

Centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie

# **Le recrutement de bactéries par les larves de *Aedes aegypti* en Guyane française**

Par

Josiann Normandeau-Guimond

Mémoire présenté pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)  
pour le programme de maîtrise en microbiologie appliquée

## **Jury d'évaluation**

Président du jury, examinateur interne	Charles Dozois, INRS – centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
Examineur externe	François Dumont, Centre de recherche agroalimentaire de Mirabel
Directeur de recherche	Pr Claude Guertin, INRS – centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie
Codirecteur de recherche	Pr Philippe Constant, INRS- centre Armand-Frappier Santé Biotechnologie Pr Isabelle Dusfour, Institut Pasteur de la Guyane française

## REMERCIEMENTS

---

Je tiens dans un premier temps à exprimer ma reconnaissance à mon directeur de recherche, le Pr Claude Guertin, pour la place qu'il m'a faite au sein du laboratoire et pour les expériences qui m'ont permis d'y vivre. Les opportunités d'apprentissage tant en laboratoire, sur le terrain en Guyane française ou en congrès au Brésil, ainsi que ses précieux conseils ont été appréciés tout au long de mon parcours. Je remercie également mon co-directeur de recherche, le Pr Philippe Constant pour ses explications claires pour tout ce qui a trait à la bio-informatique et aux statistiques. Ma bête noire qu'est la statistique n'aura jamais été aussi bien maîtrisée ! Dernièrement, mais non la moindre, je tiens à souligner l'implication du Pr Isabelle Dusfour dans la réalisation de mon projet. Merci de m'avoir transmis ta passion des moustiques et de m'avoir fait découvrir la Guyane.

J'exprime ma gratitude envers mes fabuleuses collègues de laboratoire, Narin Srei, Audrey-Anne Durand et Judith Mongouong, pour vos avis et soutien tout au long de mon parcours. Vos expériences et points de vue différents m'ont permis d'apprendre beaucoup au sein de notre équipe. Un merci spécial à Anne de la Porte pour ta présence, ta franchise et ton acceptation. Je remercie également tous mes collègues du bureau étudiant Rose Ragot, Livie Lestin, Alexandra Cucaita, Thibault Bourdin et Paul Morel pour les discussions enrichissantes qu'on a pu avoir dans l'espace étudiant.

Finalement, je tiens à remercier mon entourage pour votre soutien et votre présence tout au long de ce parcours. À mes amies, Josyane et Chani pour nos séances de rédaction, Raphaëlle pour tes mots encourageants. À Pico pour ton réconfort et Luna pour tes distractions.

## RÉSUMÉ

---

*Aedes aegypti* est un moustique vecteur de plusieurs virus infectant les humains, d'où les efforts consentis pour contrôler les populations de cet insecte. En plus de l'usage d'insecticides, plusieurs solutions de rechange sont étudiées pour lutter contre ces populations, parmi lesquelles une meilleure compréhension du rôle du microbiote. La littérature suggère que la composition spécifique des bactéries retrouvées chez les larves soit étroitement liée aux microorganismes retrouvés dans l'eau de leur gîte larvaire. Cependant, les facteurs influençant la structure des communautés sont peu connus. L'hypothèse émise est que la structure des communautés microbiennes formant le microbiote des larves est influencée par celle que l'on retrouve dans les gîtes larvaires. Un total de 60 gîtes larvaires a été sélectionné en Guyane française pour la collecte de larves et d'eau. Pour chaque gîte, les paramètres physicochimiques ainsi que les caractéristiques environnementales ont été notés. L'ADN total pour chaque échantillon a été extrait, puis les bibliothèques de séquençage ciblant la région codant pour l'ARNr 16S des bactéries (V6-V8) ont été préparées au Québec. Les résultats obtenus permettent d'observer des similarités entre les OTUs identifiés chez les larves et leur environnement, mais dans des proportions différentes. Une analyse canonique permet d'expliquer 4% de la covariation observée chez les larves par les structures microbiennes présentes dans l'eau, alors que l'environnement permet d'expliquer 3% de cette covariation. En somme, les communautés bactériennes retrouvées chez les larves semblent provenir principalement de leur environnement, mais les facteurs et mécanismes qui influencent la structure de ces communautés restent à être déterminés.

Mots-clés : *Aedes aegypti*, communautés bactériennes, gîtes larvaires, paramètres physico-chimiques, facteurs environnementaux, Guyane française.

## ABSTRACT

---

*Aedes aegypti*, an important vector of arboviruses, is an anthropophilic mosquito that reproduces in small volumes of water located in urban areas. Due to abusive use of insecticide, it has developed resistance mechanisms. The role of microbiota in such resistance isn't clear, and bacterial community modulations are considered as a way to control the mosquito proliferation. Many mechanisms may be involved in shaping microbial communities found in the larvae, and the parameters that affect the microbiota's assembly are not well understood. Our hypothesis suggested that the structure of the larval microbiota comes from the structure of the bacterial communities of the larval sites. In French Guiana, 60 breeding sites were investigated; mosquito larvae were collected, along with breeding site water. Information concerning the site was collected, and physicochemical parameters were noted. Total DNA was extracted, then sequencing libraries targeting the 16S rRNA of bacteria were prepared in Quebec. The results obtained show similarities between the OTUs identified in larvae and their environment, but in different proportions. A canonical analysis explains 4% of the covariation observed in larvae by the microbial structures present in the water, while the environment explains 3% of this covariation. In fact, the bacterial communities found in larvae seem to come mainly from their environment, but the factors and mechanisms that influence the structure of these communities have yet to be determined.

Keywords: *Aedes aegypti*, breeding sites, bacterial communities, physicochemical parameters, French Guiana, environmental factors.

## TABLE DES MATIÈRES

---

<b>1. INTRODUCTION</b> .....	9
<b>2. REVUE LITTÉRAIRE</b> .....	12
1. Moustiques.....	12
1. <i>Aedes aegypti</i> .....	12
2. <b>Cycle de vie de l'insecte</b> .....	14
3. <b>Transmission vectorielle des virus par <i>Ae. aegypti</i></b> .....	16
4. <b>Moyens de luttés contre les vecteurs</b> .....	17
5. <b>Mécanisme de résistance aux insecticides</b> .....	19
2. <b>Microorganismes</b> .....	21
1. <b>Microorganismes associés à <i>Ae. aegypti</i></b> .....	21
2. <b>Acquisition du microbiote chez <i>Ae. aegypti</i></b> .....	22
3. <b>Transmission du microbiote</b> .....	22
4. <b>Rôle et fonctions du microbiote chez le moustique</b> .....	24
5. <b>Facteurs d'influence du microbiote chez le moustique</b> .....	26
6. <b>Mécanisme d'assemblage des communautés microbiennes</b> .....	28
3. <b>Problématique</b> .....	30
4. <b>Hypothèse de recherche</b> .....	32
<b>5. MATÉRIEL ET MÉTHODE</b> .....	33
1. <b>Sélection des sites et échantillonnage</b> .....	33
2. <b>Analyses physico-chimiques de l'eau</b> .....	34
3. <b>Extraction d'ADN provenant des échantillons d'eau et de larves</b> ....	35
4. <b>Séquençage Illumina MiSeq</b> .....	36
5. <b>Traitement des séquences par USEARCH</b> .....	37
6. <b>Variables caractérisant l'environnement immédiat et à proximité</b>	38
7. <b>Analyses statistiques</b> .....	40
<b>6. RÉSULTATS</b> .....	43
1. <b>La distribution des familles bactériennes diffère entre les échantillons d'eau de gîte larvaire et les larvaires</b> .....	43
2. <b>Certaines familles sont trouvées exclusivement dans l'un ou l'autre des environnements analysés</b> .....	46
3. Contribution des paramètres environnementaux sur la variance observée entre les OTUs identifiés chez les larves –.....	49
3.1 Approche non contrainte par analyse en composante principale (PCA)	49
3.2 Approche contrainte par analyse de redondance (RDA).....	51
3.3 Comparaison des résultats obtenus par les deux approches.....	52
<b>7. DISCUSSION</b> .....	53
<b>8. CONCLUSION</b> .....	60
<b>10. BIBLIOGRAPHIE</b> .....	64
Annexe I : Données physicochimiques.....	79
Annexe II : Données qualitatives.....	80

## LISTE DES FIGURES

---

Figure 1. Photographie de <i>Ae. aegypti</i> durant ses 4 phases de vie : œuf (a), larve (b), nymphe (c) et adulte (d). <sup>5</sup> .....	13
Figure 2. Cycle de développement du moustique <i>Ae. aegypti</i> <sup>8</sup> .....	14
Figure 3. Répartition de la présence des arbovirus d'intérêt selon les pays <sup>22</sup> .....	17
Figure 4. Méthodes classiques et alternatives de gestion des populations de moustiques selon leur stade de croissance <sup>23</sup> . .....	18
Figure 5. Mécanismes de résistances présents chez les moustiques <sup>26</sup> . .....	20
Figure 6. Répartition des 141 gîtes ciblés en Guyane française pour la collecte de larves.....	34
Figure 7. Distribution des familles bactérienne selon l'environnement ou elles sont détectées, soit dans l'eau des gîtes larvaires et dans les larves. ....	45
Figure 8. Contribution de chaque matrice de variables expliquant la variabilité d'OTUs observé chez les larves.....	50
Figure 9. RDA des matrices des OTUs de l'eau et de la physico-chimie expliquant la variation observée dans le microbiote des larves, respectivement. ....	51
Figure 10. Comparaison de l'approche non contrainte (PCA) et de l'approche contrainte (RDA) en fonction des facteurs influençant la variation observée dans les communautés bactériennes des larves.....	52

## **LISTE DES TABLEAUX**

---

Tableau 1. Variables ciblées pour l'analyse, leur type et leur description.....	39
Tableau 2. Comparaison du nombre de séquences obtenues pour chaque famille selon l'environnement. ....	46
Tableau 3. Comparaison des familles retrouvées exclusivement dans un des deux environnements étudiés.....	48

---

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

**ADN** : Acide désoxyribonucléique

**ARNr** : Acide ribonucléique ribosomique

**CFU** : Unité formatrice de colonie (*Colony-forming unit*)

**COD** : demande chimique en oxygène (*Chemical oxygen demand*)

**ESV** : variant de séquence exacte (*Exact sequence variant*)

**GFP** : protéine fluorescente verte (*green fluorescent protein*)

**NCBI** : Centre national de l'information biotechnologie (*National Center for Biotechnology Information*)

**OTU** : unité taxonomique opérationnelle (*Operational Taxonomic Unit*)

**pb** : paire de base

**PCA** : Analyse en composante principale

**PCR** : Réaction de polymérase en chaîne (*Polymerase chain reaction*)

**RDA** : Analyse de redondance

**RPM** : rotation par minute



# 1.

## INTRODUCTION

---

La santé est un domaine vaste et important qui comprend non seulement de saines habitudes de vie, mais également la prévention de maladies et des soins adaptés lorsque nécessaire. À l'échelle mondiale, plusieurs arbovirus sont responsables d'épidémies ayant de lourdes conséquences sur les populations. Les arbovirus sont des virus qui sont transmis par des insectes hématophages comme les moustiques, les tiques ou les phlébotomes. À titre d'exemple, il est estimé que plus de la moitié de la population mondiale est à risque de contracter le virus de la dengue, un des 50 *flavivirus* connus avec le virus de la fièvre jaune ou le virus du Nil. Parmi les moustiques les plus dangereux pour la santé humaine se trouvent, *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). Cet insecte vectoriel permet la transmission de la dengue, du Zika, du virus de la fièvre jaune et du Chikungunya. Cette espèce se reproduit dans une variété de gîtes d'origine anthropique, et se nourrit exclusivement du sang des humains. En fait, ce sont les femelles qui sont hématophages puisqu'elles doivent se nourrir plus d'une fois afin de produire des œufs. Par conséquent et en lien avec ce comportement qui favorise de nombreux contacts avec les humains, leur capacité à transmettre les virus est ainsi très élevée.

Afin de protéger les populations contre ces maladies, des programmes de lutttes vectorielles sont conçus en fonction de l'espèce impliquée, des lieux concernés et des moyens disponibles. La lutte vectorielle peut se faire sur plusieurs fronts : réduire les populations de moustiques, diminuer les contacts entre ces derniers et les humains ou réduire la susceptibilité de l'insecte à être infecté par le virus. Afin d'y parvenir, plusieurs stratégies peuvent être utilisées. Dans le cas d'*Aedes aegypti*, l'assèchement

des potentiels gîtes de pontes est une stratégie intéressante, mais ardue. Effectivement, les femelles peuvent pondre dans des gîtes artificiels qui contiennent aussi peu que 5 ml, ce qui représente énormément de sites potentiels à surveiller. Cependant, cibler les efforts pour assécher les plus gros gîtes reste pertinent, puisque ce sont eux qui génèrent le plus d'insectes. À force de vider couramment ce type de réservoir, ou d'empêcher l'accès aux moustiques, le nombre d'individus dans la population diminue puisque la ponte et le développement des larves sont plus difficiles. La diminution des contacts entre les humains et les moustiques est aussi une initiative importante. Cela comprend l'utilisation de vêtements cachant la peau et de moustiquaires limitant l'accès aux habitations en bloquant les portes ou fenêtres. L'utilisation d'insecticides est une alternative incontournable. En plus de réduire les populations d'adulte ou de larves, ils empêchent les femelles de piquer des humains ce qui diminue les possibilités de transmettre un virus.

Les insecticides utilisés contre *Ae. aegypti* sont majoritairement issus de la famille des pyréthrinoïdes. Or, une résistance à ces composés est observée chez les populations de la Guyane française. Le développement de nouveaux moyens de lutte est crucial afin de contrôler la prolifération de moustiques et ainsi limiter la transmission des virus. Plusieurs alternatives sont étudiées, telles que l'utilisation de prédateurs, le relâchement d'individus non féconds, l'infection des individus avec des microorganismes les rendant moins susceptibles d'être infectés par des virus ou encore les rendant incapables de produire une descendance viable. L'étude du microbiote et de son rôle chez les organismes est un sujet relativement récent. Bien que les communautés microbiennes présentes chez *Ae. aegypti* sont de mieux en mieux caractérisées, les mécanismes qui permettent leur établissement, de même que les rôles qu'ils ont auprès de l'insecte ne sont pas encore connus. Il en va de même

pour les facteurs qui influencent l'établissement et la composition du microbiote. Afin de développer des outils efficaces pour réduire l'incidence des arbovirus, il est nécessaire de mieux comprendre les mécanismes entourant le microbiote du moustique.

Dans cet ordre d'idée, l'étude du recrutement des bactéries présentes chez les larves d'*Ae. aegypti* est au cœur de ce mémoire. Il est souvent soutenu que les larves obtiennent leurs microbiotes majoritairement à partir de l'environnement, notamment puisqu'elles se nourrissent des microorganismes et de la biomasse présents dans l'eau du gîte larvaire. Cela dit, les mécanismes qui influencent cette acquisition ne sont pas bien décrits. L'hypothèse de ce mémoire est que la structure du microbiote bactérien des larves d'*Ae. aegypti* covarie avec la structure des communautés bactériennes retrouvées dans l'eau des gîtes larvaires et les paramètres de l'environnement qui l'entoure. Autrement dit, il est suggéré dans un premier temps que la structure des communautés des deux environnements soit similaire. Puis dans un deuxième temps, que les gîtes dont les conditions environnementales sont semblables présentent également des structures microbiennes similaires. À cette fin, la composition bactérienne de l'eau et des larves de 60 gîtes larvaires a été déterminée à l'aide d'une approche de séquençage d'amplicons PCR ciblant le gène codant pour l'ARNr 16S. Les paramètres physico-chimiques pour chaque gîte sont également étudiés. Finalement, les caractéristiques des sites, c'est-à-dire l'emplacement physique où se trouve le gîte, ont également été considérées afin d'évaluer l'influence de ces facteurs sur la structure des communautés observés chez les larves. Dans un premier temps, les communautés observées chez les larves seront comparées à celles observées dans l'eau des gîtes.

## 2. REVUE LITTÉRAIRE

---

### 1. Moustiques

Au-dessus de 3 450 espèces de moustiques sont répertoriées au travers du globe, dont une centaine seulement sont à la fois hématophages et anthropophiles. L'attrait de ces moustiques pour le sang humain favorise la transmission de pathogènes, notamment lorsque l'insecte se nourrit de multiples fois sur différentes personnes. Les principaux vecteurs de pathologie sont distribués parmi trois genres : *Anopheles*, *Aedes* et *Culex*. Le genre *Aedes* est le principal vecteur des arbovirus, notamment la dengue, la fièvre jaune, Zika et Chikungunya. Originaire d'Afrique subsaharienne, le moustique est arrivé sur le continent américain en même temps que les premiers voyageurs vers 1400, vraisemblablement par bateau<sup>1</sup>.

#### 1. *Aedes aegypti*

Désormais anthropophile strict, *Ae. aegypti* se retrouve dans les milieux urbains et se reproduit dans de petits volumes d'eau qu'on appelle gîtes larvaires<sup>2</sup>. Ainsi, une soucoupe de pot à fleurs, un pneu abandonné ou une toile ayant recueilli de l'eau de pluie peut devenir un site de ponte pour l'insecte. Ce large éventail de gîtes potentiels augmente les populations de ce moustique. Il s'agit d'une espèce agressive davantage active de jour, qui se retrouve plus fréquemment à l'intérieur des bâtiments<sup>3</sup>. Bien qu'il existe des espèces prédatrices ciblant les moustiques, *Ae. aegypti* est peu affecté puisque leurs gîtes ne sont pas adaptés à leur développement<sup>3</sup>.

La distribution de cette espèce d'*Aedes* est fortement influencée par la température, puisqu'il ne survit pas en dessous de 10°C<sup>3</sup>. Malgré tout, une population d'*Ae. aegypti*

a été détectée à Windsor (Ontario) en 2016, et à deux nouveaux sites en 2017<sup>4</sup>. Sa présence au Canada est potentiellement expliquée par les transports et le déplacement des humains. En effet, la population établie d'*Ae. aegypti* la plus proche, se situe à Washington, à 500km de Windsor<sup>4</sup>. Cette population des États-Unis réussit à survivre à l'hiver. Cependant, il n'est pas exclu que dans le contexte des changements climatiques que cette espèce puisse être retrouvée sur de nouveaux territoires, notamment en saison chaude.

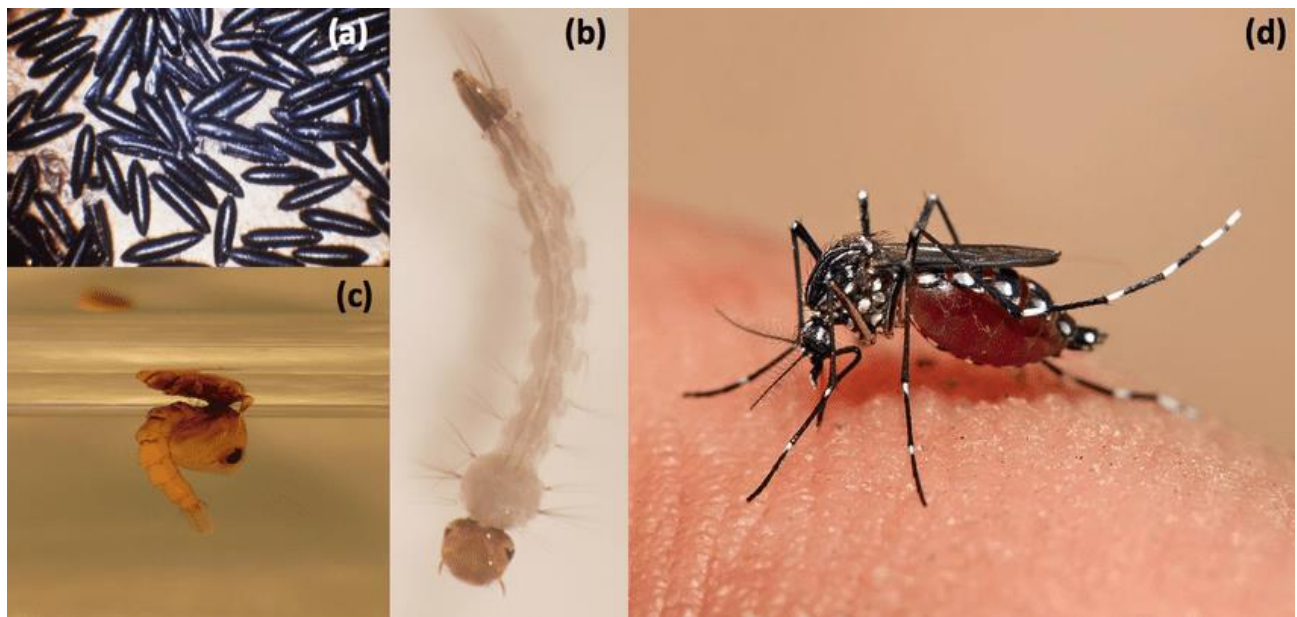


Figure 1. Photographie de *Ae. aegypti* durant ses quatre phases de vie : œuf (a), larve (b), nymphe (c) et adulte (d).<sup>5</sup>

## 2. Cycle de vie de l'insecte

*Ae. aegypti* est un insecte holométabole avec une partie de son développement aquatique, l'œuf, la larve et la nymphe, puis terrestre, l'adulte. Le cycle s'accomplit sur une période de 5 à 10 jours, cette durée étant influencée par plusieurs facteurs<sup>3</sup>. Les œufs, dépourvus de flotteurs, sont très résistants à la sécheresse et au froid<sup>6</sup>. Ils sont pondus sur le bord d'un récipient d'origine humaine, à l'interface eau-air sur un substrat humide tel que de la terre ou du papier<sup>7</sup>. Le développement larvaire est caractérisé par quatre stades dont chacun se traduit par une augmentation de la masse corporelle et qui sont séparés par une mue<sup>3</sup>.

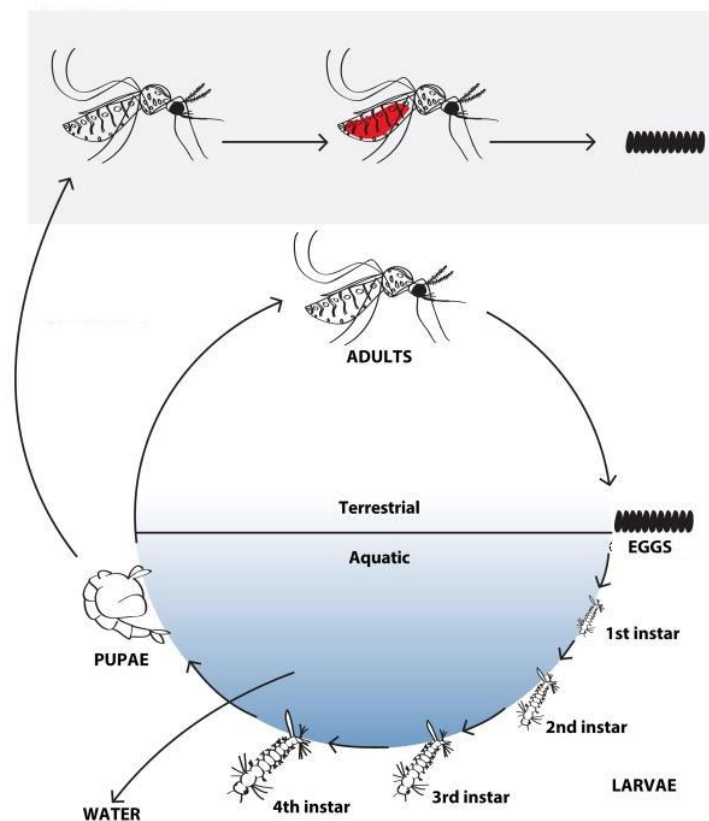


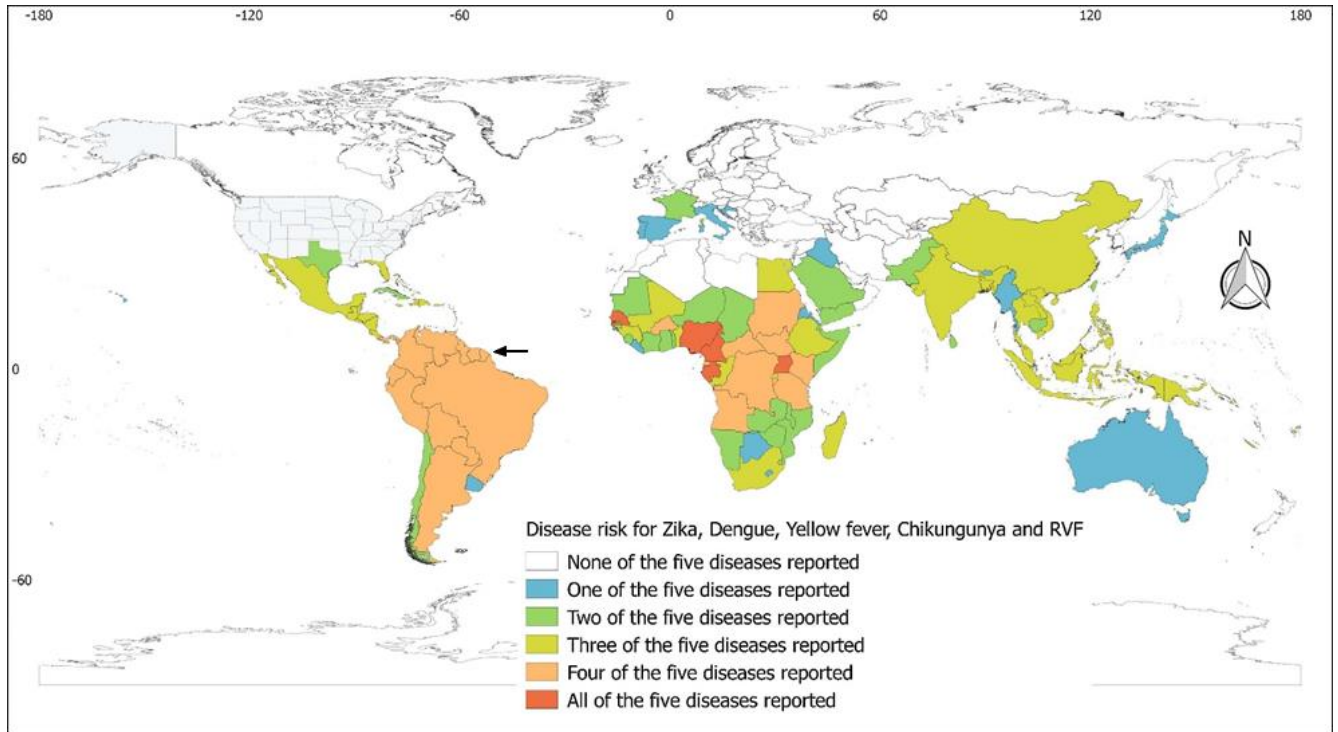
Figure 2. Cycle de développement du moustique *Ae. aegypti*<sup>8</sup>

Le genre *Aedes* est davantage retrouvé dans des gîtes larvaires remplis d'eau contenant de la matière organique<sup>7</sup>. Cette biomasse formée de composés organiques, d'algues, de bactéries, levures et autres microorganismes constitue la source d'alimentation des larves<sup>7,9</sup>. Les larves de *Ae. aegypti* sont particulièrement résistantes à la famine. Cependant, une famine de plusieurs jours peut entraîner un retard de croissance<sup>3</sup>. Au stade de puppe, les insectes sont mobiles et réagissent aux stimuli, sans toutefois se nourrir. Les adultes émergent à la suite de la rupture de la cuticule. Les adultes se nourrissent de nectar, et les femelles ont besoin de repas de sang afin de produire les œufs. Bien qu'elles puissent aussi se nourrir sur d'autres mammifères, les femelles *Ae. aegypti* ont une attirance prononcée pour le sang humain dont elles se nourrissent plusieurs fois avant de produire des œufs<sup>3</sup>. Elles peuvent pondre jusqu'à 5 fois au cours de leur vie, délivrant à chaque ponte entre 100 et 200 œufs<sup>8</sup>. Plusieurs facteurs influencent le choix du gîte larvaire par la femelle, notamment la quantité de matière organique présente dans l'eau, la présence d'algues et de bactéries, les concentrations d'azote, de phosphore et de potassium ainsi que la densité de larves et d'œufs de la même espèce déjà présente dans le gîte<sup>10,11</sup>. La préférence trophique pour le sang humain ainsi que leur capacité à se développer dans de petits gîtes anthropiques confèrent à cet insecte une aisance à transmettre les virus, d'où l'intérêt de s'y intéresser.

### **3. Transmission vectorielle des virus par *Ae. aegypti***

Les arbovirus sont des virus principalement maintenus dans la nature grâce à la transmission par des arthropodes hématophages à des hôtes vertébrés<sup>12</sup>. Il existe environ 130 virus pathogènes pour l'humain incluant les membres des familles Flaviviridae, Togaviridae, Reoviridae, Orthomyxoviridae et Bunyaviridae<sup>13</sup>. Ils sont transmis majoritairement par les prises de repas sanguins des moustiques, des tiques, des phlébotomes et des culicoïdes<sup>13</sup>. D'autres acariens ont été identifiés comme étant porteurs d'arbovirus, mais leur rôle épidémiologique est négligeable<sup>12</sup>. Parmi les arbovirus transmis par *Ae. aegypti* se trouve la dengue, la fièvre jaune, Zika et Chikungunya. En considérant la distribution de l'insecte et la démographie, il est estimé que plus de la moitié de la population mondiale est à risque de contracter une infection à l'un de ces arbovirus<sup>13,14</sup>. D'ailleurs, l'incidence de ces infections a augmenté de 30 fois au cours des 50 dernières années<sup>14</sup>. Cette augmentation est due à la propagation des moustiques, de la croissance rapide de la population et à l'augmentation des précipitations et de la température<sup>13,14</sup>. Les cas de dengue sont plus fréquents en Asie et en Amérique latine avec plus de 390 millions de cas<sup>15</sup>. Bien qu'un vaccin efficace soit disponible, le virus de la fièvre jaune continue d'affecter fortement le continent africain, avec plus de 90% des cas mondiaux<sup>16,17</sup>. Le virus Zika est contracté par l'homme en Asie, en Amérique latine et en Afrique<sup>18</sup>. Il s'agit du premier virus identifié comme étant transmissible par les piqûres de moustiques et par contact sexuel avec un individu infecté<sup>19,20</sup>. Les infections semblent être à l'origine du syndrome de Guillain-Barré, en plus d'entraîner des cas de microcéphalie lors de grossesses<sup>21</sup>.



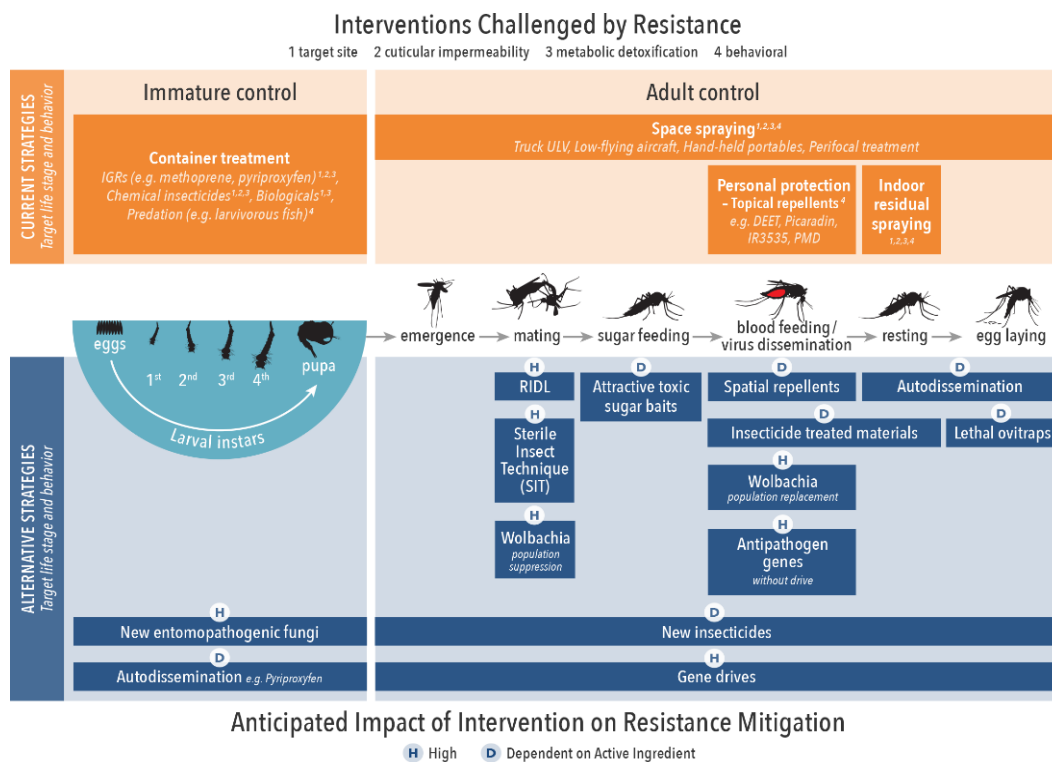


**Figure 3. Répartition de la présence des arbovirus d'intérêt selon les pays<sup>22</sup>.**

#### **4. Moyens de luttés contre les vecteurs**

La lutte vectorielle vise à réduire le contact vecteur/hôte en diminuant les populations du moustique ciblé. Cela peut se faire en éliminant l'insecte adulte, en réduisant ses chances de reproduction ou en retirant des sites de pontes<sup>23</sup>. Dans un contexte de lutte contre les populations d'*Ae. aegypti*, le contrôle des larves est une stratégie utilisée, notamment via l'utilisation d'insecticide chimique ou biologique<sup>23,24</sup>. La classe d'insecticide la plus répandue est celle des pyréthrinoïdes, mais leur utilisation entraîne une pression de sélection permettant à des vecteurs résistants de se développer et se répandre<sup>23,25</sup>. Cela reste une stratégie largement utilisée notamment pour la pulvérisation résiduelle ou à grande échelle<sup>26</sup>.

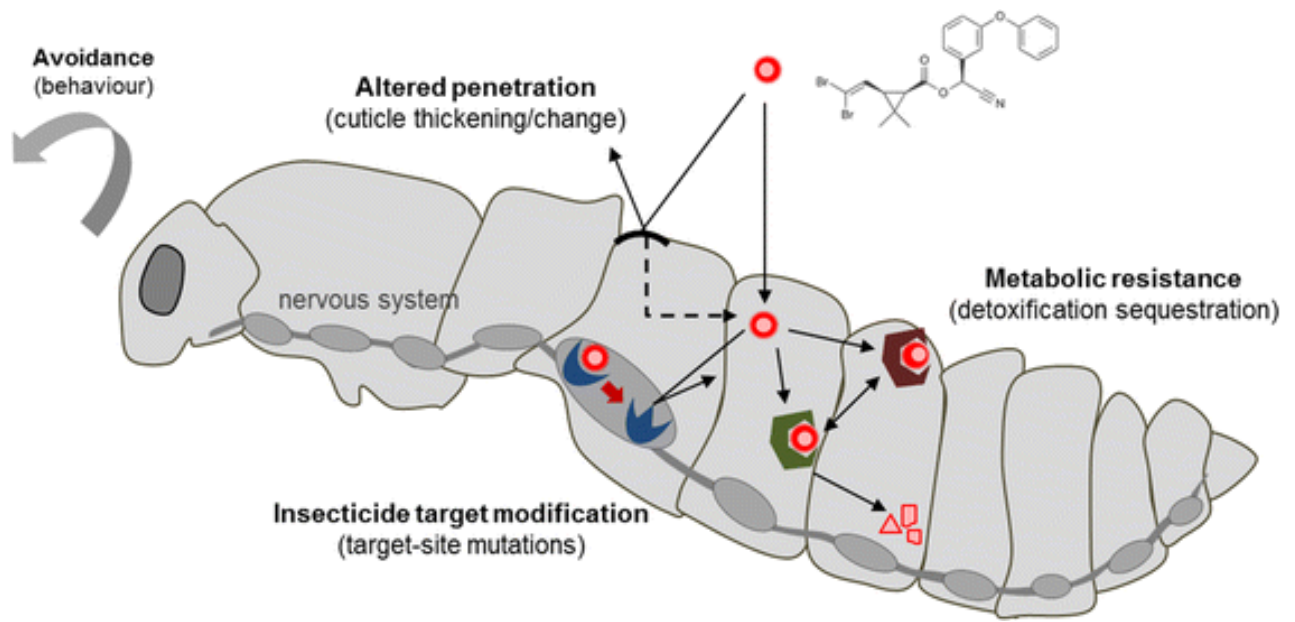
L'utilisation d'alternatives biologiques telles que des copépodes prédateurs, des poissons, des larves de *Toxorhynchite* ou l'insecticide à base des toxines de *Bacillus thuringiensis var israeliensis (Bti)*, est également possible<sup>23,27</sup>. Contrairement aux adultes, il semblerait que les larves sont peu aptes à développer des résistance<sup>28</sup>. Cela dit, le traitement des gîtes larvaires demeure laborieux, notamment à cause du nombre de gîtes potentiels, de la difficulté à y accéder, de la fréquence des traitements et des coûts qui y sont associés<sup>29,30</sup>. L'utilisation de champignons entomopathogènes est également une alternative potentielle, avec l'avantage de s'autodisséminer dans la population du moustique<sup>23,31</sup>. D'autres alternatives en développement incluent l'utilisation pièges spécifiques, la modification de génome ou l'infection avec *Wolbachia*, un genre bactérien généralement absent de *Ae. aegypti* qui provoque une incompatibilité cytoplasmique afin de produire une progéniture non viable<sup>32,33</sup>.



**Figure 4. Méthodes classiques et alternatives de gestion des populations de moustiques selon leur stade de croissance<sup>23</sup>.**

## 5. Mécanisme de résistance aux insecticides

L'utilisation d'insecticides entraîne une pression de sélection qui favorise l'établissement de résistance chez les populations d'*Ae. aegypti* comme dans le cas de la deltaméthrine, un pyréthrianoïde, en Guyane française<sup>34</sup>. Plusieurs mécanismes expliquent ces résistances, et il n'est pas rare que plus d'un soit retrouvé dans une même population. Chez *Ae. aegypti*, des mutations non synonymes ont été retrouvées dans les gènes codants de plusieurs canaux sodiques voltage dépendant<sup>35-37</sup>. Une augmentation de l'activité des enzymes de dégradation ou de séquestration des molécules d'insecticides a également été observée pour ce moustique<sup>38,39</sup>. Démontrée chez d'autres insectes, la résistance associée à la cuticule est caractérisée par l'épaississement de cette dernière, ce qui ralentit la pénétration de l'insecticide<sup>40,41</sup>. Chez le moustique, une corrélation entre l'épaisseur de la cuticule et la résistance aux insecticides chez *Anopheles funestus* (Giles, 1900) a été observée, ainsi qu'une réduction de la pénétration de la deltaméthrine chez *Anopheles gambiae* (Gillies, 1968)<sup>42-45</sup>. Une sélection chez des larves d'*Ae. aegypti* exposée au néonicotinoïde a démontré une surexpression de plusieurs gènes encodant pour des protéines de cuticules, suggérant une résistance cuticulaire<sup>46</sup>. Finalement, des changements de comportements, tels qu'une modification de la période de repas, un changement dans les hôtes ou une variation entre le caractère exophilique/endophilique, sont également observés chez certains moustiques, notamment chez le genre *Anopheles*<sup>47-49</sup>.



**Figure 5. Mécanismes de résistances présents chez les moustiques<sup>26</sup>.**

## **2. Microorganismes**

### **1. Microorganismes associés à *Ae. aegypti***

Le core-microbiome désigne l'ensemble des espèces partagées dans un habitat donné, telles que l'intestin, les ovaires, l'exosquelette, dans tous les organismes d'une même espèce<sup>50</sup>. Comme pour la plupart des moustiques, le core-microbiome du genre *Aedes* est essentiellement composé de bactéries Gram-négatives aérobiques et de bactéries anaérobies facultatives<sup>51-55</sup>. Seulement deux taxa anaérobies ont été retrouvés chez *Aedes*, soit *Clostridium* pour *Ae. aegypti* et *Blautia* chez *Aedes albopictus* (Skuse, 1894)<sup>8,56</sup>. Des populations d'*Ae. aegypti* prélevées dans différents sites au Brésil partagent toutes les mêmes espèces d'*Acinetobacter*, de *Pseudomonas* et d'*Aeromonas*. Il est estimé que les espèces appartenant à ces genres représentent presque 50% du microbiome. Des observations similaires sont également faites chez *Ae. albopictus* et *Ae. aegypti*, au Panama<sup>57</sup>. D'ailleurs, bien que 115 genres bactériens aient été décelés, seulement 16 ont une abondance relative supérieure à 1%, ce qui suggère que peu de groupes bactériens peuvent coloniser l'insecte<sup>57</sup>. Chez *Ae. albopictus*, *Ae. aegypti* et *Culex quinquefasciatus* (Say, 1823), les embranchements bactériens, Proteobacteria, Firmicutes, Bacteroidetes, Spirochetes, Actinobacteria et le candidat TM7 sont, dans cet ordre, les plus abondants<sup>58</sup>. Pour *An. gambiae*, les embranchements, *Cyanobacteria*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Actinobacteria* et *Firmicutes* forment plus de 91% des communautés bactériennes retrouvées à tous les stades de développement, mais dans des proportions variables<sup>51</sup>. Des embranchements eucaryotes tels que Apicomplexa, Ascomycota,

Entomophthoromycota, Basidiomycota, Mortierellomycotina, Chytridiomycota, Heterokontophyta, Mucromycotina et Mycetozoa sont également identifiés chez plusieurs espèces de moustiques<sup>55,58</sup>. Aux stades de larves et d'adultes, *Ae. aegypti* semble avoir une plus grande diversité bactérienne que *Ae. albopictus*<sup>56,57</sup>.

## **2. Acquisition du microbiote chez *Ae. aegypti***

Bien que des bactéries aient été identifiées à la surface des œufs, aucune n'a été détectée à l'intérieur<sup>8,59</sup>. Le microbiote des moustiques est majoritairement acquis au stade larvaire à cause de leur alimentation détritivore. Il est influencé par les communautés de microorganismes présentes dans le gîte<sup>9,60</sup>. La faible abondance des taxa bactériens dans les larves en comparaison avec l'eau du gîte suggère qu'une relation symbiotique s'établit dès le plus jeune stade larvaire, ce qui inhiberait la colonisation par d'autres taxa lors de la croissance<sup>61,62</sup>. La diversité taxonomique retrouvée est également plus élevée pour les larves que pour les adultes<sup>57,63</sup>. Cette différence serait expliquée par la présence de microorganismes assimilés pour l'alimentation, mais non digérés<sup>57</sup>. Il est observé que quelques OTUs détectés chez les adultes sont absents des larves, mais tous appartiennent à un genre bactérien retrouvé au stade larvaire<sup>8</sup>.

## **3. Transmission du microbiote**

La transmission transtadiale implique le transfert de microorganismes, pathogène ou non, acquis lors d'un stade de développement à un autre lors de la mue<sup>64</sup>. Chez les moustiques, il n'est pas clair si le microbiote est transféré aux adultes après la nymphose, s'il est acquis lors de leur contact avec l'eau à l'émergence ou une combinaison des deux<sup>65,66</sup>. D'une part, il est suggéré que le microbiote intestinal des

genres *Aedes*, *Culex* et *Anopheles* est éliminé à la formation de la membrane péritrophique qui séquestre les microorganismes lors de la transformation en nymphe<sup>65</sup>. Cela suggère que les larves et les nymphes conservent le microbiote acquis au cours de leur développement, mais qu'il ne serait pas conservé après l'émergence<sup>66</sup>. Cette hypothèse est soutenue à la suite de l'ensemencement du gîte larvaire par *P. stewartii*-GFP : la bactérie est retrouvée chez les larves puis les pupes de *Anopheles gambiae*, mais pas chez les adultes qui sont lavés et transférés dans de l'eau stérile au stade de nymphe<sup>66</sup>. *P. stewartii*-GFP est retrouvé chez les adultes qui ne sont pas transférés, ce qui suggère qu'ils perdent les microorganismes acquis pendant le stade larvaire, mais peuvent en récupérer au contact de l'eau lors de l'émergence<sup>66</sup>. En opposition, Chavshin *et al.* (2015) observent un transfert transstadial chez *Anopheles stephensi* (Liston, 1901) lorsque *Pseudomonas*-GFP est incorporé à l'environnement de larves L1<sup>67</sup>. Bien que les larves soient transférées après 24h dans de l'eau distillée jusqu'à la fin de leur développement, il est possible d'identifier la présence de bactéries dans les tubules de Malpighi<sup>67</sup>. *Pseudomonas*-GFP est retrouvé dans tous les stades de développement et persiste jusqu'à 21 jours après l'émergence<sup>67</sup>. Bien que l'acquisition du microbiote de façon transtadiale chez les adultes semble peu comprise, il est possible que les deux phénomènes soient impliqués.

La transmission verticale désigne le transfert transgénérationnel de microorganismes, comme des virus, de la femelle à sa progéniture<sup>64</sup>. Joshi *et al.* (2002) a démontré la transmission verticale du virus de la dengue sur sept générations de *Ae. aegypti*, ce qui suggère un rôle du moustique dans le maintien du virus dans la population<sup>68</sup>. Des observations similaires ont également été rapportées pour le virus de la fièvre jaune, le Zika et le Chikunguya<sup>69-71</sup>. La transmission verticale de bactéries a également été observée, notamment avec *Culex pipiens* (Linnaeus, 1758) et *Wolbachia*<sup>72</sup>. Cela dit,

seulement 17-20% des lignées étudiées ont démontré cette transmission verticale<sup>72</sup>. Hughes *et al.* (2014) ont observé une transmission verticale du genre *Wolbachia* chez *Anopheles*, mais celle-ci était fortement inhibée par le microbiote de l'insecte<sup>73</sup>. De plus, la ponte des œufs dans le site larvaire influence la communauté microbienne du gîte, ce qui entraîne une transmission indirecte du microbiome de la femelle vers les larves<sup>8</sup>.

#### **4. Rôle et fonctions du microbiote chez le moustique**

Comme pour de nombreux insectes, le microbiote a plusieurs rôles importants chez le moustique, notamment au niveau du développement, de l'alimentation, de la physiologie, de l'immunité et de la compétence vectorielle<sup>7,9,32</sup>. En plus de constituer une grande partie de l'alimentation des larves, les bactéries facilitent la digestion de repas sanguins des femelles adultes en relarguant des enzymes lytiques<sup>7,9,74</sup>. De plus, il est également proposé que *Serratia sp.* jouerait un rôle dans le métabolisme du sucre provenant du nectar, notamment lorsqu'il colonise le diverticule intestinal d'*Ae. aegypti*<sup>75</sup>.

D'autre part, l'association de certains genres bactériens, notamment *Wolbachia*, inhibe la réplication de virus chez *Ae. aegypti*, affectant sa dissémination et sa transmission<sup>32</sup>. Des résultats similaires sont également obtenus lors de l'introduction de *Proteus sp.* Prpsp\_P ou *Paenibacillus sp.* Pnsp\_P dans le tractus intestinal du moustique, provoquant une diminution du niveau d'infection par la dengue<sup>76</sup>. D'ailleurs, la présence de bactéries dans le tractus intestinal provoquerait une augmentation de l'immunité basale, alors qu'une diminution de ce microbiote intestinal favorise l'infection du moustique par le virus<sup>77</sup>.



Chez les œufs, la présence de bactéries à la surface du chorion favoriserait une éclosion plus rapide, alors qu'en absence de matière organique et de microorganismes, des œufs aseptisés n'éclosent pas<sup>3,78</sup>. D'ailleurs, seulement 4% des œufs d'*Ae. aegypti* placés dans de l'eau stérile réussissent à éclore après 5 jours, contre 94% en 4h pour ceux placés dans une infusion de feuilles, ce qui démontre l'effet du microbiote sur la capacité d'éclosion<sup>79</sup>. Enfin, les communautés microbiennes retrouvées dans l'eau des gîtes larvaires semblent jouer un rôle dans le choix des sites de pontes. La présence de certaines bactéries des genres *Bacillus*, *Pseudomonas* et *Enterobacter* se résulterait par la sécrétion de composés chimiques attractifs pour les femelles<sup>80</sup>.

Chez les larves, la présence de microorganismes dans l'environnement influence leur croissance, ainsi que leur capacité à muer d'un stade à l'autre<sup>8</sup>. Ainsi, des larves axéniques obtenues par stérilisation de la surface d'œufs ne survivent pas plus de cinq jours dans de l'eau stérile, et ce malgré la présence de nourriture stérile<sup>8</sup>. Ces larves n'ont d'ailleurs effectué aucune mue, restant au stade L1 jusqu'à leur mort<sup>8</sup>. L'ajout d'une souche de bactérie vivante, telle que *E. coli* DH5 naturellement absente de *Ae. aegypti*, suffit aux larves pour compléter leur croissance<sup>8</sup>. Bien que Blaire Steven et al. (2018) ont réussi à obtenir des larves de moustiques axéniques capables de compléter leur cycle de vie, des retards de croissance et des plus petites pontes sont observés<sup>81</sup>.

Des études ont établi des liens entre la résistance aux insecticides et le microbiote de certains insectes, tels que dans l'insecte du pois, *Riptortus pedestris* (Fabricius, 1775), un insecte ravageur qui forme naturellement une association avec *Burkholderia* au niveau du tract intestinal<sup>82,83</sup>. L'application fréquente de fénitrothion induit une augmentation de l'abondance de certaines souches de *Pseudomonas*, de

*Flavobacterium* et de *Burkholderia*<sup>82</sup>. Ces bactéries seraient en mesure de métaboliser la molécule chimique et s'en serviraient comme source de carbone<sup>84,85</sup>. Le genre *Citrobacter* retrouvé chez *Bactrocera dorsalis* augmenterait la tolérance de l'insecte à l'exposition au trichlorphon, alors que la présence de l'espèce *Enterococcus* a un effet similaire pour la teigne des crucifères, *Plutella xylostella* (Linnaeus, 1767), lorsqu'exposée chlorpyrifos<sup>86-88</sup>. Plusieurs exemples permettent de constater des variations du microbiote chez les moustiques lorsqu'ils sont exposés à des insecticides<sup>89-91</sup>. Après l'établissement de la résistance sur cinq générations, on remarque une augmentation significative de l'activité enzymatique des bactéries chez le moustique *An. stephensi* exposé au téméphos<sup>90</sup>. Dans le même sens, l'exposition des populations résistantes aux antibiotiques ramènerait la susceptibilité à l'insecticide<sup>83</sup>. Chez *Ae. aegypti* exposé à des antibiotiques à large spectre, le nombre de CFU ainsi que l'activité des estérases et P450 dans la larve diminue, ce qui conduit à une réduction de la détoxification du propoxur et du naled<sup>92</sup>. Cette observation suggère que la présence des bactéries contribuait à la tolérance de l'insecte aux insecticides.

## **5. Facteurs d'influence du microbiote chez le moustique**

De par sa plasticité, le microbiote du moustique peut être influencé par une multitude de facteurs, tels que le stade de développement, le sexe, la localisation géographique, l'environnement et l'espèce<sup>53,93</sup>. La structure du microbiote se modifie au cours du développement du moustique, notamment lors de la transition de l'environnement aquatique des larves vers l'environnement aérien des adultes<sup>51</sup>. Comme indiqué précédemment, la diversité des espèces retrouvées chez une espèce durant son cycle de développement peut varier, le stade larvaire étant celui avec la plus haute

diversité<sup>51</sup>. Le nombre d'OTU retrouvé dans l'eau des gîtes larvaires est supérieur à ceux retrouvés chez les larves, et cette tendance est plus prononcée pour les gîtes ayant déjà été colonisés par des moustiques<sup>62,94</sup>.

L'environnement dans lequel se développe l'insecte constitue un facteur d'influence très important pour le microbiote<sup>51,95</sup>. Chez *An. gambiae* et *An. Coluzii*, on observe une augmentation de la biodiversité du microbiote des adultes en saison sèche, avec 144 OTUs contre 79 OTU en saison des pluies<sup>96</sup>. Une hausse de la température de l'eau favorise le développement de Bêtaprotéobactérie. Leur présence est également corrélée avec la présence d'insecticides et une réduction de la diversité microbienne, ce qui peut induire des changements dans les communautés retrouvées chez les larves<sup>97</sup>. Le matériel du gîte larvaire peut influencer la composition microbienne du gîte, tel qu'observé avec le métal qui favorise de plus grandes proportions de Bacteroidia et Saprospirae chez *Ae. aegypti*<sup>57</sup>. Cela dit, Bennett *et al.* (2019) n'ont observé aucun effet de la température de l'eau ni du pH sur les structures microbiennes identifiées chez les larves<sup>57</sup>. Wang *et al.* (2018) observent que le microbiote est instable d'une année à l'autre, autant chez l'insecte que pour l'eau du gîte larvaire<sup>63</sup>.

À l'émergence des mâles et des femelles adultes, les moustiques se nourrissent de nectar et de sève de plantes afin de combler leurs besoins nutritifs<sup>98</sup>. Pour certaines espèces, les femelles doivent également se nourrir de sang afin de compléter l'ovogenèse. Cette différence dans l'alimentation fait du sexe un facteur indirect qui modifie le microbiote. En ce sens, Zouache *et al.* (2011) identifie le sexe du moustique comme étant un facteur pouvant expliquer près de la moitié de la diversité bactérienne retrouvée chez les adultes d'*Ae. albopictus*<sup>93</sup>. De plus, le genre *Elizabethkingia* est

associé aux femelles adultes qui se nourrissent que de sucre puisqu'il n'est plus détecté jusqu'à 4 jours suivant un repas de sang<sup>51,98</sup>. Une réduction de ce genre est également observée chez *An. gambiae* suite à l'ingestion de sang<sup>51</sup>. De plus, l'ingestion de sucre semble entraîner une diminution de la diversité microbienne, et celle-ci est exacerbée à la suite de la prise d'un repas sanguin<sup>51,98</sup>.

## **6. Mécanisme d'assemblage des communautés microbiennes**

Bien que les communautés bactériennes retrouvées dans un environnement donné varient en fonction d'une multitude de facteurs, certaines généralités peuvent s'observer quant à l'assemblage de ces dites communautés. Malgré une grande diversité au niveau des OTUs retrouvés dans un écosystème, une convergence s'observe au niveau des familles identifiées dans différents environnements de sols et de plantes étudiés<sup>99</sup>. Ces communautés semblent atteindre l'équilibre après une soixantaine d'ensemencements successifs de l'échantillon vers un milieu stérile<sup>99</sup>. Une convergence fonctionnelle est également observée entre des environnements similaires, mais une variabilité persiste au sein de ces classes fonctionnelles<sup>50,100</sup>. Une expérience en microcosme menée par Goldford *et al.* (2018) permet d'observer une plus grande similarité des communautés du sol ayant été diluée et cultivée sur des milieux contenant la même source de carbone comparativement aux communautés cultivées à partir du même échantillon<sup>99</sup>. Cette observation suggère que la source de carbone régit l'assemblage des communautés microbiennes<sup>99</sup>. Bien que la compétition inter espèce pour les ressources est un phénomène qui influence l'assemblage des communautés, certaines espèces peuvent s'établir en dépendant des produits métaboliques produits par les autres espèces<sup>99,101</sup>. De plus, il est globalement observé que la composition d'espèces retrouvées dans une communauté écologique est de moins en moins

similaire lorsque la distance augmente entre ces deux communautés. Plusieurs concepts entrent en jeu pour décrire les mécanismes d'assemblages des communautés microbiennes. Parmi ceux-ci se trouve l'invasion qui décrit la colonisation d'un environnement par un microorganisme qui était absent au départ de cet environnement<sup>102-104</sup>. Les facteurs qui influencent la réussite de l'invasion sont la disponibilité des ressources et la structure microbienne établie. Dans les milieux qui offrent une richesse en espèce élevée, il est observé que l'invasion du milieu par une espèce allochtone est plus difficile<sup>102,105</sup>. La dynamique d'une communauté bactérienne est affectée par plusieurs processus tels que la sélection, la dérive, la dispersion et la diversification<sup>106</sup>. La sélection concerne les changements dans la composition de la communauté qui sont causés par des facteurs déterministes<sup>107</sup>. À l'opposée, la dérive décrit les changements stochastiques observés au sein de la communauté microbienne. La dispersion décrit l'immigration et l'émigration, autrement dit le déplacement vers ou en départ de l'environnement, des microorganismes et est très fortement affecté par l'environnement. Finalement, la diversification décrit l'augmentation de la diversité des espèces retrouvées dans l'environnement, notamment lors de la multiplication qui entraîne de nouveaux variants.

### 3. Problématique

---

En Guyane française, les insecticides sont fortémens utilisée afin de contrôler les populations du moustique, et ainsi diminuer la transmission d'arbovirus aux humains. Or, la résistance des moustiques face aux insecticides est répandue à la majorité des populations du territoire<sup>94</sup>. L'augmentation de la résistance nécessite l'usage de plus grande concentration d'insecticide, ce qui entraîne des effets négatifs sur l'environnement et sur la santé des humains exposés, en plus des investissements financiers élevés<sup>108,109</sup>.

À ce jour, l'impact du microbiote sur la résistance aux insecticides de *Ae. aegypti* est peu connu. Il est observé que la présence du genre *Burkholderia*, naturellement présent chez *Riptorortus pedestris*, confère une résistance à l'insecte lorsque exposé au fénitrothion par cutané et oral<sup>82,85</sup>. En effet, certaines souches de *Burkholderia* développent la capacité de dégrader le composé après y avoir été exposé, et augmentent la tolérance de l'insecte face à l'insecticide lorsqu'elles le colonisent<sup>85</sup>. Il s'agit d'un des premiers cas de symbiose insectes-bactéries observés qui favorise la survie de l'insecte contre un insecticide. Cela dit, des variations dans la composition du microbiote d'*Anopheles* à la suite d'une exposition au téméphos ont été rapportés<sup>96</sup>.

À ce jour, les mécanismes de recrutement horizontal du microbiome par les larves sont peu connus. La littérature suppose que le microbiote observé chez les larves est acquis à partir de leur environnement, donc majoritairement de l'eau du gîte dans lequel elles se développent. Cela dit, peu de littérature appuie cette supposition, et le manque d'études à ce sujet invite à se questionner dans quelle mesure le microbiote

de l'eau influence les communautés bactériennes retrouvées dans les larves. Notamment, est-ce que les structures des communautés de l'eau sont représentatives de celles qu'on retrouve dans les larves, ou partagent-elles seulement des espèces communes ? Avant de chercher à étudier l'impact du microbiote sur la résistance, il est primordial de comprendre comment les communautés bactériennes associées aux larves s'y établissent.

## 4. Hypothèse de recherche

---

L'hypothèse est que la structure du microbiote bactérien des larves d'*Ae. aegypti* covarie avec la structure des communautés bactériennes retrouvées dans l'eau des gîtes larvaires et les paramètres de l'environnement qui l'entoure. Afin de supporter ou réfuter cette hypothèse, trois objectifs spécifiques ont été définis :

- La caractérisation des microbiotes issus de l'eau des gîtes et des larves sera effectuée.
- La comparaison entre les microbiomes des deux environnements provenant d'un même site.
- L'analyse des effets des paramètres biotiques et abiotiques de l'environnement sera effectuée afin d'évaluer leur rôle comme facteurs d'influence du microbiote bactérien des larves.



## 5. MATÉRIEL ET MÉTHODE

---

### 1. Sélection des sites et échantillonnage

Au total, 141 gîtes potentiels répartis dans 9 régions de la Guyane française ont été sélectionnés pour l'échantillonnage. Parmi ces gîtes potentiels, 92 se sont avérés positifs pour la présence d'*Ae. aegypti* lors de la collecte qui s'est déroulée entre octobre et novembre 2017. Un volume de 700ml d'eau a été récolté afin de procéder à l'analyse physico-chimique, puis à l'extraction d'ADN génomique. La température (C°), le pH et la conductivité ( $\mu\text{S}/\text{cm}$ ) ont été mesurés directement sur le terrain à l'aide de sondes (HANNA instruments et Cond 3210 + probe TetraCon 325, WTW, Germany). La présence d'autres insectes, tels que des chironomes, a été notée. La caractérisation physique du gîte (taille, couleur, matériaux) a été effectuée. Des photos de chaque site ont également été prises afin de décrire leur environnement immédiat. Les larves de moustique ont été récoltées et triées selon l'espèce, puis celles n'ayant pas encore atteint le stade L4 ont été placées à l'insectarium dans l'eau de leur gîte respectif pour finaliser leur croissance. Les larves L3-L4 d'*Ae. aegypti* ont été regroupées (n=30) par gîtes, et congelées à -20°C jusqu'à l'extraction d'ADN.

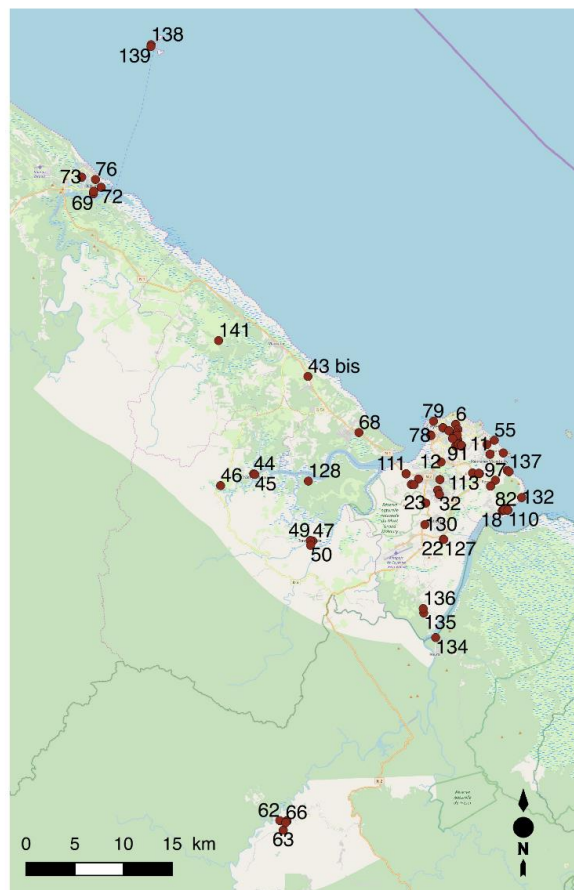


Figure 6. Répartition des 141 gîtes ciblés en Guyane française pour la collecte de larves

## 2. Analyses physico-chimiques de l'eau

À partir de prélèvement de 200 ml, l'oxygène dissous (mg/L), la turbidité (FNU) et la demande chimique en oxygène (COD, mg/L) pour chaque site ont été mesurés. Un total de 700ml d'eau de chaque site a été centrifugé à 4 °C pendant 10 min à 8000 RPM et les culots obtenus ont été conservés à -20°C pour l'extraction d'ADN. Le surnageant a été utilisé pour déterminer les paramètres de salinité (g/L), Fe (mg/L), Mg (mg/L), Ca (mg/L), Cu (mg/L) et Zn (mg/L). Toutes les analyses ont été effectuées selon les méthodes standards du laboratoire d'hygiène et d'environnement (LHE) de l'Institut Pasteur de la Guyane française.

### **3. Extraction d'ADN provenant des échantillons d'eau et de larves**

Pour chaque site, vingt à trente larves au stade L3-L4 ont été sélectionnées pour l'extraction. L'extérieur des larves a été lavé selon le protocole de *Zouache et al.* (2011). En résumé, le groupe de larves a été rincé à l'eau stérile 3 fois, puis stérilisé dans de l'éthanol 70% pendant 10 minutes et finalement rincé 5 fois supplémentaires à l'eau stérile. Un dernier rinçage à la saline stérile (0.8% NaCl) a été effectué.

À l'aide d'un homogénéisateur à billes (MM 40, RETSCH, France), les larves de chaque échantillon ont été broyées pendant 30 secondes dans 80 µl de tampon phosphate salin stérile. La lyse mécanique a été complétée par un traitement enzymatique et chimique en ajoutant 20µl de protéinase K et 700µl de tampon de lyse (SL1, NucleoSpin® Soil) à chaque tube incubé 12h à 56°C. La suite de l'extraction s'est déroulée selon le protocole de la trousse NucleoSpin® Soil. L'extraction d'ADN génomique total des culots provenant de l'eau centrifugée fut également exécutée selon les instructions du fournisseur de la trousse d'extraction (Macherey-Nagel, É.-U.). À titre de contrôle négatif, des extractions d'ADN ont été effectuées sur de l'eau stérile pour chaque session d'extraction.

L'intégrité de l'ADN obtenu a été vérifiée par une réaction en chaîne par polymérase (PCR) visant l'amplification d'une portion du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries avec les amorces universelles 28F (5' GAG TTT GAT CNT GGC GGC TCA TCA G 3') et 519R (5' GTN TTA CNG CGG CKG CTG 3'). Chaque réaction contenait 0.4µM de chaque amorce, 2.5 U de Polymérase green Taq et 1X de tampon ThermoPol, pour

un total de 25 µl. Le cycle d'amplification utilisé commençait avec une dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivis de 30 cycles (94°C pour 30 s, 58°C pour 30 s et 72°C pour 30 s) et d'une élongation finale de 10 minutes à 72°C. Une électrophorèse sur gel d'agarose 1.5% a été effectuée afin de valider la qualité des fragments obtenus.

#### **4. Séquençage Illumina MiSeq**

La région V6-V8 du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries a été amplifiée avec les amorces B969F-CS1 (5'- ACGCGHNRAACCTTACC-3') et BA1406R-CS2 (5'- ACGGGCRGTGWGTRCAA-3') en vue du séquençage (Comeau et al. 2011). La réaction PCR s'est effectuée avec 2 µl d'ADN total, 0.5µl d'amorce 10µM, 0.25 µl de MgSO (25 mM), 0,25 de BSA (20 mg/ml) dans du tampon II 1 X et 2.5 U de Taq polymérase haute-fidélité (nom du produit, Invitrogen, ville, pays). L'amplification a lieu à la suite d'une dénaturation initiale de 5 min à 94°C suivie de 30 cycles (94°C pour 30 s, 58°C pour 30 s et 68°C pour 30 s) et d'une élongation finale de 10 minutes à 68°C. Les produits d'amplification ont été vérifiés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1.5%(p/v), et les produits n'ayant pas amplifié sont repris avec 35 cycles, puis 40 cycles au besoin. Lorsque tous les amplicons ont été vérifiés, ils ont été purifiés en utilisant la trousse commerciale AMPure XP beads. Brièvement, 16 µl de billes AMPure ont été ajoutés et mélangés aux amplicons, puis incubés 5 minutes à température ambiante avant leur transfert sur un support magnétique pendant 2 minutes. Le liquide était ensuite retiré, puis deux lavages des billes à l'éthanol 80% ont été effectués avant de laisser sécher les billes 10 minutes. Les amplicons étaient ensuite mis en suspension dans 50 µl Tris-HCl 10 mM (pH 8,5), puis utilisés pour une deuxième PCR afin d'y intégrer les codes à barres utilisés pour discriminer les différents échantillons et les adaptateurs nécessaires au séquençage Illumina. Ces

amplicons ont également été purifiés tel que décrit précédemment et dosés par PicoGreen avant de préparer un composite de bibliothèques de séquençage constitué d'un mélange équimolaire de chaque produit de PCR. Le composite était constitué de 1.5 ng de chacun des produits PCR. Ce dernier fut envoyé au Centre d'Expertise et de services Génome Québec (Montréal, QC, Canada) pour un séquençage sur la plateforme Illumina MiSeq PE-250.

## **5. Traitement des séquences par USEARCH**

Les séquences ont été analysées à l'aide du logiciel USEARCH 64 et du pipeline UPARSE (Edgar, 2013). Les 17 nucléotides formant les amorces sens et antisens ont été retirés. Les séquences avec un score de faible qualité ont été retirées avec un filtre d'erreurs maximum de 1.0, après lequel 79.2% des séquences sont conservées. Suite au contrôle de qualité, 83.21% de toutes les paires de séquences ont été fusionnées avec une longueur minimale de 400 pb jusqu'à un maximum de 500 pb. Les fusions en dehors de ces longueurs, ainsi que celles qui présentaient un nombre de "mismatch" supérieur au-dessus de 0.3% ont été exclues. Les séquences assemblées ayant rencontré les exigences du contrôle de qualité ont été regroupées en unité taxonomique opérationnelle (OTU) à l'aide de la méthode UPARSE OTU, avec un seuil d'identité à 97%. Une première assignation taxonomique a été effectuée avec la Ribosomal Database Project (RDP). Les OTU affiliés aux chloroplastes et ceux qui étaient représentés par moins de 0.005% du nombre total de séquences ont été retirés. L'assignation taxonomique finale des OTUs a été effectuée à un niveau de confiance de 80%. Les séquences brutes (fichiers. fastq) ont été déposées sur la base de données génomique publique Sequence Read Archive du NCBI. Le code de référence pour accéder aux données est PRJNA600474.

## **6. Variables caractérisant l'environnement immédiat et à proximité**

Plusieurs variables ont été considérées pour caractériser l'environnement des échantillons : l'environnement direct de la larve, soit les paramètres physico-chimiques de l'eau ainsi que les microorganismes ayant été détectés par séquençage d'amplicons PCR, des variables de l'environnement à proximité du lieu de collecte ainsi que les coordonnées géographiques de chaque site. Il s'agit de variables quantitatives et nominales. Ces dernières ont été déterminées à partir de photos et d'observations effectuées sur le site de collecte. Dans un premier temps, les photos prises lors de l'échantillonnage ont été visionnées et décrites pour chaque site de collecte. Une fois les observations notées, les caractéristiques observées fréquemment ont été sélectionnées pour devenir une variable. À titre d'exemple, la couleur du gîte, le type de végétation retrouvée sur le site et la présence d'animaux sont des caractéristiques observées pour chacun des sites. Les sites conservés pour l'analyse sont ceux pour qui toutes les variables étaient observées, pour un total de 60 sites. Au total, 28 variables ont été conservées afin de caractériser chaque site de collecte. Ces variables sont résumées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 1. Variables ciblées pour l'analyse, leur type et leur description.**

<i>Variable</i>	<i>Description</i>	<i>type</i>
<i>Volume</i>	Volume du gîte	Quantitatif, (L)
<i>Température</i>	Température de l'eau au moment de la collecte	Quantitatif, (°C)
<i>pH</i>	pH de l'eau du gîte	Quantitatif
<i>ORP</i>	Potentiel d'oxydoréduction	Quantitatif
<i>DO</i>	Oxygène dissous	Quantitatif
<i>Con</i>	Conductivité	Quantitatif, uS/cm
<i>Ca</i>	Concentration en calcium dans l'eau	Quantitatif, mg/L
<i>Mg</i>	Concentration en magnésium dans l'eau	Quantitatif, mg/L
<i>K</i>	Concentration en potassium dans l'eau	Quantitatif, mg/L
<i>Cu</i>	Concentration en cuivre dans l'eau	Quantitatif, mg/L
<i>Fe</i>	Concentration en fer dans l'eau	Quantitatif, mg/L
<i>Zn</i>	Concentration en zinc dans l'eau	Quantitatif, mg/L
<i>DCO</i>	Demande chimique en oxygène	Quantitatif
<i>Total_aedes</i>	Nombre de larves d'Aedes dans le gîte	Quantitatif, Unitaire
<i>Total_autre</i>	Nombre de larves d'insecte autre que Aedes	Quantitatif, Unitaire
<i>Matériel</i>	Matériel qui compose le gîte : Plastique, métal, caoutchouc, bois ou porcelaine.	Qualitatif nominal
<i>Rouille</i>	Présence de rouille dans le gîte	Qualitatif nominal
<i>Peinture</i>	Présence de peinture dans le gîte	Qualitatif nominal
<i>Volaille</i>	Présence d'oiseau sur le site	Qualitatif nominal
<i>Débris végétal</i>	Présence de végétaux dans l'eau du gîte	Qualitatif nominal
<i>Cloisonnement</i>	Cloisonnement de l'espace, autrement dit la facilité d'accès : Partielle, complète ou totale.	Qualitatif ordinal
<i>Végétation</i>	Strate végétale dominante au site de collecte : Aucune végétation, herbe, arbustes, arbres.	Qualitatif nominal
<i>Bâtis</i>	Durabilité du bâtiment : Durable, éphémère, aucun bâtiment	Qualitatif nominal
<i>Bâtiments</i>	Matériel du bâtiment le plus proche : Béton, bois, métal ou aucun	Qualitatif nominal
<i>Type de site</i>	Fonction du site : Résidentiel, habitat spontané, industriel ou agricole	Qualitatif nominal
<i>Sol</i>	Occupation du sol : Entreposage, ornemental ou alimentaire	Qualitatif nominal
<i>Espèces</i>	Présence exclusive d'Aedes (mono) ou présence d'autres insectes (mixte)	Qualitatif nominal
<i>Emplacement</i>	Position géographique du gîte	Coordonnée géographique

## **7. Analyses statistiques**

Une première analyse des données a été réalisée afin d'évaluer la similarité entre les communautés microbiennes détectées dans l'eau et celles détectées dans les larves de chaque gîte échantillonné. Dans un premier temps, le total de séquences par OTUs a été calculé pour tous les échantillons d'eau et de larves afin de calculer l'abondance relative de chaque genre dans les deux biotopes.

La seconde phase des analyses statistiques avait pour objectif de cerner l'importance des caractéristiques de l'environnement des gîtes pour expliquer la variation des communautés microbiennes détectées dans les larves. Un aspect original de l'approche utilisée est l'évaluation de contribution de différents facteurs seuls et en combinaison pour examiner la covariation de l'habitat avec celle du microbiome de l'insecte hôte. Une attention particulière a été portée sur la redondance potentielle entre les différents facteurs considérés dans l'analyse. Quatre matrices ont été utilisées : celle relevant tous les OTUs identifiés dans l'eau des sites larvaires, celle décrivant la physico-chimie de l'eau de gîte, celle identifiant l'environnement immédiat du gîte et une dernière incluant les positions géographiques de chaque collecte. Une approche d'analyse canonique a été choisie, en utilisant deux scénarios différents, soit une approche contrainte et une approche non contrainte. L'approche contrainte comporte d'abord une étape où les variables de la matrice indépendante contribuant le plus à expliquer la variation de la composition du microbiome des larves sont identifiées et extraites pour élaborer un modèle parcimonieux. Ces modèles étaient calculés à partir d'analyse de redondance pour les variables quantitatives, d'une analyse des correspondances multiples pour les variables nominales et d'une



régression polynomiale pour les coordonnées des gîtes<sup>110</sup>. Les quatre modèles parcimonieux dérivés (1: microbiome larves vs microbiome eau, 2: microbiome larve vs physico-chimie de l'eau, 3: microbiome larves vs environnement du gîte et 4: microbiome larve vs position géographique) étaient ensuite intégrés dans une analyse de partitionnement de la variation<sup>111</sup>. Cette analyse permet de considérer l'effet de chaque matrice sur la variance observée chez les larves, mais également l'effet combiné des matrices entre elles (c.-à-d. leur redondance). Une attribution de la proportion de la variation du microbiome des larves expliquée par chacun des modèles parcimonieux seuls ou en combinaison était ainsi obtenue. L'approche non contrainte quant à elle reposait sur l'élaboration d'analyses en composantes principales aux lieux des analyses de redondances spécifiées plus haut. Suivant cette approche, il est supposé que les plus importants gradients distinguant les gîtes selon la composition du microbiome de l'eau et des conditions biotiques et abiotiques de l'eau covarient avec les plus importants gradients de composition du microbiome des larves. Cette seconde stratégie implique également une analyse de partitionnement de la variation pour déterminer la proportion de la variation du microbiome des larves expliquée par chacun des modèles parcimonieux seuls ou en combinaison.

L'exécution des analyses reposant sur les approches contraintes et non contraintes comportait une série d'opérations exécutées à l'aide du logiciel R<sup>112</sup>. Tout d'abord, une transformation de type `box_cox_chord` a été appliquée à toutes les matrices d'OTU en raison de la structure compositionnelle des données ainsi que la forte proportion de valeurs nulles (zéro) attribuées à la fréquence des OTUs. Les variables de la matrice physico-chimique ont été centrées et réduites avec la fonction `decostand` du module "Vegan" version 2.5-3<sup>113</sup>. Pour l'approche non contrainte, une analyse en composante principale (PCA) a été effectuée sur les matrices : microbiome des larves, microbiome

de l'eau et les paramètres physico-chimiques de l'eau. Une analyse de correspondance multiple a été effectuée avec la matrice environnementale pour tenir compte des variables qualitatives. Les six premiers axes de chacune des analyses multivariées, représentant les six dimensions contribuant à expliquer la plus importante proportion de la variation des profils, ont ensuite été sélectionnés pour la suite des analyses. Le choix des six axes se base sur le pourcentage de variation expliqué qui cesse d'augmenter à partir du septième axe. Un test de Mantel est effectué sur la matrice de données géographiques pour mettre en lien la variation du microbiome des laves avec la distance entre les gîtes. L'analyse de partitionnement de variation a finalement été réalisée avec les PCA de chaque matrice significative en utilisant la fonction `Varpart` du module "Vegan" (version 2.5-3). Pour l'analyse reposant sur l'approche contrainte, l'analyse de partitionnement de variance a été exécutée en utilisant les modèles parcimonieux des analyses de redondance (RDA) réalisées avec la fonction `RDA` du module "klaR" (version 0.6-14). Finalement, les résultats obtenus par l'approche PCA et l'approche RDA ont été représentés dans une série de diagrammes préparés à l'aide du module "ggplot2" version 3.3-5<sup>14</sup>.

## 6. RÉSULTATS

---

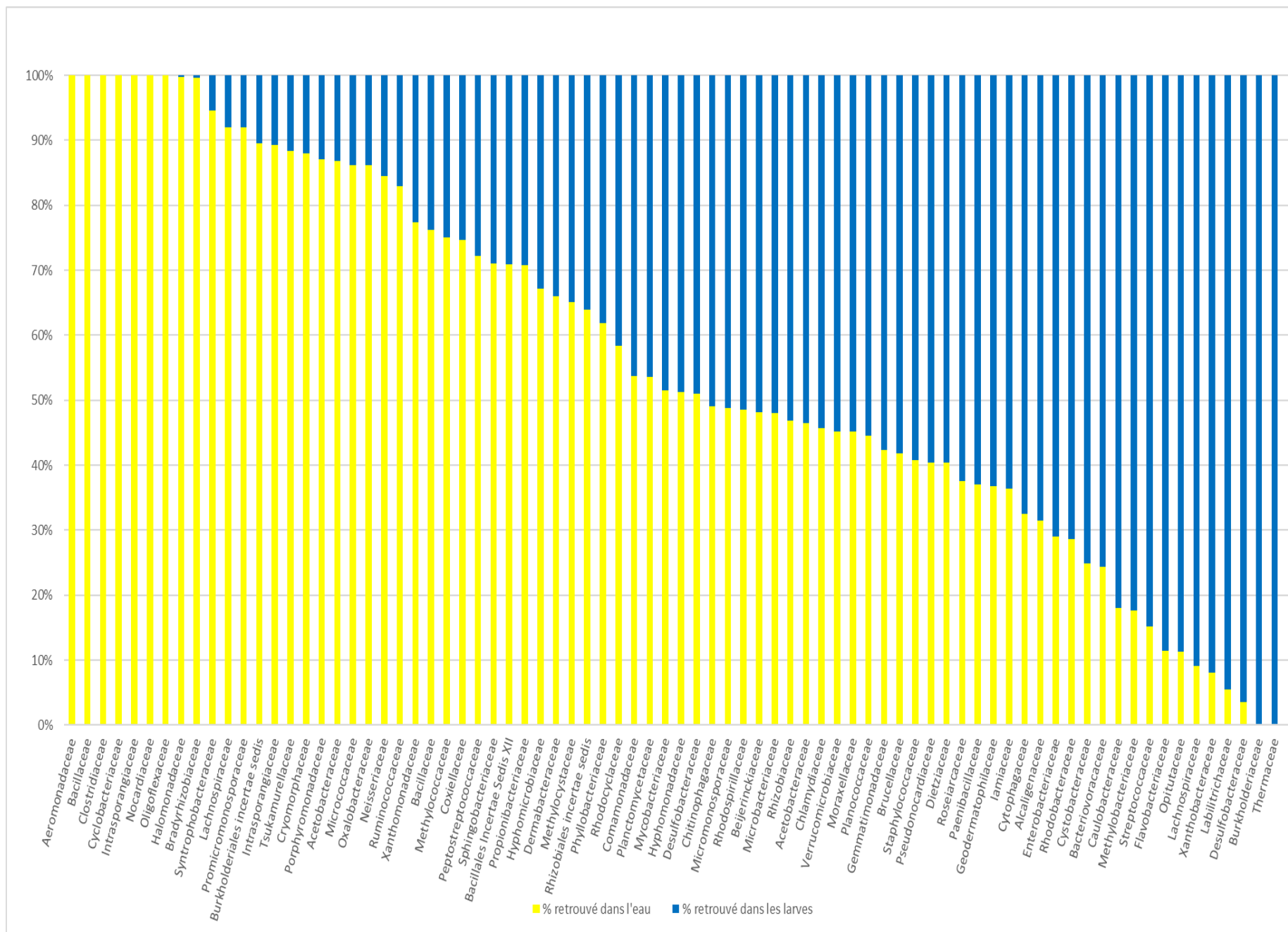
### 1. La distribution des familles bactériennes diffère entre les échantillons d'eau de gîte larvaire et les larvaires

Les larves et l'eau du gîte larvaire ont été collectées dans un total de 60 sites de Guyane française. À la suite du contrôle de qualité et du retrait des séquences non spécifiques, un total de 1 838 401 séquences séparées en 917 372 séquences dans l'eau et 921 029 chez les larves ont été obtenues. Le regroupement des séquences révèle 935 OTUs, et les OTUs qui n'étaient pas retrouvées dans au moins 5% des échantillons ont été retirées des analyses, pour un total de 595 OTUs différents parmi tous les échantillons de larves et 743 OTUs parmi tous les échantillons d'eau de gîte. Les échantillons d'eau présentent 110 OTUs retrouvées dans plus de 50% des cas, en comparaison avec 88 OTUs pour les larves. Les séquences non assignées, soit 19 7015 (21%) et 22 9045 (25%) pour les gîtes larvaires et les larves, respectivement, ont été retirées des analyses suivantes.

Une comparaison des deux types d'échantillons a été effectuée en combinant tous les résultats obtenus pour les gîtes larvaires, puis pour les larves elles-mêmes. Ainsi, 81 familles bactériennes ont été observées dans les gîtes et 77 chez les larves. On constate que 73 familles sont communes aux deux types d'échantillons, quoique leur abondance relative diffère (Figure 7). Certaines familles sont retrouvées presque exclusivement dans l'eau, tel que c'est le cas pour Sphingomonadaceae qui représente 21% de toutes les familles détectées dans les gîtes larvaires. Or malgré l'abondance relative de cette famille dans l'habitat immédiat de la larve, sa présence dans l'insecte

est rare (0,01%). Cette observation s'observe avec d'autres familles, telles que Chitinophagaceae (4.24%), Verrucomicrobiaceae (0.33%), Labilitrichaceae (0.40%), Cytophagaceae (1.42%) et Alcaligenaceae (1.77%) (voir Tableau 2).

Près de 75% de toutes les séquences observées chez les larves sont réparties dans huit familles bactériennes. L'abondance relative de certaines familles est davantage élevée chez les larves que dans leur environnement, comme c'est le cas pour Microbacteriaceae (22%), Enterobacteriaceae (15%), Methylobacteriaceae (10%), Comamonadaceae (7%), Acetobacteraceae (6%), Rhodocyclaceae (5%), Rhizobiaceae (5%) et Bradyrhizobiaceae (5%). Methylobacteriaceae est 9,6 fois plus abondante dans les échantillons de larves qu'elle ne l'est dans l'eau.



**Figure 7. Distribution des familles bactériennes selon l'environnement où elles sont détectées, soit dans l'eau des gîtes larvaires et chez les larves.**

**Tableau 2. Comparaison du nombre de séquences obtenues pour chaque famille selon l'environnement.**

Famille	Nombre de séquences dans les gîtes	Nombre de séquences chez les larves	Abondance absolue dans les gîtes (%)	Abondance absolue chez les larves (%)	Abondance relative dans les gîtes (%)	Abondance relative chez les larves (%)
Chitinophagaceae	30589	10	99.97	0.03	4.25	<0.014
Sphingomonadaceae	150911	90	99.94	0.06	20.95	0.01
Verrucomicrobiaceae	2338	16	99.32	0.68	0.32	<0.01
Labilitrichaceae	2905	21	99.28	0.72	0.40	<0.01
Cytophagaceae	10185	97	99.06	0.94	1.41	<0.01
Alcaligenaceae	12769	183	98.59	1.41	1.77	0.03
Sphingobacteriaceae	832	8570	8.85	91.15	0.12	1.24
Legionellaceae	712	9353	7.07	92.93	0.10	1.35
Planctomycetaceae	68	1240	5.20	94.80	0.01	0.18
Planococcaceae	45	1795	2.45	97.55	0.01	0.26
Paenibacillaceae_1	154	15522	0.98	99.02	0.02	2.25
Enterococcaceae	21	3047	0.68	99.30	<0.01	0.44

## **2. Certaines familles sont trouvées exclusivement dans l'un ou l'autre des environnements analysés**

Un total de 7 familles a été détecté uniquement dans les échantillons d'eau avec une abondance relative dans l'environnement des gîtes variant entre 0,001% jusqu'à 0,3%. Cela dit, certaines familles telles que Gemmatimonadaceae sont détectées dans 17% des échantillons, soit 10 gîtes différents. L'occurrence des autres familles varie telle

que Bacteriovoracaceae (11%), Bdellovibrionaceae (4%), Deinococcaceae (9%), Methylophilaceae (13%), Opitutaceae (2%) et Sneathiellaceae (5%) (voir tableau 3). La présence de ces familles uniquement dans l'eau des gîtes larvaires peut indiquer qu'elles n'ont pas été recrutées par les larves, ce qui peut indiquer un recrutement spécifique de leur part, bien qu'un manque de sensibilité dans la détection du microbiote larvaire ne puisse pas être exclu.

À l'inverse, trois familles ont été détectées uniquement dans les échantillons de larves. Il s'agit de Aeromonadaceae avec une abondance relative de 0.003%, Clostridiales\_Incertae\_Sedis\_XIII (0.004%) et Lachnospiraceae (0.1%) (voir tableau 2). Ces familles sont retrouvées dans 2 à 5% des échantillons, ce qui peut également être attribué à un manque de sensibilité ou de spécificité de l'approche de séquençage et d'analyse choisies. Advenant que ce ne soit pas le cas, il pourrait s'agir de transmission du microbiote vertical, soit de la femelle aux larves.

Ces analyses exploratoires de la composition du microbiome des larves et de l'eau relevant les groupes taxonomiques ubiquitaires et ceux dont la distribution était spécifique à un habitat spécifique suggèrent que même si les insectes peuvent recruter les microorganismes présents dans l'environnement, il existe une certaine spécificité faisant en sorte qu'il y a un découplage entre la composition du microbiome de la larve et celle de l'eau de son habitat. Les prochaines sections permettront de déterminer l'importance des caractéristiques microbiologiques, physico-chimiques et environnementales des gîtes larvaires pour expliquer la variation de la composition du microbiome observée chez les larves.

**Tableau 3. Comparaison des familles retrouvées exclusivement dans un des deux environnements étudiés**

Familles	Abondance relative des séquences dans les gîtes (%)	Abondance relative des séquences chez les larves (%)	Abondance d'échantillon de gîtes (%)	Abondance d'échantillon de larves (%)
Bacteriovoraceae	0.01	<0.01	10.8	<0.01
Bdellovibrionaceae	0.02	<0.01	4.2	<0.01
Deinococcaceae	0.05	<0.01	9	<0.01
Gemmatimonadaceae	0.03	<0.01	17.4	<0.01
Methylophilaceae	0.08	<0.01	13.2	<0.01
Opitutaceae	<0.01	<0.01	2.4	<0.01
Sneathiellaceae	0.3434	<0.01	4.8	<0.01
Aeromonadaceae	<0.01	<0.01	<0.01	4.8
Clostridiales_Incertae_Sedis_XIII	<0.01	<0.01	<0.01	2.4
Lachnospiraceae	<0.01	0.06	<0.01	2.4

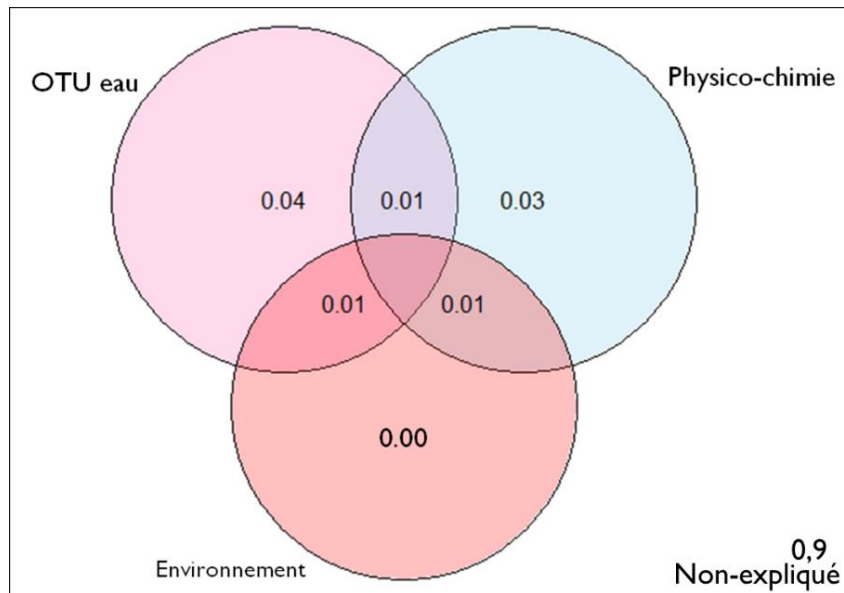


### **3. Contribution des paramètres environnementaux sur la variance observée entre les OTUs identifiés chez les larves –**

#### **3.1 Approche non contrainte par analyse en composante principale (PCA)**

Une série de PCA a été effectuée pour identifier les gradients les plus importants contribuant à distinguer les échantillons. Ainsi, les analyses permettent de répartir les échantillons selon leur similarité dans un espace réduit, défini par deux axes représentant les plus importants gradients (figure 2). Cette approche est dite non contrainte puisqu'elle permet de représenter chaque matrice en fonction des similarités observées entre les échantillons sans examiner la relation de ces similarités avec des variables indépendantes. La comparaison de différentes PCA permet ensuite d'observer si les critères évalués permettent d'observer des similarités qui concorderaient avec l'un ou l'autre des paramètres étudiés. L'analyse de partitionnement de la variation a permis de déterminer la proportion de la variation des profils du microbiome des larves expliquées par le microbiome de l'eau, de la physico-chimie, de l'environnement et de la géolocalisation (voir annexe 1). Les résultats provenant de la matrice de géolocalisation n'étant pas significatifs, ceux-ci ont été exclus de l'analyse de partitionnement de la variation. Ce type d'analyse ne permet pas d'obtenir de p-value. Il est observé que la matrice d'OTUs présente dans l'eau explique 4% de la variation observée chez les larves, celle des paramètres physico-chimiques explique 3% supplémentaires alors que celle décrivant l'environnement ne contribue pas à expliquer la variation observée entre chaque échantillon de larve. L'analyse permet également d'estimer l'effet combiné des matrices

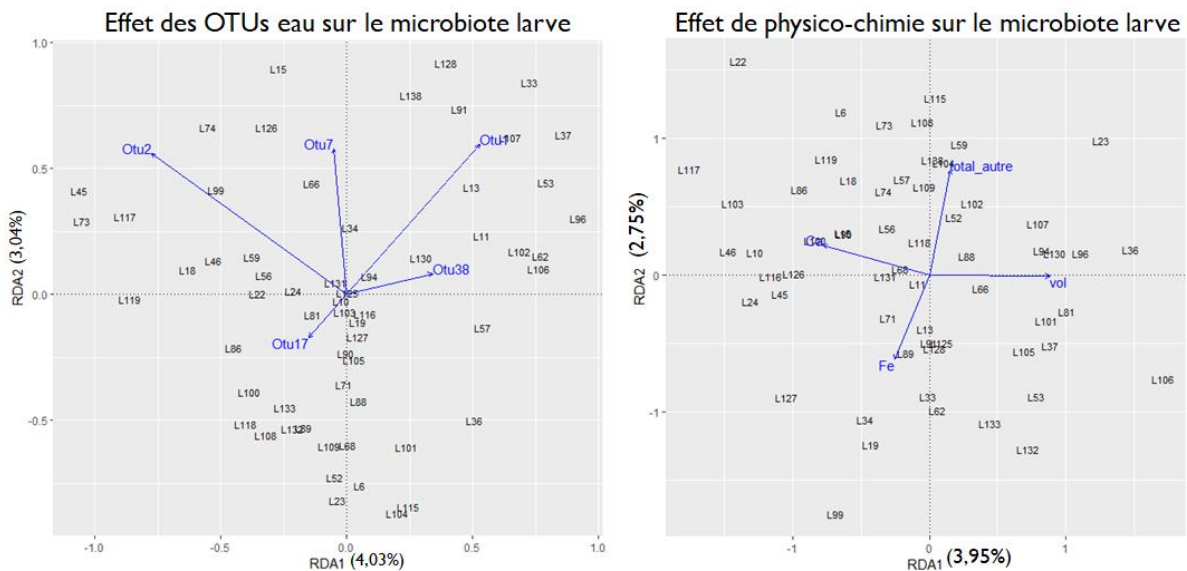
sur les échantillons de larves, ce qui permet d'expliquer 3% supplémentaires de la variation. Cela étant dit, il reste 90% de la variation qui n'est pas expliquée par les matrices explicatives, suggérant que d'autres facteurs influencent cette variabilité.



**Figure 8. Contribution de chaque matrice de variables expliquant la variabilité d'OTUs observée chez les larves**

### 3.2 Approche contrainte par analyse de redondance (RDA)

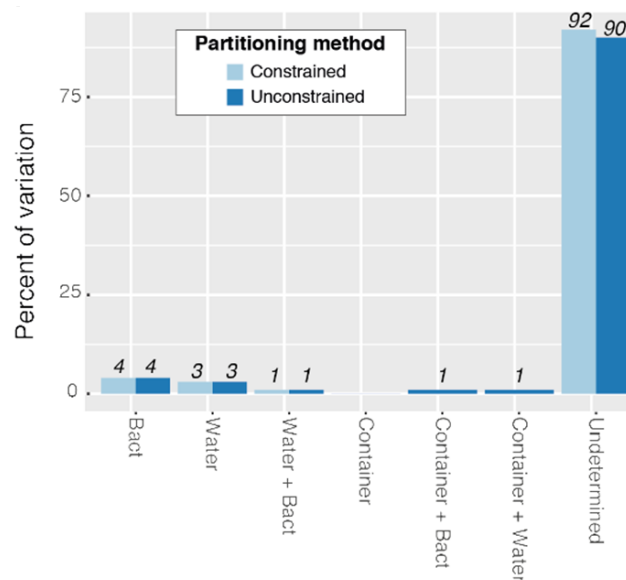
L'approche contrainte permet d'intégrer des variables indépendantes, ici celles des OTUs de l'eau, de physico-chimie et d'environnement, pour déterminer si ces dernières peuvent expliquer la variation du microbiome observée chez les larves. Le modèle parcimonieux de la RDA permet d'estimer le pourcentage explicatif des OTUs de l'eau sur la variation des OTUs des larves à 4%, et celle de la physico-chimie à 3% ( $p < 0.05$ ). Pour cette approche, l'effet de l'environnement et de la géographie était non-significatif.



**Figure 9. RDA des matrices des OTUs de l'eau et de la physico-chimie expliquant la variation observée dans le microbiote des larves, respectivement.**

### 3.3 Comparaison des résultats obtenus par les deux approches

L'analyse de partitionnement de la variation permet d'évaluer l'effet de l'environnement sur les communautés bactériennes de l'insecte, en tenant compte des variables physico-chimiques, mais également des caractéristiques terrain. Il s'avère que les paramètres physico-chimiques expliquent environ 3% de la variation observée dans les communautés bactériennes des larves, alors les communautés de l'eau expliquent environ 4%. Les caractéristiques physiques du gîte, telles que le type de matériau, la couleur ou la présence de détritrus, ainsi que les caractéristiques du site, telles que la géolocalisation ou le type de terrain, ne semblent pas avoir d'effet sur la variation observée. Toutes les RDA parcimonieuses présentées ainsi que les résultats de partitionnement de la variation présentés avaient des p-value 0.05, ce qui signifie qu'elles sont significatives.



**Figure 10. Comparaison de l'approche non contrainte (PCA) et de l'approche contrainte (RDA) en fonction des facteurs influençant la variation observée dans les communautés bactériennes des larves.**

## 7. DISCUSSION

---

La composition du microbiome des larves est largement influencée par les communautés présentes dans l'eau de gîte où elles se développent. On retrouve effectivement dans les larves une majorité d'espèces retrouvées dans l'eau, mais les abondances relatives de chaque espèce diffèrent selon l'environnement. Autrement dit, la composition est largement influencée par l'environnement, mais la structure de ces communautés n'y semble pas autant sensible. L'acquisition du microbiome s'effectue entre autres par l'alimentation détritivore des larves, ce qui expliquerait en partie les similarités observées entre l'environnement et l'insecte. Or, les mécanismes qui régissent l'assemblage des communautés bactériennes chez les larves ne sont pas totalement compris. Il est souvent avancé que le microbiome des larves provient de leur gîte larvaire, mais il semblerait que le processus soit plus nuancé. Effectivement, la majorité des microorganismes retrouvés chez les larves sont également retrouvés dans l'eau, mais dans des proportions différentes. Comme démontré à la figure 1, l'abondance relative d'une espèce peut différer selon son environnement, certaines étant retrouvées de façon équivalente autant dans l'eau de gîte que chez les larves, alors que d'autres sont retrouvées beaucoup plus abondamment dans l'un ou l'autre des habitats. Si le microbiome de l'eau était le seul facteur à agir sur le microbiome de la larve, il serait attendu que les deux environnements seraient caractérisés par des microbiomes identiques. Cette observation permet d'avancer que les larves obtiennent leur microbiome de l'environnement, mais que d'autres mécanismes influencent l'assemblage de ces communautés.

Certains OTUs sont retrouvés exclusivement chez les larves, tel que c'est le cas pour les familles Aeromonadaceae et Lachnospiraceae. Une étude comparant des gîtes avec et sans moustiques a démontré que les familles Xanthomonadaceae, Comamonadaceae et Burkholderiaceae étaient davantage communes en absence de larves, alors que Lachnospiraceae, Synechococcaceae, Alcaligenaceae et Cryomorphaceae étaient communément retrouvés dans les gîtes positifs à la présence d'*Aedes* et d'*Anopheles*<sup>115</sup>. La détection d'*Aeromonas* a d'ailleurs été considérée comme étant l'un des marqueurs de présence pour le genre *Aedes* dans les gîtes<sup>115</sup>. La présence de la famille Aeromonadaceae est également rapportée chez plusieurs espèces de moustiques, dont *Aedes aegypti*, où son abondance relative s'élève à 7%<sup>116</sup>. La famille Clostridiales XIII Incertae Sedis, identifiée dans 2% des échantillons de larves, inclut plusieurs genres provenant de l'environnement tel que *Anaerovorax*, *Ihubacter*, *Mogibacterium*, *Mobilibacterium* et *Aminipila*. Cela dit, aucun de ces genres n'a été documenté chez les moustiques, voire les insectes, jusqu'à présent. Leur présence uniquement retrouvée chez l'insecte pourrait s'expliquer par une transmission verticale, c'est-à-dire de la femelle aux œufs lors de la ponte. Les œufs de moustiques sont colonisés par des bactéries, potentiellement provenant des ovaires de la mère, et ses bactéries sont susceptibles d'être ingérées par la larve lors de l'éclosion, permettant ainsi la colonisation de l'insecte ou la persistance d'ADN reliques à la suite de leur digestion. Il est donc possible que les bactéries uniquement retrouvées chez les larves proviennent de l'œuf, et que ces bactéries n'aient pas colonisé l'eau du gîte, d'où leur absence de détection. Un manque de sensibilité de la méthode n'est pas à exclure, car il est possible que les bactéries présentent en faible quantité ne soient pas détectées, ou qu'elles aient été exclues par les différents seuils et filtres appliqués lors de l'analyse.

D'autre part, certains OTUs sont retrouvés uniquement dans l'eau des gîtes, et non chez les larves. Leur abondance relative varie selon la famille, parmi lesquelles se trouve Bacteriovoracaceae (0.01%), Bdellovibrionaceae (0.02%), Deinococcaceae (0.05%), Gemmatimonadaceae (0.03%), Methylophilaceae (0.08%) et Sneathiellaceae (0.34%). L'occurrence à laquelle ces familles sont retrouvées dans l'eau des gîtes varie entre 2 et 17%. Le fait qu'aucune de ces familles n'ait pas été retrouvée chez les larves malgré leur occurrence et leur abondance relative semble indiquer que les larves ne recrutent pas forcément toutes les bactéries qui se trouvent dans leur environnement. D'ailleurs, Bacteriovoracaceae et Bdellovibrionaceae, deux familles prédatrices de bactéries Gram négatifs, respectivement trouvées dans 11 et 4% des gîtes analysés, sont absentes de tous les échantillons de larves. Ces familles sont suggérées comme moyens de lutte contre la mouche à fruit méditerranéenne *Ceratitis capitata* (Wiedemann), où elles survivent et prédatent à l'intérieur de l'intestin de l'insecte, causant potentiellement des dysbioses. Leur absence chez les larves est peut-être un indicateur de la sélectivité des larves qui évitent, par des mécanismes inconnus, les bactéries pouvant affecter négativement leur microbiome.

La variation observée entre les communautés de l'eau et des larves suggère que le recrutement du microbiote larvaire s'effectue dans une certaine mesure de façon sélective. Les facteurs qui peuvent influencer cette sélection sont variés et peu compris chez les moustiques. Certains symbiotes peuvent bénéficier des voies métaboliques de l'hôte pour lui fournir un avantage. C'est le cas pour *Wolbachia* qui semble compétitionner avec le virus de la Dengue pour les lipides de l'hôte. L'utilisation des lipides par la bactérie diminue la disponibilité des lipides nécessaires à la réplication du virus, ce qui peut réduire sa prévalence dans l'insecte<sup>117</sup>. La sélection des microorganismes peut également se faire selon les fonctions qu'ils accomplissent, dans

quel cas les espèces qui présentent de la redondance fonctionnelle pourraient ne pas être conservées puisque leur effet sur l'hôte n'est pas significatif. Des pressions de sélection, comme la présence d'insecticides, peuvent également influencer les communautés comme observées pour *An. albimanus* qui présente une plus faible diversité bactérienne chez les individus résistant à la fénitrothion. Cependant, cette baisse de diversité s'accompagne d'une augmentation de l'abondance d'enzymes dégradant l'insecticide, suggérant que la pression de sélection favorise les espèces permettant une meilleure tolérance à l'insecte<sup>89</sup>.

Une explication supplémentaire est proposée pour expliquer la variation observée entre les communautés de l'eau et des larves. À l'émergence, les larves L1 se nourrissent des microorganismes qui se trouvent dans l'environnement, ce qui permet la colonisation de l'insecte. C'est à ce stade que la diversité retrouvée chez les larves est la plus élevée. Au fil de sa croissance, la larve effectue 4 mues sur environ 7 jours, jusqu'à atteindre le stade de pupes. Il a été rapporté que la diversité microbienne diminue au fil des mues, suggérant une certaine sélection des espèces conservées jusqu'à l'obtention du core-microbiome de l'insecte. Or, il est possible que des changements dans les communautés de l'eau surviennent sans qu'ils soient détectés chez les larves. Effectivement, les communautés de l'eau sont sensibles aux paramètres environnementaux. Entre autres, l'osmolarité de l'environnement est rapportée comme un des facteurs influençant le plus sur les communautés bactériennes, autant l'hypo-osmolarité que l'hyper-osmolarité<sup>50,118</sup>. Les précipitations ou l'évaporation de l'eau dues aux chaudes températures sont deux facteurs environnementaux qui peuvent entraîner un changement d'osmolarité, et ainsi infliger un stress aux populations bactériennes. Le stress peut affecter la structure des



communautés, avec certaines populations qui diminuent et d'autres, favorisées, qui peuvent croître. Les larves, collectées en fin de croissance, sont initialement colonisées par les microorganismes présents dans l'eau lors de l'émergence, soit +/- 7 jours plus tôt. Il y a donc environ une semaine où les communautés de l'eau peuvent être affectées par les facteurs extérieurs, alors que celles retrouvées chez les larves sont potentiellement affectées différemment. Dans cet ordre d'idée, Rocha *et al.* (2016), démontre que le core-microbiote de *Ae. aegypti* est indépendant des conditions de croissance (laboratoire ou en nature) et de la diète, en plus de souligner les similarités entre individus provenant de différentes localisations<sup>98</sup>.

Ainsi, il est possible que les différences observées entre l'eau et les larves proviennent du fait que les microorganismes de l'eau sont plus affectés par les facteurs environnementaux que ceux qui colonisent les larves. Puisque l'établissement de symbiotes se fait dès le contact de la larve avec son environnement, il est possible que le symbiote inhibe la colonisation par des *taxa* qui s'établissent après ce premier contact<sup>61,62</sup>. Les microorganismes présents dans l'eau sont potentiellement plus sensibles aux paramètres de l'environnement et aux différentes successions écologiques que ceux retrouvés chez les larves. Afin d'étudier cette hypothèse, il serait intéressant de collecter l'eau de gîte dès l'éclosion des larves, en plus de prélever les larves et l'eau du gîte en fin de croissance. Il est possible que la similarité entre les larves et l'eau soit supérieure en considérant les communautés de l'eau dès que l'insecte est exposé à son environnement.

La seconde partie de l'hypothèse suggère que la structure du microbiote bactérien des larves d'*Ae. aegypti* covarie avec les paramètres de l'environnement. Or, il s'avère que l'environnement explique 3% de la variation observée dans les communautés bactériennes des larves. Cela dit, l'effet de ce 3% expliqué par l'environnement sur le moustique n'est pas connu, et il n'est pas exclu que les variations aient un effet significatif sur l'insecte. Effectivement, le fait que l'environnement explique peu la covariation observée ne signifie pas forcément que l'environnement n'a pas d'effet sur l'insecte. Il est possible que l'environnement affecte le moustique à un autre niveau, sur l'oviposition par exemple, comme c'est le cas avec la présence d'engrais dans l'eau du gîte. Il a été observé que des concentrations élevées de potassium, phosphore et azote dans le gîte attirent les femelles gravides, ce qui entraîne une ponte plus fréquente et abondante dans ce type d'eau<sup>11</sup>. Dans cet exemple, il est possible que la présence d'engrais n'ait pas un grand effet sur la variation des communautés bactériennes des larves, mais joue un rôle important dans l'attraction des femelles gravides.

De plus, les facteurs liés au site, tels que la couleur du gîte ou son matériel, ainsi que la géographie n'ont pas d'effet significatif sur la covariation observée dans les communautés. Il est possible que ces facteurs soient trop éloignés de l'écosystème où se développent les larves pour avoir un effet sur leurs communautés. En ce sens, Hery *et al.* (2021) observe que le type de contenant influence fortement les paramètres physico-chimiques du gîte, mais n'affecte pas les communautés microbiennes<sup>98,119</sup>. L'impact du site sur le microbiote des larves n'est pas significatif, mais il est possible qu'il influence indirectement en ayant un effet sur d'autres facteurs influençant le microbiote. Davantage d'études seront nécessaires pour explorer cette possibilité.

Quant à la géographie, certains écrits rapportent que les populations microbiennes sont conservées d'un emplacement à un autre; d'autres articles observent un effet de la localisation sur les communautés. Cela dit, il n'est pas exclu que les effets de la géolocalisation soient corrélés avec d'autres facteurs affectant les populations microbiennes, ce qui expliquerait pourquoi ce facteur n'est pas significatif dans notre étude : il peut y avoir de la redondance avec les autres paramètres étudiés.

L'ensemble des résultats obtenus démontre que 90% de la covariation est non expliquée par les paramètres considérés par l'étude. Ce constat suggère que la majorité de la covariation est due à des facteurs autres que ceux ciblés, dont hypothétiquement des mécanismes intrinsèques à l'insecte. *Ae. aegypti* est reconnu pour recruter une grande variété de microorganismes, et une grande variabilité interindividuelle est souvent rapportée<sup>120</sup>. D'ailleurs, Coon *et al.* (2014) a démontré que la colonisation d'*Ae. aegypti* avec une unique souche d'*Escherichia coli* permettait de restaurer la croissance et le développement des larves<sup>8</sup>. Son mode d'alimentation lui permet également d'avoir accès à une grande variété de microorganismes, puisque les larves peuvent plonger pour se nourrir, contrairement aux moustiques du genre *Anopheles* qui se nourrissent exclusivement à la surface<sup>9</sup>. Ces observations laissent croire qu'*Ae. aegypti* est peu spécifique lors du recrutement, et qu'il peut se développer à partir d'une grande gamme de symbiotes, ce qui peut potentiellement lui octroyer une plus grande adaptabilité. À cet égard, il se peut que l'environnement soit moins important pour le recrutement des communautés par l'insecte, puisque ce dernier semble plus permissif.

## 8. CONCLUSION

---

Avec le réchauffement climatique, il y a fort à parier que les populations d'insectes vecteurs tels que le moustique *Aedes aegypti* seront de plus en plus nombreuses, risquant par le fait même une augmentation de cas liés aux arbovirus. Une stratégie incluant une variété d'outils de luttés est primordiale pour contrôler la transmission des virus auprès des humains. Parmi ceux-ci, il y a le contrôle des populations de moustiques, la réduction de la capacité vectorielle de ces derniers ou le développement de soins efficaces pour traiter les patients atteints, que ce soit par la mise en marché de vaccin ou d'antiviraux. Traditionnellement, les insecticides sont utilisés pour tuer les insectes, mais leur usage massif s'accompagne d'effets négatifs. Ils ont un impact négatif sur l'environnement, diminuent la biodiversité en n'étant pas spécifiques aux moustiques et favorisent le développement de résistance aux insecticides. C'est d'ailleurs le constat observé en Guyane française, où les populations d'*Ae. aegypti* sont résistantes aux insecticides permis. Devant cette situation, il est nécessaire de trouver d'autres moyens de réduire les populations de moustiques. L'utilisation du microbiote est une avenue intéressante, surtout lorsqu'on observe tous les rôles des microorganismes chez les insectes. En effet, les microorganismes permettent la croissance des larves, favorisent la digestion de repas sanguins chez les femelles et attirent les insectes gravides vers certains gîtes larvaires. Leur influence sur les moustiques est donc une piste de solution envisageable, pour peu qu'on développe des stratégies adéquates. Effectivement, l'utilisation du genre *Wolbachia* provoque une diminution de l'espérance de vie de l'insecte, réduisant ainsi le temps de développement du virus chez l'hôte infecté. Dans le cas du virus de la dengue,

certaines souches sont utilisées pour infecter *Ae. aegypti* produisent une réduction du nombre de copies virales produites, ce qui diminue sa capacité à transmettre la dengue aux humains. Finalement, la présence de certaines souches de *Wolbachia* semble déclencher une incompatibilité cytoplasmique, qui se traduit par des insectes stériles. Ces observations ouvrent un nouveau champ de stratégies pour lutter contre les vecteurs d'arbovirus, mais plusieurs éléments doivent être compris avant d'envisager l'utilisation des microorganismes comme agent de lutte biologique. Effectivement, l'acquisition du microbiote lors de l'émergence des larves, son évolution tout au long du développement de l'insecte et sa transmission des femelles vers sa progéniture sont des aspects peu compris qui méritent davantage d'intérêts avant le déploiement de stratégies ciblant le microbiote.

Dans cet ordre d'idée, l'intérêt de ce mémoire est de mieux comprendre l'acquisition du microbiote par les larves après leur éclosion. L'idée que les larves sont colonisées par les bactéries présentes dans l'eau de leur gîte larvaire est largement répandue, mais les mécanismes qui influencent cette colonisation ne sont pas connus. Ainsi, l'hypothèse abordée est que la structure du microbiote bactérien des larves d'*Ae. aegypti* covarie avec la structure des communautés bactériennes retrouvées dans l'eau des gîtes larvaires et les paramètres de l'environnement qui l'entoure. Dans un premier temps, la caractérisation des communautés bactériennes issues de l'eau des gîtes ainsi que celles retrouvées chez les larves sera effectuée, puis comparée. Par la suite, l'effet des paramètres biotiques et abiotiques de l'environnement sera analysé afin d'évaluer leur influence sur le microbiote observé chez les larves.

Un total de 60 sites en Guyane française a été ciblé pour la collecte de larves d'*Ae. aegypti* et de l'eau du gîte larvaire correspondant. Les coordonnées géographiques, les paramètres physico-chimiques ainsi que des photos du site ont été

pris afin de caractériser le plus précisément possible le site du prélèvement. De retour au laboratoire, les larves d'*Ae. aegypti* au stade L3-L4 ont été prélevées, rincées et poolées pour l'extraction d'ADN génomique (n=30). La région V6-V8 du gène codant pour l'ARNr 16S des bactéries a été ciblée pour le séquençage Illumina Miseq, puis les séquences obtenues ont été traitées avec le pipeline UPARSE et le logiciel USEARCH. Les analyses statistiques ont permis de comparer les communautés bactériennes retrouvées chez les larves et dans l'eau de leur gîte. Une analyse de partitionnement de variance a permis d'évaluer si l'environnement influençait la variation observée dans les communautés bactériennes des larves.

Dans la situation où la structure du microbiote larvaire covierait avec celle de son environnement, il est attendu que ces communautés sont semblables en termes d'abondance absolue et d'abondance relative. Or, les résultats obtenus semblent démontrer que ce n'est pas tout à fait le cas. Bien que la majorité des OTUs retrouvés chez les larves soient également retrouvés dans l'eau de leur gîte larvaire, l'abondance relative de chaque OTU varie selon l'environnement. Autrement dit, certains OTUs sont largement plus abondants dans l'eau que chez les larves, alors que l'inverse est observé pour d'autres OTUs. Ainsi, il est suggéré qu'une certaine sélection se fasse, soit par l'insecte ou par des facteurs environnementaux. L'analyse de partitionnement de variance permet d'évaluer l'influence des facteurs extérieurs, tels que la communauté bactérienne de l'eau, les paramètres physico-chimiques ou les caractéristiques du site, sur la variation observée chez les larves. Les résultats obtenus démontrent que l'environnement explique jusqu'à 11% de la variation du microbiote décelée chez les larves. Bien que cela puisse sembler peu, il est nécessaire de rappeler que l'effet d'un genre bactérien retrouvé en faible quantité n'est pas

forcément corrélé avec un faible effet, et qu'il est impossible de dire, pour l'instant, l'impact réel de ce 11% sur la dynamique des communautés. Il a été rapporté que la présence d'une espèce clé, soit une espèce dont la présence apporte de grands effets comparativement à son abondance relative, permettait de stabiliser le microbiote<sup>121-123</sup>. C'est le cas chez les nourrissons où la faible présence de *Bifidobacterium longum* subsp. *Longum* assure l'équilibre des autres bactéries du genre *Bifidobacterium* en dégradant le lacto-N-tetraose qui leur permet de se nourrir<sup>124</sup>. Cet exemple illustre l'effet boule de neige que peut avoir l'environnement sur un microbiote donné, car un facteur environnemental peut influencer les communautés bactériennes, et cette influence peut provoquer d'importants résultats. Au terme de cette analyse, il est possible d'indiquer que l'environnement, autant l'eau du gîte, les caractéristiques de celui-ci, ou les traits du site expliquent partiellement la variation observée dans les communautés bactériennes des larves. Cette constatation suggère que l'acquisition du microbiote est influencée par d'autres facteurs ou bien à un autre moment de la croissance de l'insecte. En effet, les larves et l'eau ont été récoltées en fin de croissance des larves, ce qui ne permet pas d'évaluer le début de la colonisation bactérienne lors de l'émergence. Il est donc possible que l'établissement du microbiote larvaire se fasse dès le stade L1, et que la communauté larvaire soit si stable qu'elle n'est pas impactée par des changements subséquents dans les communautés de l'eau. Ainsi, il serait intéressant de suivre l'évolution du microbiote des larves et de l'eau dès leur éclosion, en prélevant des échantillons à chaque stade de croissance. Ce type d'analyse permettrait d'évaluer les changements temporels qui ont lieu autant dans l'eau du gîte et chez les larves.

## 10. BIBLIOGRAPHIE

---

1. Powell, J. R. & Tabachnick, W. J. History of domestication and spread of *Aedes aegypti* - A Review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **108**, 11–17 (2013).
2. Chareonviriyaphap, T., Akratanakul, P., Nettanomsak, S. & Huntamai, S. Larval Habitats and Distribution Patterns of *Aedes Aegypti* (Linnaeus) and *Aedes Albopictus* (Skuse), In Thailand. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **34**, 7 (2003).
3. Briscoe, M. S. *Aedes Aegypti* The Yellow Fever Mosquito, Its Life History, Bionomics And Structure. *J. Natl. Med. Assoc.* **54**, 132 (1962).
4. Lima, A., Lovin, D. D., Hickner, P. V. & Severson, D. W. Evidence for an Overwintering Population of *Aedes aegypti* in Capitol Hill Neighborhood, Washington, DC. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **94**, 231–235 (2016).
5. Sánchez Castellanos, H., Marshall, J. & Vallejo, E. SoNA3BS: An Agent-Based Model to Study High-Resolution Spatial Heterogeneity in *Aedes aegypti*-Borne Diseases Through the Use of Network Theory. (2017). doi:10.13140/RG.2.2.16768.84484.
6. Tatem, A. J., Hay, S. I. & Rogers, D. J. Global Traffic and Disease Vector Dispersal. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 6242–6247 (2006).
7. Clements, A. N. The Biology of Mosquitoes. Volume 2: Sensory Reception and Behaviour. *Biol. Mosquitoes Vol. 2 Sens. Recept. Behav.* (1999).
8. Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R. & Strand, M. R. Mosquitoes Rely on Their Gut Microbiota For Development. *Mol. Ecol.* **23**, 2727–2739 (2014).



9. Merritt, R. W., Dadd, R. H. & Walker, E. D. Feeding Behavior, Natural Food, and Nutritional Relationships of Larval Mosquitoes. *Annu. Rev. Entomol.* **37**, 349–374 (1992).
10. Darriet, F. & Corbel, V., *Aedes aegypti* Oviposition in Response To NPK Fertilizers. *Parasite Paris Fr.* **15**, 89–92 (2008).
11. Darriet, F. & Corbel, V. Influence des engrais de type NPK sur l’oviposition d’ *Aedes aegypti*. *Parasite* **15**, 89–92 (2008).
12. Revue générale des arboviroses, des arénaviroses et des filoviroses - Maladies infectieuses. *Édition professionnelle du Manuel MSD* <https://www.merckmanuals.com/fr-ca/professional/maladies-infectieuses/arbovirus-arenaviridae-et-filoviridae/revue-g%C3%A9n%C3%A9rale-des-arboviroses-des-ar%C3%A9naviroses-et-des-filoviroses>.
13. Cleton, N., Koopmans, M., Reimerink, J., Godeke, G.-J. & Reusken, C. Come Fly with Me: Review Of Clinically Important Arboviruses For Global Travelers. *J. Clin. Virol. Off. Publ. Pan Am. Soc. Clin. Virol.* **55**, 191–203 (2012).
14. Lam, S. K. Challenges in Reducing Dengue Burden; Diagnostics, Control Measures and Vaccines. *Expert Rev. Vaccines* **12**, 995–1010 (2013).
15. Bhatt, S. *et al.* The Global Distribution and Burden of Dengue. *Nature* **496**, 504–507 (2013).
16. Reiter, P. Yellow Fever and Dengue: A Threat to Europe? *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* **15**, 19509 (2010).
17. Chippaux, J.-P. & Chippaux, A. Yellow Fever in Africa and the Americas: A Historical and Epidemiological Perspective. *J. Venom. Anim. Toxins Trop. Dis.* **24**, 20 (2018).
18. Hayes, E. B. Zika Virus Outside Africa. *Emerg. Infect. Dis.* **15**, 1347–1350 (2009).

19. Musso, D. *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg. Infect. Dis.* **21**, 359–361 (2015).
20. Foy, B. D. *et al.* Probable Non-Vector-Borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **17**, 880–882 (2011).
21. Oehler, E. *et al.* Zika Virus Infection Complicated by Guillain-Barré Syndrome – Case Report, French Polynesia, December 2013. *Eurosurveillance* **19**, 20720 (2014).
22. Leta, S. *et al.* Global Risk Mapping for Major Diseases Transmitted by *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Int. J. Infect. Dis.* **67**, 25–35 (2018).
23. Achee, N. L. *et al.* Alternative Strategies for Mosquito-Borne Arbovirus Control. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **13**, e0006822 (2019).
24. Larramendy, M. & Soloneski, S. Integrated Pest Management and Pest Control – Current and Future Tactics. (2012).
25. Corbel, V. *et al.* Tracking Insecticide Resistance in Mosquito Vectors of Arboviruses: The Worldwide Insecticide Resistance Network (WIN). *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0005054 (2016).
26. Corbel, V. *et al.*, International Workshop on Insecticide Resistance in Vectors of Arboviruses, December 2016, Rio de Janeiro, Brazil. *Parasit. Vectors* **10**, (2017).
27. Poopathi, S. & Abidha, S. Mosquitocidal Bacterial Toxins (*Bacillus sphaericus* and *B. thuringiensis* serovar *israelensis*): Mode of Action, Cytopathological Effects and Mechanism of Resistance. *J. Physiol. Pathophysiol.* **1**, 22–38 (2010).
28. Killeen, G. F., Fillinger, U. & Knols, B. G. Advantages of Larval Control for African Malaria Vectors: Low Mobility and Behavioural Responsiveness of Immature Mosquito Stages Allow High Effective Coverage. *Malar. J.* **1**, 8 (2002).

29. Derua, Y. A. *et al.* Microbial Larvicides for Mosquito Control: Impact of Long Lasting Formulations of *Bacillus thuringiensis* Var. *israelensis* And *Bacillus sphaericus* on Non-Target Organisms In Western Kenya Highlands. *Ecol. Evol.* **8**, 7563–7573 (2018).
30. Fillinger, U., Knols, B. G. J. & Becker, N. Efficacy and Efficiency of New *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* Formulations Against Afrotropical Anophelines in Western Kenya. *Trop. Med. Int. Health* **8**, 37–47 (2003).
31. Scholte, E.-J., Knols, B. G. J., Samson, R. A. & Takken, W. Entomopathogenic Fungi for Mosquito Control: A Review. *J. Insect Sci.* **4**, 19 (2004).
32. Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y. & Xi, Z. The Endosymbiotic Bacterium *Wolbachia* Induces Resistance to Dengue Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathog.* **6**, e1000833 (2010).
33. Ross, P. A., Endersby, N. M. & Hoffmann, A. A. Costs of Three *Wolbachia* Infections on the Survival of *Aedes aegypti* Larvae under Starvation Conditions. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**, e0004320 (2016).
34. Dusfour, I. *et al.* Multiple Insecticide Resistance in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) Populations Compromises the Effectiveness of Dengue Vector Control in French Guiana. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **106**, 346–352 (2011).
35. Smith, L. B., Kasai, S. & Scott, J. G. Voltage-sensitive Sodium Channel Mutations S989P + V1016G in *Aedes aegypti* Confer Variable Resistance to Pyrethroids, DDT and Oxadiazines. *Pest Manag. Sci.* **74**, 737–745 (2018).
36. Fan, Y. & Scott, J. G. The F1534C voltage-Sensitive Sodium Channel Mutation Confers 7- to 16-fold Resistance to Pyrethroid Insecticides in *Aedes aegypti*. *Pest Manag. Sci.* **76**, 2251–2259 (2020).

37. Wuliandari, J. R. *et al.* Association Between Three Mutations, F1565C, V1023G and S996P, in the Voltage-Sensitive Sodium Channel Gene and Knockdown Resistance in *Aedes aegypti* from Yogyakarta, Indonesia. *Insects* **6**, 658–685 (2015).
38. Goindin, D. *et al.* Levels of Insecticide Resistance to Deltamethrin, Malathion, and Temephos, and Associated Mechanisms in *Aedes aegypti* mosquitoes from the Guadeloupe and Saint Martin islands (French West Indies). *Infect. Dis. Poverty* **6**, 38 (2017).
39. Rahman, R. U. *et al.* Insecticide Resistance and Underlying Targets-Site and Metabolic Mechanisms in *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Lahore, Pakistan. *Sci. Rep.* **11**, 4555 (2021).
40. Ahmad, M., Denholm, I. & Bromilow, R. H. Delayed Cuticular Penetration and Enhanced Metabolism of Deltamethrin in Pyrethroid-Resistant Strains of *Helicoverpa armigera* from China and Pakistan. *Pest Manag. Sci.* **62**, 805–810 (2006).
41. Lin, Y., Jin, T., Zeng, L. & Lu, Y. Cuticular Penetration of  $\beta$ -cypermethrin in Insecticide-Susceptible and Resistant Strains of *Bactrocera dorsalis*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **103**, 189–193 (2012).
42. Balabanidou, V. *et al.* Cytochrome P450 associated With Insecticide Resistance Catalyzes Cuticular Hydrocarbon Production in *Anopheles gambiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 9268–9273 (2016).
43. Wood, O., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L. & Brooke, B. Cuticle Thickening Associated with Pyrethroid Resistance in The Major Malaria Vector *Anopheles funestus*. *Parasit. Vectors* **3**, 67 (2010).
44. Gillies, M. T. & De Meillon, B. Anophelinae of Africa south of the Sahara. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?q=Anophelinae+of+Africa+south+of+the+Sahara](https://scholar.google.com/scholar_lookup?q=Anophelinae+of+Africa+south+of+the+Sahara).

45. Giles, G. M. J. A Handbook of The Gnats or Mosquitoes; Giving the Anatomy and Life History of the Culicidæ Together with Descriptions of all Species Noticed Up to the Present Date. 1–586 (J. Bale, sons & Danielsson, Ltd., 1902). doi:10.5962/bhl.title.8549.
46. Riaz, M. A. *et al.* Molecular Mechanisms Associated with Increased Tolerance to the Neonicotinoid Insecticide Imidacloprid in The Dengue Vector *Aedes aegypti*. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* **126**, 326–337 (2013).
47. Reimer, L. J. *et al.* Malaria Transmission Dynamics Surrounding the First Nationwide Long-Lasting Insecticidal Net Distribution in Papua New Guinea. *Malar. J.* **15**, 25 (2016).
48. Thomas, F. *et al.* Beyond Nature and Nurture: Phenotypic Plasticity in Blood-Feeding Behavior of *Anopheles gambiae* s.s. When Humans Are Not Readily Accessible. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **81**, 1023–1029 (2009).
49. Meyers, J. I. *et al.* Increasing Outdoor Host-Seeking in *Anopheles gambiae* Over 6 Years of Vector Control on Bioko Island. *Malar. J.* **15**, 239 (2016).
50. Turnbaugh, P. J. *et al.* The Human Microbiome Project: Exploring the Microbial Part of Ourselves in A Changing World. *Nature* **449**, 804–810 (2007).
51. Wang, Y., Gilbreath, T. M., Kikutla, P., Yan, G. & Xu, J. Dynamic Gut Microbiome Across Life History of the Malaria Mosquito *Anopheles gambiae* in Kenya. *PloS One* **6**, e24767 (2011).
52. Gimonneau, G. *et al.* Composition of *Anopheles coluzzii* and *Anopheles gambiae* Microbiota from Larval To Adult Stages. *Infect. Genet. Evol. J. Mol. Epidemiol. Evol. Genet. Infect. Dis.* **28**, 715–724 (2014).

53. Osei-Poku, J., Mbogo, C. M., Palmer, W. J. & Jiggins, F. M. Deep Sequencing Reveals Extensive Variation in the Gut Microbiota of Wild Mosquitoes from Kenya. *Mol. Ecol.* **21**, 5138–5150 (2012).
54. Duguma, D. *et al.* Developmental Succession of the Microbiome of *Culex* mosquitoes. *BMC Microbiol.* **15**, 140 (2015).
55. Muturi, E. J., Bara, J. J., Rooney, A. P. & Hansen, A. K. Midgut Fungal and Bacterial Microbiota of *Aedes triseriatus* and *Aedes japonicus* Shift in Response to La Crosse Virus Infection. *Mol. Ecol.* **25**, 4075–4090 (2016).
56. Minard, G., Mavingui, P. & Moro, C. V. Diversity and Function of Bacterial Microbiota in The Mosquito Holobiont. *Parasit. Vectors* **6**, 146 (2013).
57. Bennett, K. L. *et al.* Dynamics and Diversity of Bacteria Associated with The Disease Vectors *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *Sci. Rep.* **9**, 12160 (2019).
58. Thongsripong, P. *et al.* Mosquito Vector-Associated Microbiota: Metabarcoding Bacteria and Eukaryotic Symbionts Across Habitat Types in Thailand Endemic for Dengue and Other Arthropod-Borne Diseases. *Ecol. Evol.* **8**, 1352–1368 (2018).
59. Chao, J., Wistreich, G. A. & Moore, J. Failure to Isolate Microorganisms from within Mosquito Eggs. *Ann. Entomol. Soc. Am.* **56**, 559–561 (1963).
60. Hawley, W. A. The biology of *Aedes albopictus*. *J. Am. Mosq. Control Assoc. Suppl.* **1**, 1–39 (1988).
61. Ponnusamy, L. *et al.* Diversity of Bacterial Communities in Container Habitats of Mosquitoes. *Microb. Ecol.* **56**, 593–603 (2008).

62. Dada, N. *et al.* Comparative Assessment of The Bacterial Communities Associated with *Aedes aegypti* Larvae and Water from Domestic Water Storage Containers. *Parasit. Vectors* **7**, 391 (2014).
63. Wang, X. *et al.* Bacterial Microbiota Assemblage in *Aedes albopictus* Mosquitoes and Its Impacts on Larval Development. *Mol. Ecol.* **27**, 2972–2985 (2018).
64. Transstadial Transmission - an overview | ScienceDirect Topics.  
<https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/transstadial-transmission>.
65. Moll, R. M., Romoser, W. S., Modrzakowski, M. C., Moncayo, A. C. & Lerdthusnee, K. Meconial Peritrophic Membranes and the Fate of Midgut Bacteria During Mosquito (Diptera: Culicidae) Metamorphosis. *J. Med. Entomol.* **38**, 29–32 (2001).
66. Lindh, J. M., 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.* **107**, 242–250 (2008).
67. Chavshin, A. R. *et al.* Malpighian Tubules Are Important Determinants of *Pseudomonas* Transstadial Transmission and Longtime Persistence in *Anopheles stephensi*. *Parasit. Vectors* **8**, 36 (2015).
68. Joshi, V., Mourya, D. T. & Sharma, R. C. Persistence of Dengue-3 virus Through Transovarial Transmission Passage in successive Generations of *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **67**, 158–161 (2002).
69. Comeau, G. *et al.* Vertical Transmission of Zika Virus in *Aedes aegypti* Produces Potentially Infectious Progeny. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **103**, 876–883 (2020).

70. Fontenille, D., Diallo, M., Mondo, M., Ndiaye, M. & Thonnon, J. First Evidence of Natural Vertical Transmission of Yellow Fever Virus in *Aedes aegypti*, its Epidemic Vector. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **91**, 533–535 (1997).
71. Jain, J. *et al.* Evidence For Natural Vertical Transmission of Chikungunya Viruses in Field Populations of *Aedes aegypti* in Delhi and Haryana States in India—a preliminary report. *Acta Trop.* **162**, 46–55 (2016).
72. Altinli, M. *et al.* Sharing Cells with *Wolbachia*: the transovarian Vertical Transmission of *Culex pipiens* *densovirus*. *Environ. Microbiol.* (2018) doi:10.1111/1462-2920.14511.
73. Hughes, G. L. *et al.* Native microbiome Impedes Vertical Transmission of *Wolbachia* in *Anopheles* Mosquitoes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **111**, 12498–12503 (2014).
74. Gaio, A. de O. *et al.* Contribution Of Midgut Bacteria to Blood Digestion and Egg Production in *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) (L.). *Parasit. Vectors* **4**, 105 (2011).
75. Gusmão, D. S. *et al.* First Isolation of Microorganisms from the Gut Diverticulum of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae): New Perspectives for an Insect-Bacteria Association. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**, 919–924 (2007).
76. Ramirez, J. L. *et al.* Reciprocal Tripartite Interactions Between the *Aedes Aegypti* Midgut Microbiota, Innate Immune System and Dengue Virus Influences Vector Competence. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **6**, e1561 (2012).
77. Xi, Z., Ramirez, J. L. & Dimopoulos, G. The *Aedes aegypti* Toll Pathway Controls Dengue Virus Infection. *PLoS Pathog.* **4**, e1000098 (2008).
78. Gillett, J. D., Roman, E. A. & Phillips, V. Erratic Hatching in *Aedes* Eggs: A New Interpretation. *Proc. R. Soc. Lond. Ser. B* **196**, 223–232 (1977).



79. Ponnusamy, L., Böröczky, K., Wesson, D. M., Schal, C. & Apperson, C. S. Bacteria Stimulate Hatching of Yellow Fever Mosquito Eggs. *PLOS ONE* **6**, e24409 (2011).
80. Leroy, P. D. *et al.* Semiochemically Mediated Interactions Between Bacteria and Insects. *Chemoecology Int. J. Emphasizing Evol. Approaches Chem. Ecol.* (2011).
81. Correa, M. A., Matusovsky, B., Brackney, D. E. & Steven, B. Generation of Axenic *Aedes aegypti* Demonstrate Live Bacteria Are Not Required for Mosquito Development. *Nat. Commun.* **9**, 4464 (2018).
82. Kikuchi, Y., Meng, X.-Y. & Fukatsu, T. Gut Symbiotic Bacteria of The Genus *Burkholderia* in The Broad-Headed Bugs *Riptortus clavatus* and *Leptocoris chinensis* (Heteroptera: Alydidae). *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 4035–4043 (2005).
83. Fabricius, J. C. *Systema entomologiae : sistens insectorvm classes, ordines, genera, species, adiectis synonymis, locis, descriptionibvs, observationibvs.* 1–852 (In Officina Libraria Kortii.).
84. Tago, K. *et al.* Diversity of Fenitrothion-Degrading Bacteria in Soils from Distant Geographical Areas. *Microbes Environ.* **21**, 58–64 (2006).
85. Kikuchi, Y. *et al.* Symbiont-Mediated Insecticide Resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 8618–8622 (2012).
86. Cheng, D. *et al.* Gut Symbiont Enhances Insecticide Resistance in a Significant Pest, The Oriental Fruit Fly *Bactrocera dorsalis* (Hendel). *Microbiome* **5**, 13 (2017).
87. Xia, X. *et al.* Gut Microbiota Mediate Insecticide Resistance in the Diamondback Moth, *Plutella xylostella* (L.). *Front. Microbiol.* **9**, 25 (2018).
88. *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). <https://www.gbif.org/species/1651891/treatments>.

89. Dada, N., Sheth, M., Liebman, K., Pinto, J. & Lenhart, A. Whole Metagenome Sequencing Reveals Links Between Mosquito Microbiota and Insecticide Resistance in Malaria Vectors. *Sci. Rep.* **8**, 2084 (2018).
90. Soltani, A., Vatandoost, H., Oshaghi, M. A., Enayati, A. A. & Chavshin, A. R. The Role of Midgut Symbiotic Bacteria in Resistance of *Anopheles stephensi* (Diptera: Culicidae) to Organophosphate Insecticides. *Pathog. Glob. Health* **111**, 289–296 (2017).
91. Barnard, K., Jeanrenaud, A. C. S. N., Brooke, B. D. & Oliver, S. V. The Contribution of Gut Bacteria to Insecticide Resistance and the Life Histories of the Major Malaria Vector *Anopheles arabiensis* (Diptera: Culicidae). *Sci. Rep.* **9**, (2019).
92. Scates, S. S., O’Neal, S. T. & Anderson, T. D. Bacteria-Mediated Modification of Insecticide Toxicity in the Yellow Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **161**, 77–85 (2019).
93. Zouache, K. *et al.* Bacterial Diversity of Field-Caught Mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes Aegypti*, From Different Geographic Regions Of Madagascar. *FEMS Microbiol. Ecol.* **75**, 377–389 (2011).
94. Coon, K. L., Brown, M. R. & Strand, M. R. Mosquitoes Host Communities of Bacteria That Are Essential for Development but Vary Greatly Between Local Habitats. *Mol. Ecol.* **25**, 5806–5826 (2016).
95. Rani, A., Sharma, A., Rajagopal, R., Adak, T. & Bhatnagar, R. K. 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 (2009).

96. Akorli, J. *et al.* Seasonality and Locality Affect the Diversity of *Anopheles gambiae* and *Anopheles coluzzii* Midgut Microbiota from Ghana. *PloS One* **11**, e0157529 (2016).
97. Effect of Pesticides on Microbial Communities in Container Aquatic Habitats | Scientific Reports. <https://www.nature.com/articles/srep44565>.
98. David, M. R., dos Santos, L. M. B., Vicente, A. C. P. & Maciel-de-Freitas, R. Effects of Environment, Dietary Regime and Ageing on the Dengue Vector Microbiota: Evidence of a Core Microbiota Throughout *Aedes aegypti* lifespan. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **111**, 577–587 (2016).
99. Goldford, J. *et al.* Emergent Simplicity in Microbial Community Assembly. *Science* **361**, 469–474 (2018).
100. Louca, S. *et al.* High taxonomic Variability Despite Stable Functional Structure Across Microbial Communities. *Nat. Ecol. Evol.* **1**, 15 (2016).
101. Datta, M. S., Sliwerska, E., Gore, J., Polz, M. F. & Cordero, O. X. Microbial Interactions Lead to Rapid Micro-Scale Successions on Model Marine Particles. *Nat. Commun.* **7**, 11965 (2016).
102. van Elsas, J. D. *et al.* Microbial Diversity Determines the Invasion of Soil by a Bacterial Pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 1159–1164 (2012).
103. Kinnunen, M. *et al.* A Conceptual Framework for Invasion in Microbial Communities. *ISME J.* **10**, 2773–2779 (2016).
104. Blackburn, T. M. *et al.* A Proposed Unified Framework for Biological Invasions. *Trends Ecol. Evol.* **26**, 333–339 (2011).
105. Kennedy, T. A. *et al.* Biodiversity as a Barrier to Ecological Invasion. *Nature* **417**, 636–638 (2002).

106. Vellend, M. Conceptual Synthesis in Community Ecology. *Q. Rev. Biol.* **85**, 183–206 (2010).
107. Song, Y. *et al.* Different Deterministic Versus Stochastic Drivers for the Composition and Structure of a Temperate Grassland Community. *Glob. Ecol. Conserv.* **31**, e01866 (2021).
108. Marcos-Marcos, J. *et al.* Impact, Economic Evaluation, and Sustainability of Integrated Vector Management in Urban Settings to Prevent Vector-Borne Diseases: A Scoping Review. *Infect. Dis. Poverty* **7**, (2018).
109. Ansari, M. S., Moraiet, M. A. & Ahmad, S. Insecticides: Impact on the Environment and Human Health. in *Environmental Deterioration and Human Health: Natural and anthropogenic determinants* (eds. Malik, A., Grohmann, E. & Akhtar, R.) 99–123 (Springer Netherlands, 2014). doi:10.1007/978-94-007-7890-0\_6.
110. Borcard, D., Gillet, F. & Legendre, P. *Numerical Ecology with R*. (Springer Science & Business Media, 2011).
111. Meot, A., Legendre, P. & Borcard, D. Partialling Out the Spatial Component of Ecological Variation: Questions and Propositions in the Linear Modelling Framework. *Environ. Ecol. Stat.* **5**, 1–27 (1998).
112. R: The R Project for Statistical Computing. <https://www.r-project.org/>.
113. vegan-package: Community Ecology Package: Ordination, Diversity and... in vegan: Community Ecology Package. <https://rdrr.io/cran/vegan/man/vegan-package.html>.
114. Wickham, H. *et al.* ggplot2: Create Elegant Data Visualisations Using the Grammar of Graphics. (2021).

115. Nilsson, L. K. J., Sharma, A., Bhatnagar, R. K., Bertilsson, S. & Terenius, O. Presence of *Aedes* and *Anopheles* Mosquito Larvae Is Correlated to Bacteria Found in Domestic Water-Storage Containers. *FEMS Microbiol. Ecol.* **94**, (2018).
116. Kang, X. *et al.* Comparative Analysis of the Gut Microbiota of Adult Mosquitoes from Eight Locations in Hainan, China. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 596750 (2020).
117. Koh, C. *et al.* Dengue Virus Dominates Lipid Metabolism Modulations in *Wolbachia*-coinfected *Aedes aegypti*. *Commun. Biol.* **3**, 518 (2020).
118. Morbach, S. & Krämer, R. Body Shaping Under Water Stress: Osmosensing and Osmoregulation of Solute Transport in Bacteria. *Chembiochem Eur. J. Chem. Biol.* **3**, 384–397 (2002).
119. Hery, L. *et al.* Natural Variation in Physicochemical Profiles and Bacterial Communities Associated with *Aedes aegypti* Breeding Sites and Larvae on Guadeloupe and French Guiana. *Microb. Ecol.* **81**, 93–109 (2021).
120. Boissière, A. *et al.* Midgut Microbiota of the Malaria Mosquito Vector *Anopheles gambiae* and Interactions with *Plasmodium falciparum* Infection. *PLOS Pathog.* **8**, e1002742 (2012).
121. Gotoh, A., Ojima, M. N. & Katayama, T. Minority Species Influences Microbiota Formation: The Role of Bifidobacterium with Extracellular Glycosidases in *Bifidus* Flora Formation in Breastfed Infant Guts. *Microb. Biotechnol.* **12**, 259–264 (2019).
122. Paine, R. T. A Note on Trophic Complexity and Community Stability. *Am. Nat.* **103**, 91–93 (1969).

123. Power, M. E. *et al.* Challenges in the Quest for Keystones: Identifying keystone species is difficult—but essential to understanding how loss of species will affect ecosystems. *BioScience* **46**, 609–620 (1996).
124. Yamada, C. *et al.* Molecular Insight into Evolution of Symbiosis between Breast-Fed Infants and a Member of the Human Gut Microbiome *Bifidobacterium longum*. *Cell Chem. Biol.* **24**, 515-524.e5 (2017).

## Annexe I : Données physicochimiques

gite	vol	tc	pH	ORP	DO	Con	Ca	Mg	K	Cu	Fe	Zn	DCO	total_aedes	total_autre	total_insecte	densite_Total	densite_aead
6	42	30.35	6.85	187.90	28.2	117	7.55	0.49	1.53	0.04	205	1.38	37	313	44	357	8.50	7.45
10	8	34.70	9.21	135.30	94.1	185	16.05	0.54	6.10	0.04	1452	0.81	133	109	11	120	15.90	14.44
11	46	33.92	6.92	221.10	60.9	31	1.70	0.49	0.51	0.04	5115	1.95	37	111	31	142	3.10	2.42
13	72	27.98	6.27	212.20	55.8	70	3.07	0.61	3.50	0.04	2080	3.75	49	161	0	161	2.24	2.24
15	90	27.42	6.89	175.60	61.0	89	7.03	0.49	3.02	0.04	306	0.17	31	77	0	77	0.86	0.86
18	150	29.17	6.46	209.80	67.5	104	5.25	1.46	1.05	0.04	751	1.09	29	90	65	155	1.03	0.60
19	200	28.47	6.24	223.20	63.2	16	0.99	0.49	0.49	0.04	1256	1.40	29	66	4	70	0.35	0.33
22	11	27.52	7.75	143.30	58.5	428	33.44	6.39	8.59	0.04	1224	0.06	77	49	188	237	22.32	4.61
23	167	25.86	6.60	218.30	74.6	16	0.99	0.49	0.49	0.04	66	0.82	29	145	4	149	0.89	0.87
24	14	28.28	6.76	185.60	71.7	70	7.26	0.49	2.75	0.04	249	0.15	53	68	11	79	5.59	4.81
33	4	28.18	6.35	55.90	32.6	163	9.16	1.98	21.66	0.04	9946	1.46	344	212	6	218	54.50	53.00
34	32	27.21	7.32	105.20	66.6	129	17.75	0.70	3.43	0.04	7386	3.07	327	58	0	58	1.81	1.81
36	59	25.84	6.55	162.00	57.5	39	1.15	0.49	0.90	0.04	2449	3.56	29	101	5	106	1.81	1.73
37	200	28.55	6.58	159.40	61.3	30	1.05	0.49	0.49	0.04	125	2.44	29	209	0	209	1.05	1.05
45	43	26.92	6.93	119.60	58.5	246	37.08	1.24	9.12	37.08	806	0.13	49	83	10	93	2.16	1.93
46	11	28.18	6.30	139.20	37.0	46	5.80	0.56	6.68	0.04	1081	1.32	116	86	138	224	19.56	7.51
52	28	28.15	9.20	111.50	94.5	34	2.72	0.49	2.29	0.04	337	1.34	44	43	34	77	2.80	1.56
53	29	28.12	6.93	181.40	59.9	65	3.19	0.49	1.43	0.04	330	3.22	207	158	0	158	5.40	5.40
56	1	29.06	6.63	264.00	67.3	88	12.12	1.44	9.48	0.04	4470	0.24	150	52	8	60	60.00	52.00
57	79	26.01	7.25	266.80	79.0	7	0.99	0.49	0.49	0.04	114	0.61	29	134	155	289	3.68	1.71
59	17	28.42	6.45	204.80	47.7	41	2.88	0.97	2.57	0.04	410	0.09	50	190	129	319	18.65	11.11
62	64	32.31	5.75	275.90	76.9	16	1.96	0.49	0.49	0.04	213	0.91	29	231	44	275	4.32	3.63
66	57	28.34	7.29	262.90	64.6	48	1.43	0.49	0.49	0.05	3418	0.12	59	42	8	50	0.88	0.74
68	115	27.95	6.39	293.10	78.8	30	1.23	0.49	0.71	0.04	54	2.83	29	236	0	236	2.06	2.06
71	32	29.16	7.60	51.90	12.0	487	20.23	0.49	13.84	0.07	897	0.68	146	117	0	117	3.71	3.71
73	10	37.38	8.64	153.10	103.5	176	14.06	1.96	10.45	0.04	2035	0.55	136	149	0	149	14.90	14.90
74	79	28.96	6.73	229.30	47.6	24	1.66	0.49	2.21	0.04	836	0.21	29	75	6	81	1.02	0.95
81	200	26.62	5.83	279.70	45.5	16	1.78	0.49	0.53	0.04	119	0.11	29	378	3	381	1.91	1.89
86	50	28.75	6.69	240.60	33.4	41	2.18	0.67	0.82	0.04	1946	0.04	34	142	41	183	3.66	2.84
88	200	29.39	6.82	272.80	67.9	49	2.16	0.93	0.49	0.04	49	0.56	29	92	2	94	0.47	0.46
89	7	25.60	7.02	272.40	48.0	77	6.13	1.28	4.07	0.04	433	0.10	123	172	0	172	24.33	24.33
90	50	25.51	7.31	165.60	14.1	442	19.30	4.19	26.18	0.04	23388	7.24	1631	227	27	254	5.08	4.54
91	7	26.31	8.00	124.50	50.1	602	17.53	1.80	199.47	0.06	18596	3.40	447	84	11	95	13.44	11.88
94	135	26.99	6.40	306.30	81.5	39	2.57	0.58	1.97	0.04	307	1.95	47	133	0	133	0.99	0.99
96	246	27.54	6.36	108.50	18.4	33	1.50	0.49	1.02	0.04	10088	2.64	82	145	0	145	0.59	0.59
99	141	28.17	6.63	379.80	6.7	156	14.42	1.28	19.82	0.05	37600	0.77	134	62	25	87	0.62	0.44
100	22	30.35	7.26	321.50	27.0	237	13.88	1.21	23.99	0.04	17084	4.16	477	216	21	237	10.73	9.78
101	78	32.08	6.40	267.10	68.3	18	1.15	0.49	0.58	0.04	109	1.88	29	189	2	191	2.45	2.42
102	141	26.64	6.49	305.00	65.5	80	1.17	0.49	0.81	0.04	2041	2.11	38	166	0	166	1.17	1.17
103	48	28.13	7.27	244.20	39.6	208	18.37	2.80	10.03	0.07	9233	1.12	192	154	0	154	3.24	3.24
104	141	29.33	6.36	258.50	35.2	27	1.15	0.49	0.49	0.04	302	1.53	29	117	367	484	3.42	0.83
105	360	30.57	6.19	324.40	42.9	19	0.99	0.49	0.49	0.04	615	0.25	38	240	34	274	0.76	0.67
106	200	30.82	6.27	282.40	52.6	26	2.38	0.49	0.49	0.04	1650	1.01	132	190	0	190	0.95	0.95
107	128	30.84	6.80	279.40	50.3	47	0.10	0.49	0.49	0.04	450	0.23	29	106	18	124	0.97	0.83
108	200	28.77	6.40	195.80	39.9	16	3.58	0.49	0.64	0.04	49	0.54	29	307	164	471	2.36	1.54
109	200	28.94	7.28	250.90	64.6	21	0.99	0.49	0.49	0.04	49	0.66	29	165	0	165	0.83	0.83
115	200	28.19	6.71	179.90	44.7	29	0.99	0.49	0.49	0.04	49	2.46	29	190	114	304	1.52	0.95
116	28	27.96	7.00	118.50	97.0	161	3.73	8.10	14.55	0.04	327	1.90	92	345	35	380	13.44	12.20
117	22	28.29	7.37	124.50	43.3	82	11.38	1.81	5.33	0.04	2886	0.10	138	46	52	98	4.54	2.13
118	25	32.60	6.92	173.80	54.5	14	1.50	0.05	0.56	0.04	692	0.04	33	136	55	191	7.72	5.50
119	28	33.06	6.55	189.10	44.1	15	1.13	0.49	0.49	0.04	1091	0.40	29	124	40	164	5.80	4.39
125	6	28.56	6.69	333.30	61.3	136	16.74	0.62	0.79	0.04	2380	0.43	116	31	0	31	5.17	5.17
126	6	24.93	6.33	277.00	10.5	105	7.65	0.65	1.44	0.04	55	0.04	67	233	11	244	2.16	2.06
127	14	25.59	6.33	276.00	7.1	23	3.47	0.49	0.49	0.04	33888	6.84	400	13	30	43	21.50	6.50
128	4	28.02	6.71	132.20	6.4	112	7.39	0.93	7.45	0.04	12486	4.53	263	55	0	55	18.33	18.33
130	1	28.61	6.69	255.30	44.3	115	8.35	1.44	5.41	0.04	11840	0.42	77	49	41	90	15.00	8.17
131	5	24.36	5.89	363.50	65.5	41	1.15	0.49	0.51	0.04	10770	0.37	32	66	53	119	8.42	4.67
132	113	24.65	6.40	394.10	53.9	74	1.92	1.07	4.72	0.04	912	1.55	29	102	0	102	28.86	28.86
133	2	25.26	5.88	319.00	55.3	60	2.54	1.03	4.41	0.04	6183	1.24	222	3	2	5	5.00	3.00
138	3	24.70	6.79	223.80	27.0	295	22.80	7.56	14.68	0.04	8048	0.08	120	114	128	242	48.40	22.80
Moy	78	28.48	6.81	219.80	52.5	104	7.00	1.18	7.82	0.66	4389	1.42	126	136	36	172	8.72	6.64
Ecar	80	2.52	0.69	78.51	22.7	124	8.13	1.58	25.92	4.78	7765	1.57	225	82	63	105	12.71	10.59

## Annexe II : Données qualitatives

gite	mat	rouille	peint	vola	debrisveg	debris	veg	clois	batiments	batis	Type	sol	esp
6	P	N	N	N	O	O	C	A	S	B	R	E	mixte
10	M	O	O	N	N	N	C	C	M	B	R	O	mono
11	P	N	N	N	N	N	V	C	S	B	R	E	mono
13	M	O	N	N	N	N	A	P	M	W	S	A	mono
15	P	N	N	N	N	N	A	P	M	W	R	A	mono
18	P	N	N	N	N	N	A	C	S	B	R	A	mono
19	P	N	N	N	N	N	A	C	S	B	R	A	mono
22	M	O	N	N	O	N	A	P	S	B	R	E	mixte
23	P	N	N	N	N	N	H	P	M	B	R	E	mono
24	P	N	N	N	N	N	H	C	S	M	S	E	mono
33	M	N	N	N	N	N	H	A	S	M	R	E	mono
34	M	O	N	N	O	N	H	A	S	M	R	E	mono
36	M	O	N	N	N	N	A	A	M	M	S	A	mono
37	M	O	O	N	N	N	V	C	M	M	S	E	mono
45	P	N	N	N	N	N	A	A	A	A	A	E	mono
46	M	N	N	N	N	N	A	A	S	W	R	E	mixte
52	P	N	N	N	O	N	A	P	M	M	S	A	mono
53	P	N	N	N	N	N	A	P	M	M	S	A	mono
56	P	N	N	O	N	N	A	A	S	B	R	E	mixte
57	P	O	N	O	N	O	A	A	S	B	R	E	mixte
59	M	O	N	O	N	N	A	A	S	W	R	E	mixte
62	P	N	N	N	N	N	C	A	M	W	A	E	mixte
66	P	N	N	N	N	N	V	P	M	B	A	E	mixte
68	P	N	N	N	N	N	A	A	S	W	R	A	mono
71	M	N	N	N	N	N	A	P	S	M	R	E	mono
73	P	N	N	N	O	N	C	A	M	M	S	A	mono
74	P	N	N	N	O	N	C	A	M	M	S	A	mono
81	P	N	N	N	N	N	A	P	S	W	R	A	mono
86	P	N	N	O	N	N	A	P	S	M	R	A	mono
88	P	N	N	O	N	N	A	P	S	M	R	A	mono
89	P	N	N	N	O	O	C	C	M	B	R	E	mono
90	M	N	N	N	N	O	C	P	M	B	R	E	mixte
91	C	N	N	N	N	O	A	A	A	M	S	E	mono
94	P	N	N	N	N	N	A	P	M	M	S	E	mono
96	M	O	N	N	N	O	V	C	M	M	S	E	mono
99	M	O	N	N	N	N	V	C	M	M	S	E	mono
100	P	N	N	N	O	N	A	C	M	M	S	A	mono
101	P	N	N	N	N	N	A	A	M	M	S	A	mono
102	P	N	N	N	N	N	H	A	S	W	R	E	mono
103	C	N	N	N	N	O	A	A	S	B	R	O	mono
104	P	N	N	N	N	N	A	A	S	B	R	O	mixte
105	M	N	N	N	N	N	A	P	S	W	S	A	mixte
106	P	N	N	N	N	N	A	P	S	M	S	A	mono
107	P	N	N	N	N	N	A	C	S	M	S	A	mono
108	P	N	N	N	N	N	A	P	S	W	S	A	mono
109	P	N	N	N	N	N	A	C	S	W	S	A	mono
115	P	N	N	N	N	N	A	A	S	B	R	O	mixte
116	P	O	N	N	N	N	A	P	M	M	S	E	mono
117	P	N	N	N	N	N	C	A	S	M	A	A	mixte
118	M	O	O	N	N	N	C	A	S	B	A	A	mixte
119	P	N	N	O	N	N	V	P	S	B	S	E	mono
125	C	N	N	N	N	N	A	A	S	B	A	E	mono
126	P	O	N	N	N	N	C	A	S	B	R	O	mono
127	M	O	N	N	N	N	C	A	M	M	S	E	mono
128	C	N	N	N	N	N	H	P	S	W	R	E	mono
130	C	N	N	O	N	N	A	A	S	B	A	A	mono
131	C	N	N	N	N	N	A	A	S	B	A	E	mixte
132	P	N	N	N	O	N	A	A	A	A	A	E	mono
133	C	N	N	N	N	N	H	A	A	A	A	E	mono
138	M	N	N	N	O	N	A	A	A	A	A	E	mixte

Légende : Mat (P : plastique, C : caoutchouc, M : métal, B : bois), Rouille (O : présence, N : absence), Peinture (O : présence, N : absence), Volaille (O : présence, N : absence), débris organique (O : présence, N : absence), débris non-organique (O : présence, N : absence), végétation (V : absente, H : herbe, C : arbuste, A : arbre), Cloisonnement (P : partiel, C : complet, A : absent), Bâtiments (S : séparé, M : mitoyen, A : Absence de bâtiments), Bâtis (B : béton, M : métal, W : bois).