Med. Entomol.* **43**: 40–54.

Paul Gatt, J.C.D. (2009) First record of *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* (Skuse)(Diptera: Culicidae) in Malta. *Eur. Mosq. Bull. J. Eur. Mosq. Control Assoc. ISSN* **27**: 56–64.

Paupy, C., Delatte, H., Bagny, L., Corbel, V., and Fontenille, D. (2009) *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: from the darkness to the light. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* **11**: 1177–1185.

Paupy, C., Kassa Kassa, F., Caron, M., Nkoghé, D., and Leroy, E.M. (2012) A chikungunya outbreak associated with the vector *Aedes albopictus* in remote villages of Gabon. *Vector Borne Zoonotic Dis. Larchmt. N* **12**: 167–169.

Pernice, M., Simpson, S.J., and Ponton, F. (2014) Towards an integrated understanding of gut microbiota using insects as model systems. *J. Insect Physiol.*

Perru, O. (2007) Les insectes et leurs endosymbiotes, leur découverte de blochmann à Buchner (1880-1930) -Première partie. *Bull. Mens. Société Linn. Lyon* **76**: 11–18.

Petrosino, J.F., Highlander, S., Luna, R.A., Gibbs, R.A., and Versalovic, J. (2009) Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin. Chem.* **55**: 856–866.

Pidiyar, V.J., Jangid, K., Patole, M.S., and Shouche, Y.S. (2004) Studies on cultured and uncultured microbiota of wild culex quinquefasciatus mosquito midgut based on 16s ribosomal RNA gene analysis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **70**: 597–603.

Pluskota, B., Storch, V., Braunbeck, T., Beck, M., and Becker, N. (2008) First record of *Stegomyia albopicta* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Germany. *Eur. Mosq. Bull.* **26**: 1–5.

Pontes, M.H., Smith, K.L., De Vooght, L., Van Den Abbeele, J., and Dale, C. (2011) Attenuation of the Sensing Capabilities of PhoQ in Transition to Obligate Insect–Bacterial Association. *PLoS Genet* **7**: e1002349.

Porretta, D., Mastrantonio, V., Bellini, R., Somboon, P., and Urbanelli, S. (2012) Glacial history of a modern invader: phylogeography and species distribution modelling of the Asian tiger mosquito *Aedes albopictus*. *PloS One* **7**: e44515.

Potrikus, C.J. and Breznak, J.A. (1981) Gut bacteria recycle uric acid nitrogen in termites: A strategy for nutrient conservation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **78**: 4601–4605.

Potrikus, C.J. and Breznak, J.A. (1977) Nitrogen-fixing Enterobacter agglomerans isolated from guts of wood-eating termites. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 392–399.

Prado, S.S., Golden, M., Follett, P.A., Daugherty, M.P., and Almeida, R.P.P. (2009) Demography of Gut Symbiotic and Aposymbiotic *Nezara viridula* L. (Hemiptera: Pentatomidae). *Environ. Entomol.* **38**: 103–109.

Pusey, P.L. (1999) Effect of nectar on microbial antagonists evaluated for use in control of fire blight of pome fruits. *Phytopathology* **89**: 39–46.

Qin, J., Li, R., Raes, J., Arumugam, M., Burgdorf, K.S., Manichanh, C., et al. (2010) A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature* **464**: 59–65.

Raharimalala, F.N. (2011) Role des moustiques culicidae, de leurs communautes microbiennes, et des reservoirs vertebres, dans la transmission d'arbovirus a Madagascar. Thèse soutenue à l'*Université de Lyon* et l'*Université d'Antananarivo.*

Raharimalala, F.N., Ravaomanarivo, L.H., Ravelonandro, P., Rafarasoa, L.S., Zouache, K., Tran-Van, V., et al. (2012) Biogeography of the two major arbovirus mosquito vectors, *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera, Culicidae), in Madagascar. *Parasit. Vectors* **5**: 56.

Ramirez, J.L., Souza-Neto, J., Torres Cosme, R., Rovira, J., Ortiz, A., Pascale, J.M., and Dimopoulos, G. (2012) Reciprocal tripartite interactions between the *Aedes aegypti* midgut microbiota, innate immune system and dengue virus influences vector competence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**: e1561.

Ramírez-Puebla, S.T., Rosenblueth, M., Chávez-Moreno, C.K., de Lyra, M.C.C.P., Tecante, A., and Martínez-Romero, E. (2010) Molecular phylogeny of the genus *Dactylopius* (Hemiptera: Dactylopiidae) and identification of the symbiotic bacteria. *Environ. Entomol.* **39**: 1178–1183.

Rani, A., Sharma, A., Rajagopal, R., Adak, T., and Bhatnagar, R.K. (2009) Bacterial diversity analysis of larvae and adult midgut microflora using culture-dependent and culture-

independent methods in lab-reared and field-collected *Anopheles stephensi*-an Asian malarial vector. *BMC Microbiol.* **9**: 96.

Raquin, V. (2012) Immunité innée et multi-infections chez le moustique (Diptera, Culicidae) : étude fonctionnelle des interactions *Wolbachia*-arbovirus-*Aedes albopictus.* Thèse soutenue à l'*Université de Lyon.*

Rasgon, J.L., Cornel, A.J., and Scott, T.W. (2006) Evolutionary history of a mosquito endosymbiont revealed through mitochondrial hitchhiking. *Proc. Biol. Sci.* **273**: 1603–1611.

Ratsitorahina, M., Harisoa, J., Ratovonjato, J., Biacabe, S., Reynes, J.-M., Zeller, H., et al. (2008) Outbreak of dengue and Chikungunya fevers, Toamasina, Madagascar, 2006. *Emerg. Infect. Dis.* **14**: 1135–1137.

Ravi, V. (2006) Re-emergence of chikungunya virus in India. *Indian J. Med. Microbiol.* **24**: 83–84.

Rawls, J.F., Mahowald, M.A., Ley, R.E., and Gordon, J.I. (2006) Reciprocal Gut Microbiota Transplants from Zebrafish and Mice to Germ-free Recipients Reveal Host Habitat Selection. *Cell* **127**: 423–433.

Rey, J.R., O'Connell, S., Suárez, S., Menéndez, Z., Lounibos, L.P., and Byer, G. (2004) Laboratory and field studies of *Macrocyclops albidus* (Crustacea: Copepoda) for biological control of mosquitoes in artificial containers in a subtropical environment. *J. Vector Ecol. J. Soc. Vector Ecol.* **29**: 124–134.

Reynolds, J.A., Poelchau, M.F., Rahman, Z., Armbruster, P.A., and Denlinger, D.L. (2012) Transcript profiling reveals mechanisms for lipid conservation during diapause in the mosquito, *Aedes albopictus*. *J. Insect Physiol.* **58**: 966–973.

Rezza, G. (2012) Aedes albopictus and the reemergence of Dengue. *BMC Public Health* **12**: 72.

Rezza, G., Nicoletti, L., Angelini, R., Romi, R., Finarelli, A.C., Panning, M., et al. (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* **370**: 1840–1846.

Ricci, I., Damiani, C., Capone, A., Defreece, C., Rossi, P., and Favia, G. (2012) Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**: 278–284.

Ricci, I., Damiani, C., Capone, A., Defreece, C., Rossi, P., and Favia, G. (2012) Mosquito/microbiota interactions: from complex relationships to biotechnological perspectives. *Curr. Opin. Microbiol.* **15**: 278–284.

Richards, V.P., Choi, S.C., Pavinski Bitar, P.D., Gurjar, A.A., and Stanhope, M.J. (2013) Transcriptomic and genomic evidence for *Streptococcus agalactiae* adaptation to the bovine environment. *BMC Genomics* **14**: 920.

Ridley, E.V., Wong, A.C.-N., Westmiller, S., and Douglas, A.E. (2012) Impact of the resident microbiota on the nutritional phenotype of *Drosophila melanogaster*. *PloS One* **7**: e36765.

Ritter, S., Michalski, S.G., Settele, J., Wiemers, M., Fric, Z.F., Sielezniew, M., et al. (2013) *Wolbachia* Infections Mimic Cryptic Speciation in Two Parasitic Butterfly Species, *Phengaris teleius* and *P. nausithous* (Lepidoptera: Lycaenidae). *PLoS ONE* **8**: e78107.

Rodrigues, J., Brayner, F.A., Alves, L.C., Dixit, R., and Barillas-Mury, C. (2010) Hemocyte Differentiation Mediates Innate Immune Memory in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Science* **329**: 1353–1355.

Rohwer, F., Seguritan, V., Azam, F., and Knowlton, N. (2002) Diversity and distribution of coral-associated bacteria. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* **243**: 1–10.

Rolff, J., Reynolds, S., and London, R.E.S. of (2009) Insect infection and immunity: evolution, ecology, and mechanisms Oxford University Press.

Ros, V.I.D., Fleming, V.M., Feil, E.J., and Breeuwer, J.A.J. (2009) How Diverse Is the Genus *Wolbachia*? Multiple-Gene Sequencing Reveals a Putatively New *Wolbachia* Supergroup Recovered from Spider Mites (Acari: Tetranychidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 1036–1043.

Rosen, L., Shroyer, D.A., Tesh, R.B., Freier, J.E., and Lien, J.C. (1983) Transovarial transmission of dengue viruses by mosquitoes: *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **32**: 1108–1119.

Rosenberg, E. and Zilber-Rosenberg, I. (2014) The Hologenome Concept: Human, Animal and Plant Microbiota Édition : 1. Springer International Publishing.

Rozeboom, L.E. and Bridges, J.R. (1972) Relative population densities of *Aedes albopictus* and *A. guamensis* on Guam. *Bull. World Health Organ.* **46**: 477–483.

Rueda, L.M. (2004) Pictorial keys for the identification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) associated with dengue virus transmission. 1–60.

Russell, J.A. and Moran, N.A. (2006) Costs and benefits of symbiont infection in aphids: variation among symbionts and across temperatures. *Proc. Biol. Sci.* **273**: 603–610.

Sabatini, A., Ravineri, A., Trovato, G., and Coluzzi, M. (1990) *Aedes albopictus* in Italy and possible diffusion of the species into the Mediterranean area. *Parassitologia* **32**: 301–304.

Saboia-Vahia, L., Cuervo, P., Borges-Veloso, A., Souza, N.P. de, Britto, C., Dias-Lopes, G., and Jesus, J.B.D. (2014) The midgut of *Aedes albopictus* females expresses active trypsin-like serine peptidases. *Parasit. Vectors* **7**: 253.

Sabree, Z.L., Kambhampati, S., and Moran, N.A. (2009) Nitrogen recycling and nutritional provisioning by *Blattabacterium*, the cockroach endosymbiont. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 19521–19526.

Salter, S., Cox, M.J., Turek, E.M., Calus, S.T., Cookson, W.O., Moffatt, M.F., et al. (2014) Reagent contamination can critically impact sequence-based microbiome analyses. *bioRxiv* 007187.

Santos, L.U. dos and Andrade, C.F.S. de (1997) Survey of cyclopids (Crustacea, Copepoda) in Brazil and preliminary screening of their potential as dengue vector predators. *Rev. Saúde Pública* **31**: 221–226.

Sassera, D., Epis, S., Pajoro, M., and Bandi, C. (2013) Microbial symbiosis and the control of vector-borne pathogens in tsetse flies, human lice, and triatomine bugs. *Pathog. Glob. Health* **107**: 285–292.

Sauer, C., Stackebrandt, E., Gadau, J., Hölldobler, B., and Gross, R. (2000) Systematic relationships and cospeciation of bacterial endosymbionts and their carpenter ant host species: proposal of the new taxon *Candidatus blochmannia* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 5**: 1877–1886.

Scarborough, C.L., Ferrari, J., and Godfray, H.C.J. (2005) Aphid protected from pathogen by endosymbiont. *Science* **310**: 1781.

Schaffner, F., Van Bortel, W., and Coosemans, M. (2004) First record of *Aedes* (Stegomyia) *albopictus* in Belgium. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **20**: 201–203.

Schaffner, F. and Karch, S. (2000) First report of *Aedes albopictus* (Skuse, 1984) in metropolitan France. *Comptes Rendus Académie Sci. Sér. III Sci. Vie* **323**: 373–375.

Schembri, M.A., Bayly, R.C., and Davies, J.K. (1994) Cloning and analysis of the polyhydroxyalkanoic acid synthase gene from an *Acinetobacter* sp.: evidence that the gene is both plasmid and chromosomally located. *FEMS Microbiol. Lett.* **118**: 145–152.

Schloss, P.D., Gevers, D., and Westcott, S.L. (2011) Reducing the Effects of PCR Amplification and Sequencing Artifacts on 16S rRNA-Based Studies. *PLoS ONE* **6**: e27310.

Schloss, P.D., Westcott, S.L., Ryabin, T., Hall, J.R., Hartmann, M., Hollister, E.B., et al. (2009) Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **75**: 7537–7541.

Scholte, E.J. and Schaffner, F. (2007) Waiting for the tiger: establishment and spread of the *Aedes albopictus* mosquito in Europe. *Ecol. Control Vector-Borne Dis. Vol. 1* 241–260.

Scholte, E.-J., Takken, W., and Knols, B.G.J. (2007) Infection of adult *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* mosquitoes with the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Acta Trop.* **102**: 151–158.

Schuffenecker, I., Iteman, I., Michault, A., Murri, S., Frangeul, L., Vaney, M.-C., et al. (2006) Genome microevolution of chikungunya viruses causing the Indian Ocean outbreak. *PLoS Med.* **3**: e263.

La Scola, B. and Raoult, D. (2004) *Acinetobacter baumannii* in Human Body Louse. *Emerg. Infect. Dis.* **10**: 1671–1673.

Shaikevich, E. and Talbalaghi, A. (2013) Molecular Characterization of the Asian Tiger Mosquito *Aedes albopictus* (Skuse) (Diptera: Culicidae) in Northern Italy. *ISRN Entomol.* **2013**: 1–6.

Shi, W., Syrenne, R., Sun, J.-Z., and Yuan, J.S. (2010) Molecular approaches to study the insect gut symbiotic microbiota at the “omics” age. *Insect Sci.* **17**: 199–219.

Simard, F., Nchoutpouen, E., Toto, J.C., and Fontenille, D. (2005) Geographic distribution and breeding site preference of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: culicidae) in Cameroon, Central Africa. *J. Med. Entomol.* **42**: 726–731.

Singh, S.T., Priya, N.G., Kumar, J., Rana, V.S., Ellango, R., Joshi, A., et al. (2012) Diversity and phylogenetic analysis of endosymbiotic bacteria from field caught *Bemisia tabaci* from different locations of North India based on 16S rDNA library screening. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **12**: 411–419.

Sinkins, S.P., Braig, H.R., and O’Neill, S.L. (1995) *Wolbachia* superinfections and the expression of cytoplasmic incompatibility. *Proc. Biol. Sci.* **261**: 325–330.

Smith, A. and Carter, I.D. (1984) International transportation of mosquitoes of public health importance., pp. 1–21.

Sogorb, M.A. and Vilanova, E. (2002) Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. *Toxicol. Lett.* **128**: 215–228.

Sommer, S. (2005) The importance of immune gene variability (MHC) in evolutionary ecology and conservation. *Front. Zool.* **2**: 16.

Sota, T. and Mogi, M. (1992) Survival time and resistance to desiccation of diapause and non-diapause eggs of temperate *Aedes* (Stegomyia) mosquitoes. *Entomol. Exp. Appl.* **63**: 155–161.

Spielman, A. (1971) Bionomics of autogenous mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* **16**: 231–248.

Spielman, A. and Wong, J. (1974) Dietary factors stimulating oogenesis in *Aedes aegypti*. *Biol. Bull.* **147**: 433–442.

Sprenger, D. and Wuithiranyagool, T. (1986) The discovery and distribution of *Aedes albopictus* in Harris County, Texas. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **2**: 217–219.

Sudakaran, S., Salem, H., Kost, C., and Kaltenpoth, M. (2012) Geographical and ecological stability of the symbiotic mid-gut microbiota in European firebugs, *Pyrrhocoris apterus* (Hemiptera, Pyrrhocoridae). *Mol. Ecol.* **21**: 6134–6151.

Šustr, V., Stingl, U., and Brune, A. (2014) Microprofiles of oxygen, redox potential, and pH, and microbial fermentation products in the highly alkaline gut of the saprophagous larva of *Penthetria holosericea* (Diptera: Bibionidae). *J. Insect Physiol.* **67**: 64–69.

Tagliavia, M., Messina, E., Manachini, B., Cappello, S., and Quatrini, P. (2014) The gut microbiota of larvae of *Rhynchophorus ferrugineus* Oliver (Coleoptera: Curculionidae). *BMC Microbiol.* **14**: 136.

Tanaka, K., Mizusawa, K., and Saugstad, E.S. (1979) A Revision of the Adult and Larval Mosquitoes of Japan (Including the Ryukyu Archipelago and the Ogasawara Islands) and Korea (Diptera: Culicidae).

Teixeira, L., Ferreira, A., and Ashburner, M. (2008) The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* **6**: e2.

Telschow, A., Hammerstein, P., and Werren, J.H. (2005) The effect of *Wolbachia* versus genetic incompatibilities on reinforcement and speciation. *Evol. Int. J. Org. Evol.* **59**: 1607–1619.

Teo, J., Tan, S.Y.-Y., Liu, Y., Tay, M., Ding, Y., Li, Y., et al. (2014) Comparative genomic analysis of malaria mosquito vector-associated novel pathogen *Elizabethkingia anophelis*. *Genome Biol. Evol.* **6**: 1158–1165.

Terenius, O., Lindh, J.M., Eriksson-Gonzales, K., Bussière, L., Laugen, A.T., Bergquist, H., et al. (2012) Midgut bacterial dynamics in *Aedes aegypti*. *FEMS Microbiol. Ecol.*

Toft, C. and Andersson, S.G.E. (2010) Evolutionary microbial genomics: insights into bacterial host adaptation. *Nat. Rev. Genet.* **11**: 465–475.

Tortosa, P., Charlat, S., Labbé, P., Dehecq, J.-S., Barré, H., and Weill, M. (2010) *Wolbachia* age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: a host evolutionary response to cytoplasmic incompatibility? *PloS One* **5**: e9700.

Tortosa, P., Courtiol, A., Moutailler, S., Failloux, A.-B., and Weill, M. (2008) Chikungunya-*Wolbachia* interplay in *Aedes albopictus*. *Insect Mol. Biol.* **17**: 677–684.

Trauer, U. and Hilker, M. (2013) Parental Legacy in Insects: Variation of Transgenerational Immune Priming during Offspring Development. *PLoS ONE* **8**: e63392.

Tsai, C.G., Gates, D.M., Ingledew, W.M., and Jones, G.A. (1976) Products of anaerobic phloroglucinol degradation by *Coprococcus* sp. Pe15. *Can. J. Microbiol.* **22**: 159–164.

Tsavkelova, E.A., Cherdyntseva, T.A., Botina, S.G., and Netrusov, A.I. (2007) Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbiol. Res.* **162**: 69–76.

Tseng, M. (2007) Ascogregarine parasites as possible biocontrol agents of mosquitoes. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **23**: 30–34.

Tsetsarkin, K.A., Chen, R., Yun, R., Rossi, S.L., Plante, K.S., Guerbois, M., et al. (2014) Multi-peaked adaptive landscape for chikungunya virus evolution predicts continued fitness optimization in *Aedes albopictus* mosquitoes. *Nat. Commun.* **5**:

Urbanski, J.M., Benoit, J.B., Michaud, M.R., Denlinger, D.L., and Armbruster, P. (2010) The molecular physiology of increased egg desiccation resistance during diapause in the invasive mosquito, *Aedes albopictus*. *Proc. Biol. Sci.* **277**: 2683–2692.

Valiente Moro, C., Tran, F.H., Nantenaina Raharimalala, F., Ravelonandro, P., and Mavingui, P. (2013) Diversity of culturable bacteria including *Pantoea* in wild mosquito *Aedes albopictus*. *BMC Microbiol.* **13**: 70.

Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P., and Boulétreau, M. (1999) Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1711–1723.

Vega-Rua, A., Zouache, K., Caro, V., Diancourt, L., Delaunay, P., Grandadam, M., and Failloux, A.-B. (2013) High efficiency of temperate *Aedes albopictus* to transmit chikungunya and dengue viruses in the Southeast of France. *PloS One* **8**: e59716.

Vega-Rúa, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B., and Lourenço-de-Oliveira, R. (2014) High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. *J. Virol.* **88**: 6294–6306.

Vestheim, H., Deagle, B.E., and Jarman, S.N. (2011) Application of blocking oligonucleotides to improve signal-to-noise ratio in a PCR. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **687**: 265–274.

Vestheim, H. and Jarman, S.N. (2008) Blocking primers to enhance PCR amplification of rare sequences in mixed samples - a case study on prey DNA in Antarctic krill stomachs. *Front. Zool.* **5**: 12.

Vezzani, D. (2007) Review: artificial container-breeding mosquitoes and cemeteries: a perfect match. *Trop. Med. Int. Health TM IH* **12**: 299–313.

Vontas, J., Kioulos, E., Pavlidi, N., Morou, E., della Torre, A., and Ranson, H. (2012) Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **104**: 126–131.

Voronin, D., Cook, D.A.N., Steven, A., and Taylor, M.J. (2012) Autophagy regulates *Wolbachia* populations across diverse symbiotic associations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: E1638–E1646.

Wang, J., Wu, Y., Yang, G., and Aksoy, S. (2009) Interactions between mutualist *Wigglesworthia* and tsetse peptidoglycan recognition protein (PGRP-LB) influence trypanosome transmission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**: 12133–12138.

Wang, Q., Garrity, G.M., Tiedje, J.M., and Cole, J.R. (2007) Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 5261–5267.

Wang, S., Ghosh, A.K., Bongio, N., Stebbings, K.A., Lampe, D.J., and Jacobs-Lorena, M. (2012) Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**: 12734–12739.

Wang, Y., Gilbreath, T.M., 3rd, Kukutla, P., Yan, G., and Xu, J. (2011) Dynamic gut microbiome across life history of the malaria mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PloS One* **6**: e24767.

Ward, R.A. (1984) Mosquito fauna of Guam: case history of an introduced fauna., pp. 143–162.

Ware, G.W. (1980) Effects of pesticides on nontarget organisms. In, Gunther,F.A. and Gunther,J.D. (eds), *Residue Reviews*, Residue Reviews. Springer New York, pp. 173–201.

Warnecke, F., Luginbühl, P., Ivanova, N., Ghassemian, M., Richardson, T.H., Stege, J.T., et al. (2007) Metagenomic and functional analysis of hindgut microbiota of a wood-feeding higher termite. *Nature* **450**: 560–565.

Weeks, A.R., Turelli, M., Harcombe, W.R., Reynolds, K.T., and Hoffmann, A.A. (2007) From parasite to mutualist: rapid evolution of *Wolbachia* in natural populations of Drosophila. *PLoS Biol.* **5**: e114.

Wei, T., Ishida, R., Miyanaga, K., and Tanji, Y. (2014) Seasonal variations in bacterial communities and antibiotic-resistant strains associated with green bottle flies (Diptera: Calliphoridae). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **98**: 4197–4208.

Weiss, B. and Aksoy, S. (2011) Microbiome influences on insect host vector competence. *Trends Parasitol.* **27**: 514–522.

Welchman, D.P., Aksoy, S., Jiggins, F., and Lemaitre, B. (2009) Insect immunity: from pattern recognition to symbiont-mediated host defense. *Cell Host Microbe* **6**: 107–114.

Werren, J.H., Baldo, L., and Clark, M.E. (2008) *Wolbachia*: master manipulators of invertebrate biology. *Nat. Rev. Microbiol.* **6**: 741–751.

Werren, J.H., Zhang, W., and Guo, L.R. (1995) Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proc. Biol. Sci.* **261**: 55–63.

Whitman, W.B., Coleman, D.C., and Wiebe, W.J. (1998) Prokaryotes: The unseen majority. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**: 6578–6583.

Winstanley, C., Taylor, S.C., and Williams, P.A. (1987) pWW174: a large plasmid from *Acinetobacter calcoaceticus* encoding benzene catabolism by the beta-ketoadipate pathway. *Mol. Microbiol.* **1**: 219–227.

Von Wintzingerode, F., Göbel, U.B., and Stackebrandt, E. (1997) Determination of microbial diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. *FEMS Microbiol. Rev.* **21**: 213–229.

Wiwatanaratanabutr, I. and Kittayapong, P. (2009) Effects of crowding and temperature on *Wolbachia* infection density among life cycle stages of *Aedes albopictus*. *J. Invertebr. Pathol.* **102**: 220–224.

Wright, J.D. and Barr, A.R. (1981) *Wolbachia* and the normal and incompatible eggs of *Aedes polynesiensis* (Diptera: Culicidae). *J. Invertebr. Pathol.* **38**: 409–418.

Wrzosek, L., Miquel, S., Noordine, M.-L., Bouet, S., Joncquel Chevalier-Curt, M., Robert, V., et al. (2013) Bacteroides thetaiotaomicron and *Faecalibacterium prausnitzii* influence the production of mucus glycans and the development of goblet cells in the colonic epithelium of a gnotobiotic model rodent. *BMC Biol.* **11**: 61.

Wymann, M.N., Flacio, E., Radczuweit, S., Patocchi, N., and Luthy, P. (2008) Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*) - a threat for Switzerland? *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **13**:

Xi, Z., Ramirez, J.L., and Dimopoulos, G. (2008) The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection. *PLoS Pathog.* **4**: e1000098.

Yamada, Y., Katsura, K., Kawasaki, H., Widyastuti, Y., Saono, S., Seki, T., et al. (2000) *Asaia* bogorensis gen. nov., sp. nov., an unusual acetic acid bacterium in the alpha-Proteobacteria. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50 Pt 2**: 823–829.

Yamada, Y. and Yukphan, P. (2008) Genera and species in acetic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **125**: 15–24.

Yang, P. (2006) Laboratory study of predation by *Curinus coeruleus* (Coleoptera: Coccinellidae) on eggs of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae).

Yang, Y.-J., Zhang, N., Ji, S.-Q., Lan, X., Zhang, K., Shen, Y.-L., et al. (2014) *Dysgonomonas macrotermitis* sp. nov., isolated from the hindgut of a fungus-growing termite. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*

Yee, D.A. (2008) Tires as habitats for mosquitoes: a review of studies within the eastern United States. *J. Med. Entomol.* **45**: 581–593.

Yee, D.A. and Juliano, S.A. (2006) Consequences of detritus type in an aquatic microsystem: effects on water quality, micro-organisms and performance of the dominant consumer. *Freshw. Biol.* **51**: 448–459.

Yee, D.A., Kaufman, M.G., and Juliano, S.A. (2007) The significance of ratios of detritus types and micro-organism productivity to competitive interactions between aquatic insect detritivores. *J. Anim. Ecol.* **76**: 1105–1115.

Yee, D.A. and Skiff, J.F. (2014) Interspecific competition of a new invasive mosquito, *Culex coronator*, and two container mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Cx. quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae), across different detritus environments. *J. Med. Entomol.* **51**: 89–96.

Yen, J.H. and Barr, A.R. (1973) The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. *J. Invertebr. Pathol.* **22**: 242–250.

Zayed, M.E. and Bream, A.S. (2004) Biodiversity of the microbial flora associated with two strains of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.* **69**: 229–234.

Zhang, L., Zhang, Q., Huang, E., Li, M., Huang, T., Xu, L., et al. (2012) A differentially displayed mRNA related to resistance to Bacillus thuringiensis israelensis of *Aedes albopictus* selected in vitro-activated Cyt1Aa6. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **28**: 327–329.

Zhang, M., Liu, N., Qian, C., Wang, Q., Wang, Q., Long, Y., et al. (2014) Phylogenetic and Functional Analysis of Gut Microbiota of a Fungus-Growing Higher Termite: Bacteroidetes from Higher Termites Are a Rich Source of β-Glucosidase Genes. *Microb. Ecol.* **68**: 416–425.

Zhang, X., Lin, L., Zhu, Z., Yang, X., Wang, Y., and An, Q. (2013) Colonization and modulation of host growth and metal uptake by endophytic bacteria of Sedum alfredii. *Int. J. Phytoremediation* **15**: 51–64.

Zhou, W., Rousset, F., and O'Neill, S. (1998) Phylogeny and PCR–based classification of *Wolbachia* strains using wsp gene sequences. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **265**: 509–515.

Zilber-Rosenberg, I. and Rosenberg, E. (2008) Role of microorganisms in the evolution of animals and plants: the hologenome theory of evolution. *FEMS Microbiol. Rev.* **32**: 723–735.

Zouache, K., Interactions multipartites entre communautes symbiotiques, pathogenes et vecteurs : le systeme vectoriel bacteries endosymbiotiques - virus Chikungunya - moustiques *Aedes*. Thèse soutenue en 2010. *Université de Lyon*

Zouache, K., Michelland, R.J., Failloux, A.-B., Grundmann, G.L., and Mavingui, P. (2012) Chikungunya virus impacts the diversity of symbiotic bacteria in mosquito vector. *Mol. Ecol.* **21**: 2297–2309.

Zouache, K., Raharimalala, F.N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L.H.R., Ravelonandro, P., and Mavingui, P. (2011) Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**: 377–389.

Zouache, K., Voronin, D., Tran-Van, V., Mousson, L., Failloux, A.-B., and Mavingui, P. (2009) Persistent *Wolbachia* and cultivable bacteria infection in the reproductive and somatic tissues of the mosquito vector *Aedes albopictus*. *PloS One* **4**: e6388.

Zug, R. and Hammerstein, P. (2014) Bad guys turned nice? A critical assessment of *Wolbachia* mutualisms in arthropod hosts. *Biol. Rev.* n/a–n/a.

Zug, R. and Hammerstein, P. (2012) Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PloS One* **7**: e38544.

Annexes

Annexe 1. *Ascogregarina taïwanensis*

En plus des bactéries, le microbiote du moustique tigre comprend aussi des virus et des microorganismes eucaryotes. Nous avons initié, des travaux sur le microbiote eucaryote associé à *Aedes albopictus* en collaboration avec l'équipe « Adaptation des Microorganismes Eucaryotes à leur Environnement » de l'unité Ecologie Microbienne. Lors d'essais préliminaires de criblage par amplification PCR, clonage et séquençage de l'ARNr 18S eucaryote, nous avons mis en évidence la présence du parasite *Ascogregarina taïwannensis* au sein d'individus issus de populations naturelles de Madagascar (Tableau S1). Des observations au microscope réalisées sur les tubes de Malpighie de moustiques mâles et femelles ont confirmé la présence d'*As. taïwannensis* en forte densité (Figure S1). Nous avons également mis en évidence certains taxons fongiques dont *Wallemia* sp., *Galactomyces geotrichum* et *Cladosporium tenuissimum* par amplification, clonage et séquençage d'un fragment de l'ITS2 (*Internal Transcribed Spacer 2*) (Tableau S1). Les travaux actuellement en cours dans l'équipe visent à sélectionner des couples d'amorces et de valider leur utilisation pour une approche méta-taxogénomique ciblée sur les microorganismes eucaryotes.

Tableau S1. Analyse de séquences micro-eucaryotiques chez *Ae. albopictus.*

Séquence	Groupe ciblé	Clone	Espèce	% identité	n° Accession	Taille de l'alignement (pb)
ARNr 18S	Protistes, Algues, Champignons	A1	*Ascogregarina taiwannensis*	100	JX131300.1	480
ARNr 18S	Protistes, Algues, Champignons	A2	*Ascogregarina taiwannensis*	99	JX131298.1	479
ARNr 18S	Protistes, Algues, Champignons	A3	*Ascogregarina taiwannensis*	99	JX131300.1	479
ARNr 18S	Protistes, Algues, Champignons	A4	*Ascogregarina taiwannensis*	99	JX131300.1	479
ARNr 18S	Protistes, Algues, Champignons	A5	*Ascogregarina taiwannensis*	100	JX131300.1	480
ITS2	Champignons	I1	*Wallemia* sp.	99	KF225858.1	609
ITS2	Champignons	I2	pas d'homologie	n.a.	n.a.	n.a.
ITS2	Champignons	I3	*Galactomyces geotrichum*	99	JF262194.1	408
ITS2	Champignons	I4	*Cladosporium tenuissimum*	100	AJ300331.1	593
ITS2	Champignons	I5	pas d'homologie	n.a.	n.a.	n.a.

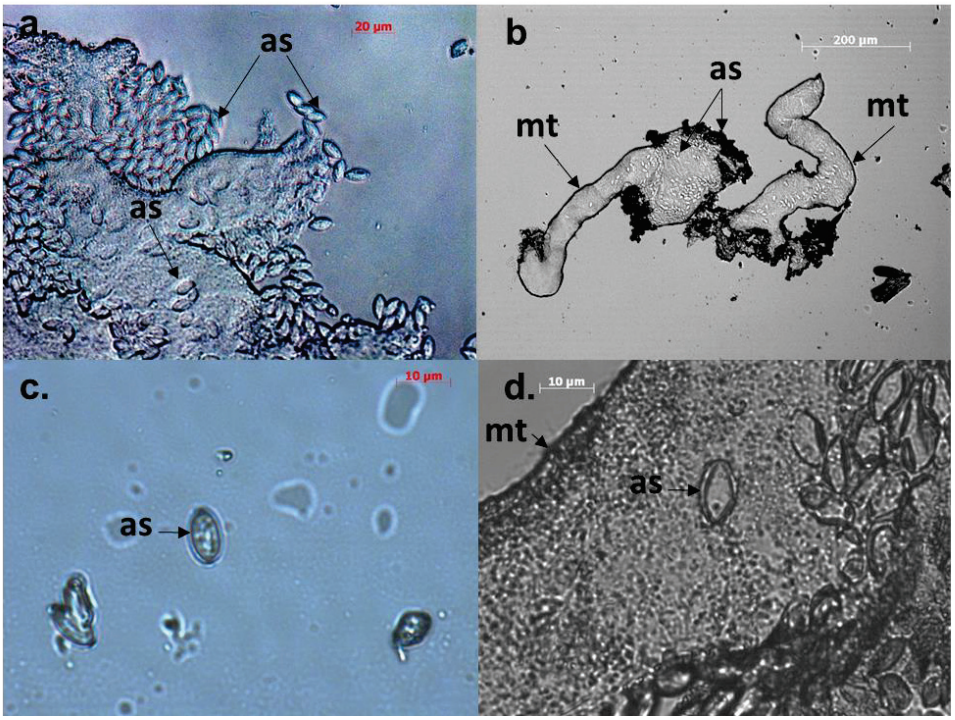


Figure S1. Oocystes d'*Ascogregarina taïwannensis* au sein de moustiques femelles (a) et mâles (b, c, d) *Ae. albopictus* adultes. La forme oocyste d'*As. taïwannensis* (as) est représentée au sein des tubes de Malpighie (mt) des moustiques. Les photographies ont été réalisées sur microscope photonique (Leica-microsystems, Allemagne).

Le parasite *As. Taïwanensis* a précédemment été identifié comme un symbiote eucaryote dominant d'*Ae. albopictus* (Fukuda et al., 1997). Il s'agit d'un organisme unicellulaire appartenant au règne des Protista et au phylum des Apicomplexa. Au sein de ce phylum, on retrouve de nombreux parasites obligatoires (ne pouvant réaliser leur cycle de vie sans une étape parasitaire) dont le genre *Plasmodium* responsable du paludisme (Levine, 1988). Les espèces du genre *Ascogregarina* (ou grégarines) parasitent plusieurs espèces d'arthropodes avec une spécificité d'hôte (Chen, 1999). Chez les moustiques du genre *Aedes*, *Ascogregarina culis* est préférentiellement associée à *Ae. aegypti, Ascogregarina Barretti* à *Aedes triseriatus* et *As. taïwanensis* à *Ae. albopictus* (revu par (Chen, 1999; Lantova and Volf, 2014). La prévalence d'*As. Taïwanensis* a été estimée à ~100% au sein de différentes populations d'*Ae. albopictus* (Munstermann and Wesson, 1990; Garcia et al., 1994; Blackmore et al., 1995; Dos Passos and Tadei, 2008; Reyes-Villanueva et al., 2013). Le cycle du parasite est systématiquement synchrone à celui de son hôte. *As. taïwanensis,* présent dans l'eau des gîtes larvaires, infecte le moustique tigre au stade larvaire sous sa

forme mobile ou sporozoïte. Le sporozoïte colonise l'intestin des larves en pénétrant dans le cytosol des cellules épithéliales. Dans la larve, il recrute les mitochondries qui lui fournissent ainsi l'énergie nécessaire pour se métamorphoser en stade trophozoÏte (Chen et al., 1997; Chen, 1999). Les trophozoïtes matures vont ensuite traverser le pôle luminal des cellules épithéliales du tube digestif et s'y attacher par une structure invaginée appelée épimérite située sur le pôle antérieur de la grégarine. Lors du détachement de l'épimérite, les grégarines seront libérées dans la lumière intestinale et migreront dans les tubes de Malpighie grâce à un système de mobilité qui dépendrait d'une matrice extracellulaire d'actine (Baines and King, 1989; Chen and Fan-Chiang, 2001). Lors de la nymphose (transformation de la larve en nymphe), deux phénomènes vont réguler la densité des parasites au sein d'*Ae. albopictus* : (i) la production d'hormone 20-hydroxyecdysone qui va affecter négativement la mobilité des grégarines et (ii) l'entrée en apoptose des grégarines qui n'ont pas migré dans les tubes de Malpighie (Chen and Yang, 1996; Chen et al., 2013). C'est au niveau de ces derniers que les parasites effectueront par la suite leur reproduction. Les gamètes sont formés par torsion et segmentation du trophozoïte pour ensuite s'assembler par paire et former le syzygy qui est la forme précoce du gamétocyste (Chen et al., 1997). Après fusion et maturation des gamètes dans le gamétocyste, une série de divisions nucléaires vont opérer. Les pré-oocystes (formes de dissémination) sont libérés de la masse cytoplasmique du gamétocyste par bourgeonnement. Initialement d'apparence ronde et ovale, ils prendront une forme en « citron » après maturation chez le moustique adulte (Chen, 1999). Leur libération dans l'eau des gîtes larvaires a lieu lors de la défécation du moustique.

Le séquençage du génome d'*As. taïwanensis* a permis une première description de son potentiel métabolique (Templeton et al., 2010). Etant le premier génome du genre *Ascogregarina* séquencé, aucune étude comparative interspécifique n'a pu à ce jour être réalisée au sein du genre. Cependant, l'analyse comparative des génomes d'*As. taïwanensis* et d'espèces de *Cryptosporidium* (plus proche voisin séquencé au sein des *Alveolata*) ont montré qu'*As. taïwanensis* possédait un métabolisme plus actif avec notamment la conservation de voies de synthèse des acides aminés, des acides gras insaturés et du mannitol. Contrairement à ses proches voisins, elle contient des mitochondries mais ne présente pas d'apicoplastes (plaste non photosynthétique retrouvé notamment chez *Plasmodium falciparum*). De plus, elle possède de nombreuses protéines extracellulaires potentiellement impliquées dans l'interaction avec son hôte. Si nos connaissances sur les interactions qu'entretiendraient *As. taïwanensis* avec le moustique tigre restent encore largement méconnues, une interaction mutualiste semble probable. En effet, le parasite, en impactant la fitness des larves d'autres espèces du gîte, pourrait participer au succès invasif de son hôte en favorisant sa compétitivité (voir chapitre 2.2.2.).

Références Annexes 1.

Baines, I. and King, C.A. (1989) Demonstration of actin in the protozoon — Gregarina. *Cell Biol. Int. Rep.* **13**: 679–686.

Blackmore, M.S., Scoles, G.A., and Craig, G.B. (1995) Parasitism of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (Diptera: Culicidae) by *Ascogregarina* spp. (Apicomplexa: Lecudinidae) in Florida. *J. Med. Entomol.* **32**: 847–852.

Chen, W.J. (1999) The life cycle of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa:Lecudinidae). *Parasitol. Today Pers. Ed* **15**: 153–156.

Chen, W.J., Chow, C.Y., and Wu, S.T. (1997) Ultrastructure of infection, development and gametocyst formation of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in its mosquito host, Aedes albopictus (Diptera: Culicidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* **44**: 101–108.

Chen, W.J. and Fan-Chiang, M.H. (2001) Directed migration of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in its natural host *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J. Eukaryot. Microbiol.* **48**: 537–541.

Chen, W.-J., Huang, C.-G., Fan-Chiang, M.-H., Liu, Y.-H., and Lee, Y.-F. (2013) Apoptosis of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae), which failed to migrate within its natural host. *J. Exp. Biol.* **216**: 230–235.

Chen, W.J. and Yang, C.H. (1996) Developmental synchrony of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) within *Aedes albopictus* (Diptera: Cuclicidae). *J. Med. Entomol.* **33**: 212–215.

Fukuda, T., Willis, O.R., and Barnard, D.R. (1997) Parasites of the Asian tiger mosquito and other container-inhabiting mosquitoes (Diptera:Culicidae) in northcentral Florida. *J. Med. Entomol.* **34**: 226–233.

Garcia, J.J., Fukuda, T., and Becnel, J.J. (1994) Seasonality, prevalence and pathogenicity of the gregarine *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in mosquitoes from Florida. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **10**: 413–418.

Lantova, L. and Volf, P. (2014) Mosquito and sand fly gregarines of the genus *Ascogregarina* and *Psychodiella* (Apicomplexa: Eugregarinorida, Aseptatorina) - Overview of their taxonomy, life cycle, host specificity and pathogenicity. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.*

Levine, N.D. (1988) Progress in taxonomy of the Apicomplexan protozoa. *J. Protozool.* **35**: 518–520.

Munstermann, L.E. and Wesson, D.M. (1990) First record of *Ascogregarina taiwanensis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in North American *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* **6**: 235–243.

Dos Passos, R.A. and Tadei, W.P. (2008) Parasitism of *Ascogregarina taiwanensis* and *Ascogregarina culicis* (Apicomplexa: Lecudinidae) in larvae of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Manaus, Amazon region, Brazil. *J. Invertebr. Pathol.* **97**: 230–236.

Reyes-Villanueva, F., Garza-Hernande, J.A., Garcia-Munguia, A.M., Howard, A.F.V., Ortega-Morales, A.I., Adeleke, M.A., and Rodriguez-Perez, M.A. (2013) *Aedes albopictus* in northeast Mexico: an update on adult distribution and first report of parasitism by *Ascogregarina taiwanensis*. *J. Vector Borne Dis.* **50**: 202–205.

Templeton, T.J., Enomoto, S., Chen, W.-J., Huang, C.-G., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., and Zhu, G. (2010) A genome-sequence survey for *Ascogregarina taiwanensis* supports evolutionary affiliation but metabolic diversity between a Gregarine and *Cryptosporidium*. *Mol. Biol. Evol.* **27**: 235–248.

Annexe 2. Détails techniques du séquençage et de l'assemblage des génomes bactériens.

Les symbiotes bactériens cultivables du moustique tigre constituent un modèle d'étude privilégié. Le séquençage de leurs génomes pourrait apporter de nouvelles informations concernant leur métabolisme, leur histoire évolutive ainsi que les bases génétiques potentielles de la symbiose ou de l'adaptation à leur hôte *Ae. albopictus.*

Les ADNs extraits des génomes de différentes souches d'*Acinetobacter,* d'*Asaia* et de *Pantoea* isolées d' *Ae. albopictus* adultes ont été séquencées par la technologie HiSeq Illumina (paired end 2x100pb). Les lectures obtenues ont été préassemblées avec le logiciel Velvet (Tableau S2). Les scaffolds obtenus (fragments assemblés) ont été annotés automatiquement sur la plateforme MicroScope – *Microbial Genome Annotation & Analysis Platform* (Genoscope, Evry) et sont en cours d'analyse.

Tableau S2. Caractéristiques de l'assemblage des différents génomes bactériens.

		Acinetobacter calcoaceticus Minard et al., 2013	***Acinetobacter johnsonnii*** Minard et al., 2013	***Acinetobacter loffii*** Minard et al., 2013	***Asaia* sp.** Non publié	***Pantoea* sp.** Valiente Moro et al., 2013
Filtre > 500 bp	n scaffolds	97	58	232	97	34
	Kmer	43	43	43	43	43
	N50	87133	125384	33667	107598	354919
	Taille du plus grand scaffold	317357	339010	132177	256959	1113376
	Taille totale	4085725	3176248	3396941	3336723	4906528
	GC%	38,73	42,43	42,8	59,19	57,57
Filtre > 1000 bp	n scaffolds	89	56	203	87	31
	Kmer	43	43	43	43	43
	N50	87133	119666	33667	107598	354919
	Taille du plus grand scaffold	317357	339010	121541	235847	113376
	Taille totale	4076025	3170237	3362376	3314481	4905228
	GC%	38,73	42,43	42,85	59,19	57,57

Sont indiqués, entre autre, dans le tableau : le nombre de séquences assemblées (n scaffold), la taille en mer de la fenêtre utilisée pour l'assemblage (Kmer) et la taille des contigs médians (N50).

Annexe 3. Protocole d'isolement de la fraction bactérienne.

En parallèle des analyses de diversité bactérienne, un protocole a été développé dans le but d'isoler la fraction bactérienne pour le séquençage du métagénome bactérien du moustique tigre (séquençage d'ADN ciblé sur l'ensemble de la communauté bactérienne). Les résultats de l'analyse de diversité ayant montré une très forte abondance relative de *Wolbachia,* l'approche métagénomique aurait alors principalement permis de détecter des séquences de cette bactérie endosymbiotique. Pour cette raison, le protocole décrit ci-dessous n'a pas été exploité pour la suite des travaux.

Les premières étapes d'optimisation du protocole ont été réalisées sur *Drosophila melanogaster* avant d'être appliquées à *Ae. albopictus.* Les tests réalisés sur l'ADN extrait en suivant ce protocole, dont un exemple est décrit ci-dessous (Figure S2) montrent bien un enrichissement de la fraction bactérienne (*rrs*) et une absence de la fraction nucléaire (*actin*). La fraction mitochondriale (*COI*) de même densité que la fraction bactérienne n'a cependant pas pu être éliminée.

Etape 1. Désinfection de surface des moustiques et broyage (sous hotte à flux laminaire et dans la glace)

a) Lavage à 3 reprises de 30 individus avec 500µl d'eau ultra pure, incubation 5 min dans 500 µl d'éthanol 70% et 5 lavages avec 500 µl d'eau ultra pure.

b) Transfert des individus dans un tube « dounce » stérile et broyage avec 500 µl de tampon PBSE 1X (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na_2HPO_4+7H_2O, 1,4 mM KH_2PO_4, 10 mM EDTA).

Etape 2. Récupération des cellules bactériennes (sous hotte à flux laminaire)

c) Ajout de 4,5 ml de PBSE 1X dans un tube « dounce » en lavant les parois. Transfert dans 3 microtubes 1,5 ml.

d) Ajout de 0,6 ml de PBSE dans le tube « dounce » pour récupérer les débris et transfert dans un 4ème microtube.

e) Centrifugation pendant 5 min à 300 g à 10°C. Transfert progressif du surnageant dans le tube « dounce ». Les étapes b à d sont à nouveau réalisées.

f) Centrifugation pendant 5 min à 400 g à 10°C. Transfert progressif du surnageant dans le tube « dounce ». Les étapes b à d sont à nouveau réalisées.

g) Centrifugation pendant 5 min à 500 g à 10°C. Transfert du surnageant dans des microtubes 1,5 ml.

h) Centrifugation pendant 20 min à 16100 g à 10°C.

i) Re-suspension du culot dans 520 µl de PBSE 1X et ajout de 230 µl de Nicodenz (0.8 g.ml^{-1}) au fond du tube à l'aide d'une seringue.

j) Centrifugation pendant 20 min 7500 g à 10°C.

k) Transfert de l'anneau bactérien formé dans le gradient de Nicodenz dans un microtube 1,5ml.

l) Lavage à 2 reprises, avec 900 µl d'eau ultra pure.

Etape 3. Extraction d'ADN

L'extraction est réalisée selon les recommandations du kit Qiagen, DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Allemagne) pour les bactéries à Gram positif et négatif.

Tests de l'ADN extrait par PCR :

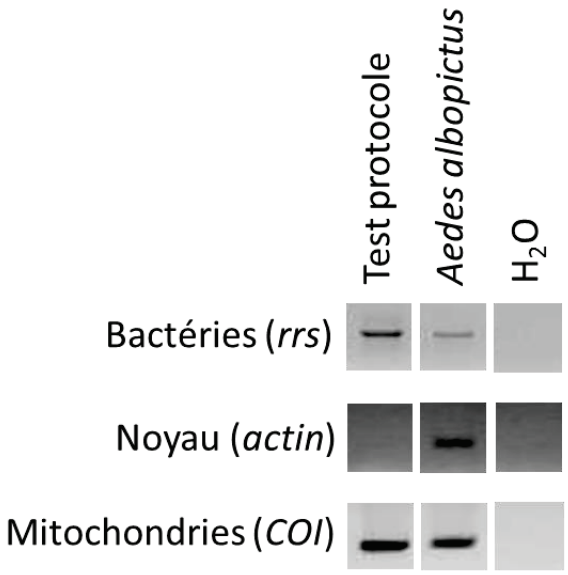


Figure S2. Validation du protocole. Les produits d'amplification des gènes *rrs*, actin, *COI* sont visualisés sur gel pour 30ng d'ADN obtenus après le protocole d'enrichissement (Test protocole) ou par extraction d'ADN sur moustique entier (*Aedes albopictus*). De l'eau a été ajoutée au mélange réactionnel pour s'assurer de l'absence de contamination.

Annexe 4. Publication n°5 « Whole-genome sequence of *Wolbachia* strain *w*AlbB, an endosymbiont of tiger mosquito vector *Aedes albopictus.* »

Ces travaux ont été publiés en 2012 dans le journal ***Journal of Bacteriology*** - volume 194 p1840.

Journal of Bacteriology

Whole-Genome Sequence of Wolbachia Strain *w*AlbB, an Endosymbiont of Tiger Mosquito Vector Aedes albopictus

Patrick Mavingui, Claire Valiente Moro, Van Tran-Van, Florence Wisniewski-Dyé, Vincent Raquin, Guillaume Minard, Florence-Hélène Tran, Denis Voronin, Zoé Rouy, Patricia Bustos, Luis Lozano, Valérie Barbe and Víctor González

J. Bacteriol. **2012, 194(7):1840. DOI: 10.1128/JB.00036-12.**

Updated information and services can be found at:
http://jb.asm.org/content/194/7/1840

These include:

REFERENCES This article cites 11 articles, 4 of which can be accessed free at:
http://jb.asm.org/content/194/7/1840#ref-list-1

CONTENT ALERTS Receive: RSS Feeds, eTOCs, free email alerts (when new articles cite this article), more»

Information about commercial reprint orders: **http://journals.asm.org/site/misc/reprints.xhtml**
To subscribe to to another ASM Journal go to: **http://journals.asm.org/site/subscriptions/**

Journals.ASM.org

JB Journals.ASM.org

GENOME ANNOUNCEMENT

Whole-Genome Sequence of *Wolbachia* Strain *w*AlbB, an Endosymbiont of Tiger Mosquito Vector *Aedes albopictus*

Patrick Mavingui,[a] Claire Valiente Moro,[a] Van Tran-Van,[a] Florence Wisniewski-Dyé,[a] Vincent Raquin,[a] Guillaume Minard,[a] Florence-Hélène Tran,[a] Denis Voronin,[a]* Zoé Rouy,[b] Patricia Bustos,[c] Luis Lozano,[c] Valérie Barbe,[b] and Víctor González[c]

Université de Lyon, CNRS, UMR 5557, Ecologie Microbienne, Villeurbanne, France[a]; CEA, DSV, IG, Genoscope, Evry, France[b]; and Centro de Ciencias Genómicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Cuernavaca, Morelos, México[c]

Although bacteria of the genus *Wolbachia* induced significant extended phenotypes to infected hosts, most molecular mechanisms involved are still unknown. To gain insight into the bacterial genetic determinants, we sequenced the whole genome of *Wolbachia w*AlbB strain, a commensal obligate intracellular of the tiger mosquito *Aedes albopictus*.

Mosquitoes are medically important vectors of pathogens. The tiger mosquito *Aedes albopictus* and its sister species *Aedes aegypti* transmitted a large number of arboviruses, notably dengue and chikungunya. In the absence of effective vaccines, transmission of pathogens can be reduced only by limiting mosquito densities by the mechanical eradication of breeding sites and by the application of insecticides that may affect nontarget organisms as well. There is an increasing interest in the use of microbes associated with arthropod vectors to interfere with the transmission of pathogens (1, 10). Indeed, bacteria of the genus *Wolbachia* have been shown to modulate the transmission of pathogens, like chikungunya (*Alphavirus* genus), dengue (*Flavivirus* genus), and parasites (*Brugia pahangi* and *Plasmodium galliceum*) by mosquito vectors through mostly unknown molecular mechanisms (3, 7, 8). To gain insight into the bacterial genetic determinants, we sequenced the whole genome of *Wolbachia w*AlbB strain of *A. albopictus*.

Genomic DNA was extracted from infected mosquito cell line Aa23 and subjected to multiple displacement amplification (6). A mate-paired library with 6-kb inserts was constructed and sequenced by 454 Titanium, generating 185,771 reads that corresponded to 56,058,332 bp and thus approximately 50× coverage. Assembly was performed using Newbler (version 2.3), and one run of Solexa sequencing (31,919,662 reads of 76 bp) allowed the correction of potential base errors. Coding sequence prediction and automatic functional annotation were performed using the MicroScope platform (9) (http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope). Manual validation of all the automatically annotated genes was carried out using the MaGe (Magnifying Genomes) interface.

The whole *Wolbachia w*AlbB genome consists of 165 contigs encompassing 49 scaffolds. It has 1,239,814 bp and an average GC content of 33.7%. The genome contains 1,209 predicted protein-coding sequences with an average length of 849 bp, 34 tRNA genes, and one rRNA copy split in 2 operons (16S and 5S-23S). Based on the phylogenetic analysis of 52 orthologous ribosomal proteins retrieved from the four complete *Wolbachia* genome sequences (2, 4, 5, 11), strain *w*AlbB appears to be most closely related to *Wolbachia w*Pip, an endosymbiont of the mosquito *Culex pipiens* (4). Preliminary comparative analysis of those five whole-genome sequences of *Wolbachia* revealed 121 protein families present exclusively in strain *w*AlbB, which may suggest potential specific genomic bases for interaction with other coinfecting microorganisms and hosts.

Nucleotide sequence accession numbers. The genome sequence of *Wolbachia w*AlbB was deposited in EMBL under accession numbers CAGB01000001 to CAGB01000165. The sequence and annotations are also available from the MicroScope platform (http://www.genoscope.cns.fr/agc/microscope).

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants ANR-06-SEST07 and FRB-CD-AOOI-07-012 and was carried out within the framework of GDRI "Biodiversité et Développement Durable à Madagascar."

REFERENCES

1. **Christodoulou M.** 2011. Biological vector control of mosquito-borne diseases. Lancet Infect. Dis. **11**:84–85.
2. **Foster J, et al.** 2005. The *Wolbachia* genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. PLoS Biol. **3**:e121.
3. **Glaser R, Meola M.** 2010. The native *Wolbachia* endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* increase host resistance to West Nile virus infection. PLoS One **5**:e11977.
4. **Klasson L, et al.** 2008. Genome evolution of *Wolbachia* strain *w*Pip from the *Culex pipiens* group. Mol. Biol. Evol. **25**:1877–1887.
5. **Klasson L, et al.** 2009. The mosaic genome structure of the *Wolbachia w*Ri strain infecting *Drosophila simulans*. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. **106**: 5725–5730.
6. **Mavingui P, et al.** 2005. Efficient procedure for purification of obligate intracellular *Wolbachia pipientis* and representative amplification of its genome by multiple-displacement amplification. Appl. Environ. Microbiol. **71**:6910–6917.
7. **Moreira LJ, et al.** 2009. A *Wolbachia* symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, chikungunya, and Plasmodium. Cell **139**:1268–1278.
8. **Mousson L, et al.** 2010. *Wolbachia* modulates chikungunya replication in *Aedes albopictus*. Mol. Ecol. **19**:1953–1964.
9. **Vallenet D, et al.** 2009. MicroScope: a platform for microbial genome annotation and comparative genomics. Database (Oxford) **2009**:bap021.
10. **Weiss B, Aksoy S.** 2011. Microbiome influences on insect host vector competence. Trends Parasitol. **27**:514–522.
11. **Wu M, et al.** 2004. Phylogenomics of the reproductive parasite *Wolbachia pipientis w*Mel: a streamlined genome overrun by mobile genetic elements. PLoS Biol. **2**:E69.

Received 9 January 2012 **Accepted** 19 January 2012

Address correspondence to Patrick Mavingui, patrick.mavingui@univ-lyon1.fr.

* Present address: Molecular and Biochemical Parasitology, Liverpool School of Tropical Medicine, Liverpool, United Kingdom.

Copyright © 2012, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

doi:10.1128/JB.00036-12