Influence de la résistance aux insecticides sur le potentiel épidémique du virus Usutu et du virus du Nil occidental.

Maxime Prat

▶ **To cite this version:**

Maxime Prat. Influence de la résistance aux insecticides sur le potentiel épidémique du virus Usutu et du virus du Nil occidental.. Santé. Université de Montpellier, 2024. Français. NNT : 2024UMONG132 . tel-05324983

HAL Id: tel-05324983

https://theses.hal.science/tel-05324983v1

Submitted on 21 Oct 2025

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

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

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Ecologie, Evolution, Ressources Génétiques, Paléobiologie

École doctorale GAIA

Unité de recherche : ISEM

Influence de la résistance aux insecticides sur le potentiel épidémique du virus Usutu et du virus du Nil occidental.

Présentée par Maxime Prat

Le 17 Décembre 2024

Sous la direction de Pierrick Labbé
et l'encadrement d'Haoues Alout

Devant le jury composé de

Gaëlle Gonzalez, CR, ANSES	Rapporteur
Louis Lambrechts, DR, Institut Pasteur, CNRS	Rapporteur
Ana Rivero, DR CNRS, MIVEGEC	Examinateur
Célestine Atyame Nten, MC, Université de La Réunion	Examinateur
Albin Fontaine, CR, Institut de Recherche Biomédicale des Armées	Examinateur
Pierrick Labbé, PR, ISEM, Université de Montpellier	Directeur de Thèse
Haoues Alout, CR, UMR ASTRE, INRAE	Encadrant de Thèse

UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

Remerciements :

Ce fut intense, parfois beaucoup, mais qu'est-ce que c'était bien ! De ces trois années, je retiens des rencontres, des réflexions, des expériences, du travail, des rires et surtout les personnes qui en étaient à l'origine et qui au fil du temps m'ont conforté dans ma vision de qui je suis et de qui je veux être, professionnellement et personnellement. C'est dans la force collective que l'on avance, et je pense que ces années de thèse en sont le parfait exemple. J'ai eu la chance de baigner dans un environnement riche, varié et qui ne cessera de me surprendre. Ces quelques paragraphes sont pour moi un hommage à l'entraide, la collaboration et l'amitié. Pour l'ensemble de ce que vous m'avez apporté, je souhaite maintenant prendre le temps de tous vous remercier.

Tout d'abord, je souhaite remercier les membres du jury qui ont accepté de lire et d'évaluer mon travail. Merci à Gaëlle Gonzalez et Louis Lambrechts pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce manuscrit ainsi qu'Ana Rivero, Célestine Atyame et Albin Fontaine pour avoir vous aussi évalué mon travail.

Un grand merci aux membres de mon comité de suivi, Anna Cohuet, Thierry Lefèvre, Célestine Atyame, Yannick Simonin et Nicolas Galtier pour tous les échanges constructifs, les conseils et les encouragements reçus lorsque nous avons eu l'opportunité de nous retrouver ensemble autour de mes travaux.

Ce travail n'aurait pas pu avoir lieu sans les deux unités que j'ai eu la chance de connaître. Je remercie tout d'abord la direction, Nathalie Vachiery pour ASTRE et Nicolas Galtier pour l'ISEM. Merci grandement d'avoir permis la réalisation de cette thèse sur les deux laboratoires.

Je remercie toutes les personnes de l'ISEM pour les moments d'échanges que j'ai pu avoir avec vous tous. Évidemment, je remercie énormément tous les membres de l'équipe EVAS. Merci à Mylène, Mathieu et Christophe pour vos conseils et pour tous vos encouragements. Un très grand merci à Patrick et Sandra pour leur travail avec les moustiques à l'insectarium et pour avoir toujours répondu à mes demandes, merci beaucoup pour tout. Merci à Jean-Loup, pour tes conseils, tes encouragements et pour les échanges que nous avons pu avoir durant ces années. Je suis très heureux et reconnaissant d'avoir pu apporter à mon échelle ma contribution aux travaux de cette équipe riche d'une histoire scientifique et humaine importante.

Je remercie également toutes les personnes de l'unité ASTRE avec qui j'ai eu la chance de travailler, discuter, réfléchir et rire durant ces trois années. Merci à Olivier, Renata Samia, Camille, Catherine, Aurélie, Gaëlle, les Philippe, Patricia et globalement toutes les personnes qui font de cette unité un endroit où il est bon de s'y trouver. Je n'oublierai jamais les discussions de couloirs, les réunions, les manips et les soirées passées en votre compagnie. Merci également à toutes les personnes du campus international de Baillarguet, des chercheurs, aux personnels techniques jusqu'au personnel de la cantine, pour tous ces moments partagés à vos côtés.

Je remercie évidemment tous les membres du collectif vecteur de l'unité ASTRE. Karine, Hélène, Laurence, Frédéric, Anissa, Thomas B et tous ceux qui contribuent à faire de ce collectif un formidable groupe de travail où je me suis senti à ma place. Un grand merci aux deux coordinateurs du collectif, Claire et Thomas, merci infiniment pour votre soutien quand c'était compliqué. En plus de ces personnes, je souhaite particulièrement remercier en premier lieu Maxime et Ignace pour votre implication à l'insectarium, votre aide précieuse au bon déroulé de ces travaux et pour tous les bons moments de rires passés dans notre côté du bâtiment. Ensuite je remercie chaleureusement Théo avec qui j'ai eu la chance de travailler un an et grâce à qui j'ai pu acquérir des compétences en bio-informatique précieuses. Merci pour tout ce précieux travail, pour ta pédagogie et ta bonne humeur.

Enfin je souhaite exprimer toute ma gratitude, mon admiration et mes remerciements à David et Mélanie. Merci tout d'abord à mon frérot David, pour ta bonne humeur, ton soutien et pour ton aide à chaque fois que j'en ai eu besoin. Merci à Mélanie, ton investissement a été une source d'énergie considérable lorsque j'ai eu besoin de coups de mains, mais au-delà de ça tu as été toujours à l'écoute pour moi, une véritable confidente.

Merci à vous deux d'avoir été si investis et d'un soutien sans faille, je n'oublierai jamais ce que vous avez fait pour moi et j'en serai toujours reconnaissant.

J'ai une pensée pour toute l'équipe pédagogique du BTS BioAC du Lycée Marie Curie de Marseille, de la licence biologie écologie de l'Université Savoie Mont Blanc du Bourget du lac ainsi que du Master EPI de Montpellier. Merci à tous pour vos enseignements et pour m'avoir permis d'en arriver jusqu'à ces trois années de thèse. Enfin j'ai aussi une énorme pensée pour toutes les personnes du laboratoire départemental vétérinaire de Gap, pour m'avoir accompagné pendant mes deux années de BTS avec mes premiers sujets scientifiques à traiter et qui ont parachevé ma formation avec une si grande qualité. Merci Dominique, Babeth, Agnès, Fabrice, Florence et toutes les merveilleuses personnes qui m'ont si chaleureusement accueilli pour mes premières expériences en labo lors de ces deux années.

Je n'aurais pas pu imaginer réaliser ces années sans une meilleure génération de thésards que celle que nous avons formée.

Merci à Roger, pour tous ces moments de rire, et pour tous les conseils que tu as pu me donner sur tous les sujets possibles pour lesquels je t'ai sollicité, merci infiniment.

Merci à Célia pour ta bonne humeur, ton soutien et ta bienveillance depuis maintenant 4 ans ! Hé oui ils paraissent loin maintenant les repas dans l'herbe ! Merci à Côme, mon allié de la team moustique ! Merci pour toutes les discussions scientifiques, les rires et les saute-moutons sur n'importe quels poteaux du centre-ville ! Merci à Florian, ta joie de vivre et ton sourire ont été un rayon de soleil durant ces 4 ans, même le ménage à l'insectarium devient fun si c'est avec toi !

Évidemment je vais remercier ceux qui m'ont accompagné au bureau 255. Merci à Carla pour ta bonne humeur, représentons encore un peu plus les couleurs du master EPI ! Merci à Jordan, pour tous ces rires qui peuvent être déclenchés d'un simple coup d'œil au-dessus de l'écran. Merci également pour tous tes conseils en viro, et pour les longues après–midi passé dans le P3. Je suis heureux d'avoir partagé ces 4 années avec toi. Merci à Léo, pour tous ces moments passés à parler tech, séries et jeux vidéo.

Merci également à Aadel et Lorn, gardez cette bonne humeur qui vous va si bien. Soyez fort, vous allez tout déchirer. Un grand merci aux stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer, Léa Oussama et Noémie, merci d'avoir contribué chacun et chacune à ce projet, ainsi qu'à l'ensemble des autres étudiants que j'ai côtoyé durant ces années.

Merci à tous mes amis, ceux à mes côtés depuis le lycée. Ceux rencontrés durant mes années à la fac. Et bien évidemment toute la bande Icebreakers grâce à qui n'importe quel moment/voyage même le plus banal devient une aventure ! Que la fête continue !

Je remercie infiniment mes parents, qui ont toujours été d'un soutien sans faille. Merci pour tout, merci de croire en moi, d'avoir toujours été là et de m'avoir permis d'avoir une scolarité telle que je l'ai eu. J'espère vous avoir rendu fiers, c'est en grande partie grâce à votre soutien que j'ai pu avancer. Je remercie ma petite sœur Mathilde, pour qui j'ai toujours énormément d'admiration dans tout ce qu'elle entreprend, que ce soit pour réparer les corps dans son travail ou pour inventer toutes sortes de situations les plus drôles les unes des autres. Merci à ma grand-mère, à Claude et à Brigitte ma marraine pour votre soutien. Je vous aime.

Merci également à ma belle-famille, Muriel, Frédéric, Christophe et Jennifer pour votre soutien sans faille même à des kilomètres. Merci également à Jacques, ta bonne humeur et ton intérêt pour nos travaux sont des éléments de motivation précieux.

Merci infiniment Charlotte, pour tout ce que tu fais au quotidien pour moi. Merci d'avoir été d'un soutien si important, d'avoir été ma source de motivation sans limites. Je suis extrêmement fière de toi et reconnaissant pour tout ce que tu m'as apporté. Merci d'avoir débuté ce chemin avec moi et de le continuer encore et encore.

Enfin je vais remercier les deux personnes grâce à qui j'ai vécu cette aventure.

Un immense merci à Pierrick, merci de m'avoir accordé ta confiance et d'avoir accepté d'être mon directeur de thèse. Je te remercie pour tous les moments où tu as été à l'écoute quand j'en ressentais le besoin. Ta pédagogie, ta patience, ton soutien, ont été précieux pour moi, pour la construction de ce manuscrit et dans ma formation de chercheur. Moi qui n'ai pas fait ma licence à Montpellier je n'ai pas eu l'occasion de t'écouter sur les bancs des amphis, mais à chaque étudiant me demandant qui était mon directeur de thèse, et à qui je citais ton prénom, c'était toujours la même réponse, « Mais t'as trop de chance !! » Et évidemment ils ont raison ! J'ai eu un directeur de thèse en or, merci pour tout !

Enfin je terminerai ces remerciements par celui qui m'a fait confiance il y a de cela 4 ans. Merci infiniment Haoues. Merci de m'avoir permis de réaliser ce projet, de m'avoir toujours poussé, jusqu'à mes derniers retranchements, mais toujours avec une bienveillance et une pédagogie rare. J'ai passé 4 années aux côtés d'un encadrant avec qui je pouvais parler de tout, de sciences, de la vie, librement. Je n'oublierai jamais nos petites bières improvisées le soir où on refaisait le monde. De grands poètes que nous apprécions tous les deux ont dit un jour « Demain, c'est loin » mais grâce à toi, demain a beau être loin je n'en ai pas peur. Avoir pu évoluer avec toi me permet de partir avec un apprentissage scientifique complet et la tête pleine de souvenirs que j'espère nous pourrons à l'avenir continuer de remplir. Je suis extrêmement fière d'avoir été ton premier doctorant, et j'espère avoir été à la hauteur car pour moi tu as été le meilleur encadrant, un exemple. Merci infiniment d'avoir été bien plus qu'un directeur de thèse, un véritable ami.

Un jour j'ai entendu dire que c'était au sommet de la montagne, qu'on se sentait le plus seul. Pour ma part, au contraire je crois que je ne me suis jamais senti aussi bien entouré, et pour finir, j'ai une pensée pour ceux qui n'ont pas pu voir l'aboutissement de notre travail, mais qui depuis encore plus haut nous ont vu arpenter le chemin et arriver jusqu'ici 💫

Table des matières :

Abréviations : 11

Liste des figures : 12

Liste des Tables : 13

Introduction : 14

OneHealth, ou de la complexité des problématiques de santé publique : 14

Les moustiques, contexte général et taxonomie : 15

Le complexe *Culex pipiens* 18

Ecologie : 20

Risques en santé humaine et vétérinaire, la notion de capacité vectorielle : 22

La compétence vectorielle, une notion-clé pour comprendre la transmission : 25

Arbovirus émergents d'intérêts : 32

Le virus Usutu : 32

Le virus du Nil occidental : 36

USUV et WNW, deux arbovirus sous surveillance : 39

Lutte anti-vectorielle : 41

La résistance aux insecticides 44

La résistance, mais à quel prix ? et quel impact sur la transmission ? 48

Objectifs de cette thèse : 50

Chapitre I : Influence des facteurs génétiques du virus 52

Capacité vectorielle de *Cx. pipiens* pour deux lignées du virus Usutu 52

Article 1 : Virulence and transmission vary between Usutu virus lineages in *Culex pipiens*. (PLoS NTD, 2024) 56

Influence des facteurs génétiques du vecteur 77

A) Influence de plusieurs gènes de résistance (*ace-1 ; kdr ; rdl, Ester*) sur la capacité vectorielle de *Cx. pipiens* pour le virus Usutu. 77

Article 2 : Impact of multiples insecticide resistant allele on *Culex pipiens* vector competence for Usutu virus. (in prep.) 80

B) Influence de la résistance aux insecticides sur la transmission du virus Usutu et du virus du Nil occidental par *Cx. quinquefasciatus* : 111

a- *Cx. quinquefasciatus* vs WNV : 114

b- *Cx. quinquefasciatus* vs USUV : 120

Article 3 : Investigating the interplay between insecticide resistance and Usutu virus transmission in *Culex quinquefasciatus* (in prep). 124

Article 4 : Investigating the interplay between insecticide resistance and *Culex quinquefasciatus* life history traits under USUV expositions (in prep). 158

Conclusions du chapitre 1 : 192

Chapitre II : Impacts des arbovirus et des gènes de résistance sur l'expression du génome . 196

Prérequis pour des analyses RNA-seq sur un modèle arthropode 196

A) Gènes impactés par la réponse à l'infection par USUV chez *Cx. pipiens* 197

B) Influence de la résistance aux insecticides organophosphorés sur l'expression des gènes lors de la réponse de *Cx. quinquefasciatus* à l'infection par USUV 205

1) Réponses à l'exposition à USUV (article 3) 206

2) Effet des différents gènes de résistance sur le transcriptome en absence d'exposition à USUV (article 4) 210

Conclusion chapitre 2 : 213

Comparaison *Cx. pipiens* et *Cx. quinquefasciatus* : 217

Discussion générale : 219

Des expérimentations en laboratoire vers le risque vectoriel lié à la résistance : 222

Dans un futur proche, étudier les effets de la résistance sur l'évolution virale 224

Conclusion générale : 225

Références : 227

Résumé grand public : 247

Abréviations :

Ae. : *Aedes*
ace-1 : Acétylcholinestérase 1
AChE : Acétylcholinestérase
ADN : Acide Déxosyribonucléique
ANSES : Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail
ARN : Acide Ribonucléique
C : capside
CG : Control group, Groupes contrôles
CNV : Copy Number Variation
Cx. : *Culex*
DENV : Dengue virus
DE : Dissemination Efficiency = Efficacité de dissémination
DEG : Differentially Expressed Genes
E : Enveloppe
EIP : Extrinsec incubation period = Temps d'incubation extrinsèque
FAO : Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (Food and Agriculture Organization of the United Nations)
IE : Infection efficiency = Efficacité d'infection
JEV : Japanese Encephalitis Virus
kdr : knockdown résistance
LAV : Lutte anti-vectorielle
MIB : Midgut Infection Barriere
nAChR : récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine
NS : non-structurale
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PCR : Polymerase Chain Reaction
PFU : Plaque-Forming Unit
prM : pré-membrane
s.l. : sensu lato
sp. : Réfère à une seule espèce et *spp*. à plus d'une espèce
s.s. : sensu stricto
$TCID_{50}$: 50% Tissue Culture Infectious Dose = Dose infectieuse médiane de culture tissulaire
TE : Transmission efficiency = Efficacité de transmission
USUV : Usutu Virus
vgsc : Voltage-Gated Sodium Channel
WHO : World Health Organization
WNV : West Nile Virus = VNO : Virus du Nil Occidental
ZIKV : Zika Virus

Liste des figures :

Figure 1 : Schéma de la morphologie générale du moustique.

Figure 2 : Répartition géographique des espèces du complexe *Cx. pipiens*.

Figure 3 : Schéma du cycle de vie typique d'une espèce de moustique

Figure 4 : Schéma descriptif des différentes étapes de l'infection virale chez le moustique

Figure 5 : Organisation du génome USUV et des protéines

Figure 6 : Arbre phylogénétique (A) et reconstruction phylogéographique de la distribution (B) du virus Usutu

Figure 7 : Organisation du génome WNV et des protéines

Figure 8 : Arbre phylogénétique (A) et reconstruction phylogéographique de la distribution (B) du virus du Nil occidental

Figure 9 : Schéma du cycle de transmission du virus Usutu et du virus du Nil occidental.

Figure 10 : Schéma récapitulatif des 4 grands mécanismes de résistance physiologique aux insecticides.

Figure 11 : Efficacité de dissémination et de transmission de deux lignées du WNV chez *Cx. quinquefasciatus*.

Figure 12 : Courbes de survie au cours du temps des trois colonies *Cx. quinquefasciatus* exposés à WNV L1 (A) et L2 (B).

Figure 13 : Cinétique d'infection de la salive de *Cx. quinquefasciatus* par WNV L2

Figure 14 : Volcanoplot : Distribution de l'expression des gènes dans les contrastes

Figure 15 : Upsetplot : Analyse croisée des DEG entre contrastes

Figure 16 : Schéma récapitulatif des résultats phénotypiques et transcriptomiques des expérimentations réalisées sur les colonies *Cx. quinquefasciatus* à fond génétique homogène.

Liste des Tables :

Table 1 : Analyse de sensibilité de la capacité vectorielle.

Table 2 : Facteurs internes et externes influençant la compétence vectorielle.

Table 3 : Récapitulatif des différentes colonies *Cx. quinquefasciatus* étudiées et des allèles *ace-1* associés.

Table 4 : Résumé du nombre de gènes différentiellement exprimés par contrastes chez *Cx. pipiens* exposé à EU2 et EU3.

Introduction :

OneHealth, ou de la complexité des problématiques de santé publique :

Le concept One health « une seule santé » est un concept présenté dès le début des années 2000 par des institutions internationales telles que l'Organisation mondiale de la santé (OMS), l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) et l'Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO). Ces dernières ont érigé ce concept en une voie vers laquelle orienter les futurs travaux de recherche et de lutte contre les maladies infectieuses. Il repose sur trois principales composantes, à savoir la santé animale, la santé humaine et la santé environnementale. Considérer ces trois entités ainsi que leur synergie constitue une approche globale afin de mieux comprendre les dynamiques d'émergence et de transmission de certains pathogènes dans le monde. Cette notion prend son sens notamment lorsque l'on s'intéresse aux pathogènes à transmission vectorielle, et vous le verrez en lisant cette thèse, ceux qui m'intéresse le plus sont ceux liés aux moustiques. Le changement climatique est une problématique environnementale mais qui a des conséquences plus larges et notamment en santé humaine et animale. Dans le cadre des vecteurs (moustiques, tiques et bien d'autres), le changement climatique induit un élargissement des aires de répartitions de ces arthropodes, induit aussi par les échanges mondiaux (commerciaux ou touristiques) qui s'accentuent. Les recherches effectuées sur les facteurs influençant la transmission de ces pathogènes ont révélé le caractère complexe de la compétence et la capacité vectorielle des espèces arthropodes pour une pléiade de pathogènes qu'ils transmettent. La complexité réside notamment dans les nombreux facteurs influençant la transmission : Espèces et populations de moustiques considérées, pathogène vectorisé, nature des hôtes exposés et environnement sont autant de facteurs à considérer ainsi que leurs interactions afin de définir le degré de transmission de ces pathogènes. Ceci rend complexe et variables les résultats des études qui s'efforcent à définir le risque sanitaire lié à ces organismes.

La prolifération et l'installation de nouvelles espèces au contact des société humaines, a poussé la mise en place de moyens de luttes afin de diminuer les nuisances et les risques sanitaires. Peu soucieux des conséquences que pouvaient avoir ces traitements, par manque de connaissances mais aussi dans l'obligation d'enrayer certaines dynamiques épidémiques d'ampleur, les insecticides chimiques ont été abondamment utilisés par le passé dans l'environnement. La

pression de sélection exercée a eu pour effet de réduire la densité de populations des individus sensibles, mais à moindre mesure celle d'individus génétiquement résistants à ces composés dont les caractéristiques génétiques sont ainsi à considérer dans l'étude de la transmission des pathogènes auxquels ils sont exposés. Ces éléments génétiques vectoriels viennent ajouter de la complexité à la fois dans les études sur la transmission des pathogènes et sur la gestion de la lutte anti-vectorielle.

Au cours de ma thèse j'ai donc travaillé sur des moustiques, des virus, la capacité vectorielle et la compétence vectorielle, la lutte antivectorielle et la résistance aux insecticides, en mélangeant tout ça pour comprendre les dynamiques vectorielles. Comme pour toute étude d'interactions complexes, je vais donc devoir vous présenter d'abord chacun des acteurs et chacune des notions tour à tour, avant de vous présenter les objectifs particuliers de cette thèse.

Les moustiques, contexte général et taxonomie :

Les moustiques font partie des groupes d'êtres vivants présentant une grande diversité spécifique avec près de 3 500 espèces répertoriées (Wilkerson *et al.*, 2021). Ils font partie de l'embranchement des arthropodes, de l'ordre des diptères nématocères et de la famille des *Culicidae*. Ils sont regroupés sous 2 grandes sous-familles distinctes : *Anophelinae et Culicinae*. Les *Anophelinae* comptent 3 genres différents, et les *Culicidae* 41 (Harbach, 2007). Apparus il y a au moins 220 millions d'années (Lorenz *et al.*, 2021), ces insectes aux capacités d'adaptations remarquables ont depuis colonisé l'ensemble du globe terrestre.

Tous les genres de moustiques présentent des caractéristiques morphologiques communes et caractéristiques (**Figure 1**). Comme pour tous les insectes, leur corps est segmenté en 3 grands tagmes distincts : un abdomen, un thorax et une tête. L'abdomen est un tagme contenant les organes digestifs (estomac et intestin) et les organes sexuels (orifice génital, spermathèque oviductes et ovaires). Vient ensuite le thorax où sont fixées l'unique paire d'ailes (*i.e.* Diptère) assurant la mobilité aérienne, ainsi que les trois paires de pattes. On retrouve des organes digestifs comme les diverticules dorsaux (stockage et digestion des sucres). C'est aussi là que sont localisées les glandes salivaires. Enfin, la tête porte de nombreux organes sensoriels sur les antennes et les pièces buccales. Un dimorphisme sexuel plus marqué est observable au stade adulte, avec souvent des pièces buccales femelles spécialisées pour l'acquisition d'un repas sanguin par piqûre. L'alimentation est assurée par le proboscis, allongé et cylindrique. À

son extrémité, les labelles triangulaires contiennent des organes sensoriels pour choisir le site de piqûre. Lors de la piqûre, les pièces buccales sont insérées dans l'hôte, et la salive anticoagulante et anesthésiante est injectée, permettant à la femelle d'aspirer du sang par le canal alimentaire.

Les moustiques sont depuis longtemps une source d'inquiétude pour les pouvoirs publics et les citoyens, à cause de la nuisance qu'ils représentent pour des intérêts économiques (ex. tourisme), et des risques sanitaires qu'ils entrainent en tant que vecteurs de maladies. Cela est encore plus vrai depuis quelques années, avec l'importation et l'installation en France et en Europe d'espèces invasives (ex. le moustique tigre *Aedes albopictus*). Ces dernières ne doivent toutefois pas éclipser les espèces natives, qui présentent souvent les mêmes problématiques de nuisance et de risques sanitaires. Mes travaux de recherche se focalisent ainsi sur *Culex pipiens*, communément appelé le « moustique commun des maisons », qui fait partie d'un des complexes d'espèces le plus largement distribué sur la surface du globe.

Dans cette introduction je définirai et j'aborderai de nombreuses notions liées à l'étude des interactions entre vecteurs, pathogènes et environnement. Décrypter l'ensemble de ces points est nécessaire pour situer et comprendre les travaux menés au cours de cette thèse.

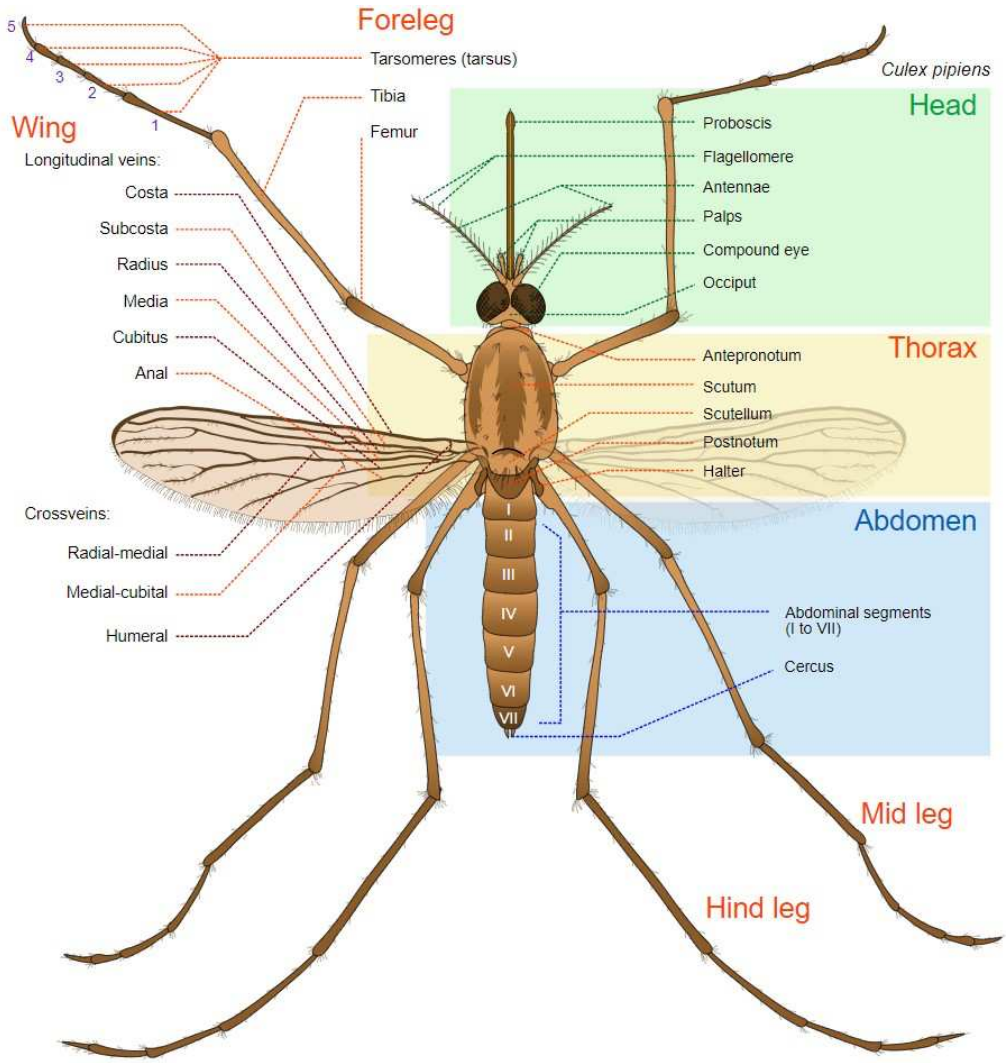


Figure 1 : Schéma de la morphologie générale du moustique : Description globale des organes du moustique composants les 3 trois tagmes principaux : l'abdomen (bleu) le thorax (orange) et la tête (vert).

Le complexe *Culex pipiens*

Le complexe *Culex pipiens* regroupe plusieurs espèces dont la classification a été et reste source de débats. Les travaux en biologie moléculaire permettent de faire avancer notre compréhension de ce complexe. Actuellement, on reconnait 5 espèces le composant. Deux d'entre elles ont une distribution très large : Il s'agit de *Culex quinquefasciatus* (présent en zone tropicales) et de *Culex pipiens s.l.* (présent en zones tempérées). Les trois espèces complétant le complexe possèdent une distribution régionale. *Culex globocoxitus* , *Culex australicus et Culex pallens,* des espèces respectivement endémiques de la zone Australienne, de Tasmanie et de Chine (Farajollahi *et al.*, 2011; Aardema *et al.*, 2022). Tous ces taxons sont capables d'hybridations dans des zones de chevauchement géographiques de leurs aires de répartitions (Haba et McBride 2022). Néanmoins il existe des exceptions en Afrique du sud et à Madagascar, où il a été rapporté des populations de *Cx. pipiens s.l.* et *Cx. quinquefasciatus* ne s'hybridant pas (Cornel *et al.*, 2003; Dumas *et al.*, 2016) ; elles pourraient appartenir en réalité à des espèces différentes (Haba et McBride in prep).

Au sein de l'espèce tempérée *Culex pipiens s.l.*, on reconnait généralement deux écotypes distincts : *Cx. molestus* (anciennement appelé *Cx. pipiens forme molestus)* et *Cx. pipiens s.s.* (anciennement appelé *Cx. pipiens forme pipiens).* L'origine de ces deux écotypes serait moyen-orientale. Puis par des changements d'aires de répartition, une colonisation et une spécialisation de niche aurait eu lieu. Celle-ci est notamment visible dans les pays du nord de l'Europe, mais tend à s'estomper lorsque l'on descend dans les latitudes, avec des hybridations de plus en plus fréquentes ; les écotypes ne sont plus différentiables en Afrique du Nord, y compris au niveau moléculaire (Haba and McBride, 2022; Arich *et al.*, 2022).

En Europe, *Culex pipiens s.s.* est décrit comme un écotype de milieux « ouverts » (épigée), on le retrouve donc le plus souvent dans les milieux peu anthropisés. Les adultes sont eurygames, c'est-à-dire qu'ils ont besoin de grands espaces pour s'accoupler. Les femelles sont anautogènes, c'est-à-dire qu'elles ont besoin d'un repas sanguin pour pondre des œufs. Les pontes et le développement larvaire se font dans des étendues d'eau stagnante disponibles à proximité. Le deuxième écotype, *Cx. molestus*, est décrit comme le moustique « des villes ».

Cette description lui vient de son habitat relativement fermé (sténogame), et il est très fréquent dans les milieux anthropisés. Au contraire de *Cx. pipiens s.s.*, *Cx. molestus* est capable d'autogénie, c'est-à-dire que les femelles sont capables de fabriquer des œufs et les pondre une première fois dès l'émergence sans un premier repas sanguin préalable (Becker, Jöst, et Weitzel 2012; Pasteur *et al.* 1977). Là-encore ces différences écologiques sont très marquées au nord de l'Europe, mais disparaissent en Afrique du Nord, où même l'autogénie n'est plus un marqueur écotypique (Arich *et al.*, 2022).

Ces deux écotypes possèdent aussi des traits communs sur l'ensemble de l'aire de répartition de *Cx. pipiens s.l.*, tels que les gites larvaires constitués de petites ou moyennes étendues d'eau stagnante, naturelles ou artificielles. Comme les autres espèces du genre *Culex*, celles du complexe *Cx. pipiens* sont principalement ornithophiles, mais elles peuvent aussi piquer d'autres espèces animales, notamment des mammifères, dont les humains.

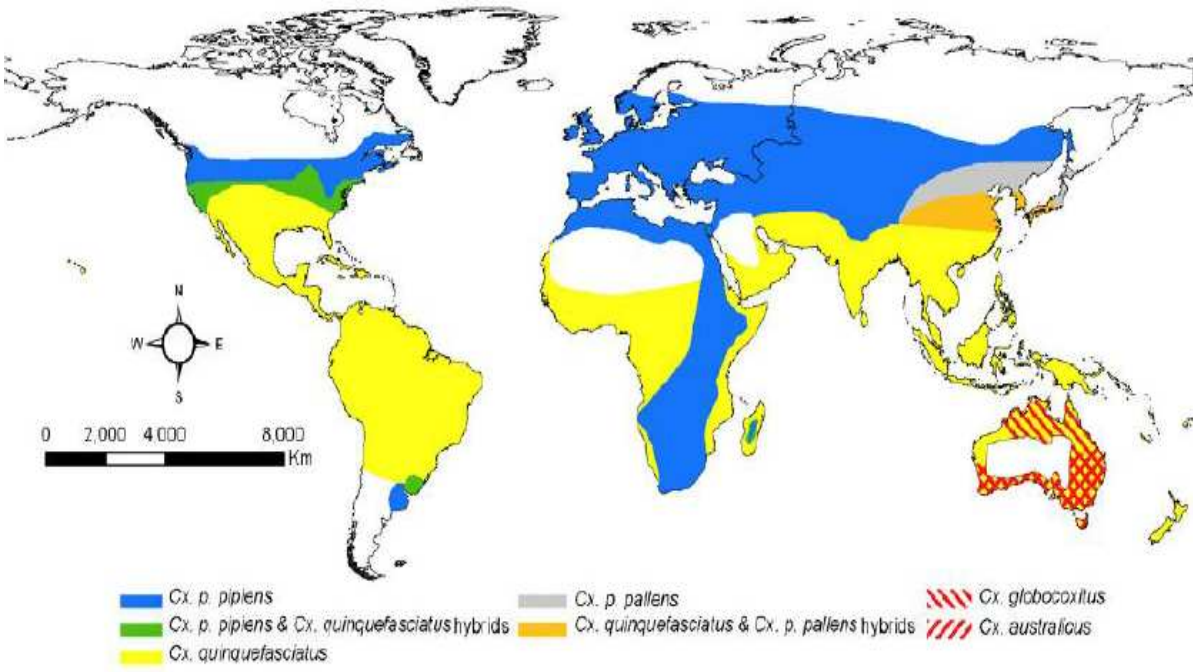


Figure 2 : Répartition géographique des espèces du complexe *Cx. pipiens*. : Répartition géographique des différentes espèces du complexe *Cx. pipiens* sur la surface du globe. Sont représentées, les aires de répartitions des différentes espèces ainsi que les zones où la coexistence et l'hybridation sont observées (D'après (Farajollahi *et al.*, 2011)).

Ecologie :

Toutes les espèces de moustiques ont un cycle de développement commun **(Figure 3)** divisé selon deux grandes phases. La phase aquatique correspond au développement larvaire et nymphale (pré-imaginale), et dure en moyenne entre 7 et 10 jours après l'éclosion des œufs. Toutefois, elle peut s'étaler sur plusieurs semaines selon les espèces, les conditions environnementales (ex. la température), la densité intra- et inter-spécifique des larves, la présence d'autres organismes en compétition ou de prédateurs dans les gites, ainsi que la disponibilité en ressources. Les larves présentent un développement en 4 phases (nommées L1 à L4) séparées chacune par une mue. Les larves de moustiques ont un mode de nutrition généralement filtreur. Elles sont détritivores, mais peuvent aussi se nourrir de microorganismes vivants, d'algues, et sont aussi capable de cannibalisme (Mastrantonio *et al.*, 2018). Suite à la phase larvaire le moustique passe par la phase nymphale/pupale qui dure entre 1 et 3 jours en moyenne. Durant celle-ci l'individu ne se nourrit pas. Une métamorphose permet le passage de la phase aquatique à aérienne, ou émergence. Les males émergent généralement avant les femelles avec un décalage d'environ 24 à 48 heures (Clements, 1992). S'en suit une phase aérienne durant laquelle les adultes, mâles et femelles, évoluent hors du gite larvaire. Au stade imaginal, les moustiques mâles et femelles se nourrissent essentiellement de sucres retrouvés dans le nectar de plantes disponibles dans l'environnement (qu'ils pollinisent au passage).

Sauf exceptions (ex. moustiques appartenant aux genres *Toxorhynchites, Malaya* et *Topomyia*; Bradshaw *et al.* 2018), seules les femelles sont hématophages. Elles effectuent au cours de leur vie plusieurs repas sanguins, indispensables pour la production des œufs. Les comportements de piqures ainsi que les préférences trophiques sont diversifiés selon les genres et les écosystèmes. Toutes les espèces des genres *Anopheles, Aedes* et *Culex* sont zoophiles, mais plutôt ornithophiles pour les *Culex*, alors que de nombreuses espèces d'*Anopheles* et *Aedes* sont plutôt mammophiles, dont certaines très anthropophiles (ex. *Ae. albopictus*). Les espèces des genres *Anopheles* et *Culex* piquent plutôt la nuit, les *Aedes* généralement la journée, avec des pics d'activités en début de journées et en fin d'après-midi. Les repas sanguins peuvent être multiples au cours de la vie d'une femelle, et un même repas de sang peut être collecté sur plusieurs sources. Le temps séparant deux pontes est appelé cycle gonotrophique (Clements, 1992). L'ingestion de sang initie l'oogenèse et la vitellogenèse chez les femelles, nécessaire à la production des œufs. La ponte est effectuée de diverses manières selon les genres : les

femelles gravides (*i.e.* portant des œufs, prêtes à pondre) pondent leurs œufs individuellement (*Aedes* et *Anopheles*) ou en radeaux de quelques centaines d'œufs groupés (*Culex*).

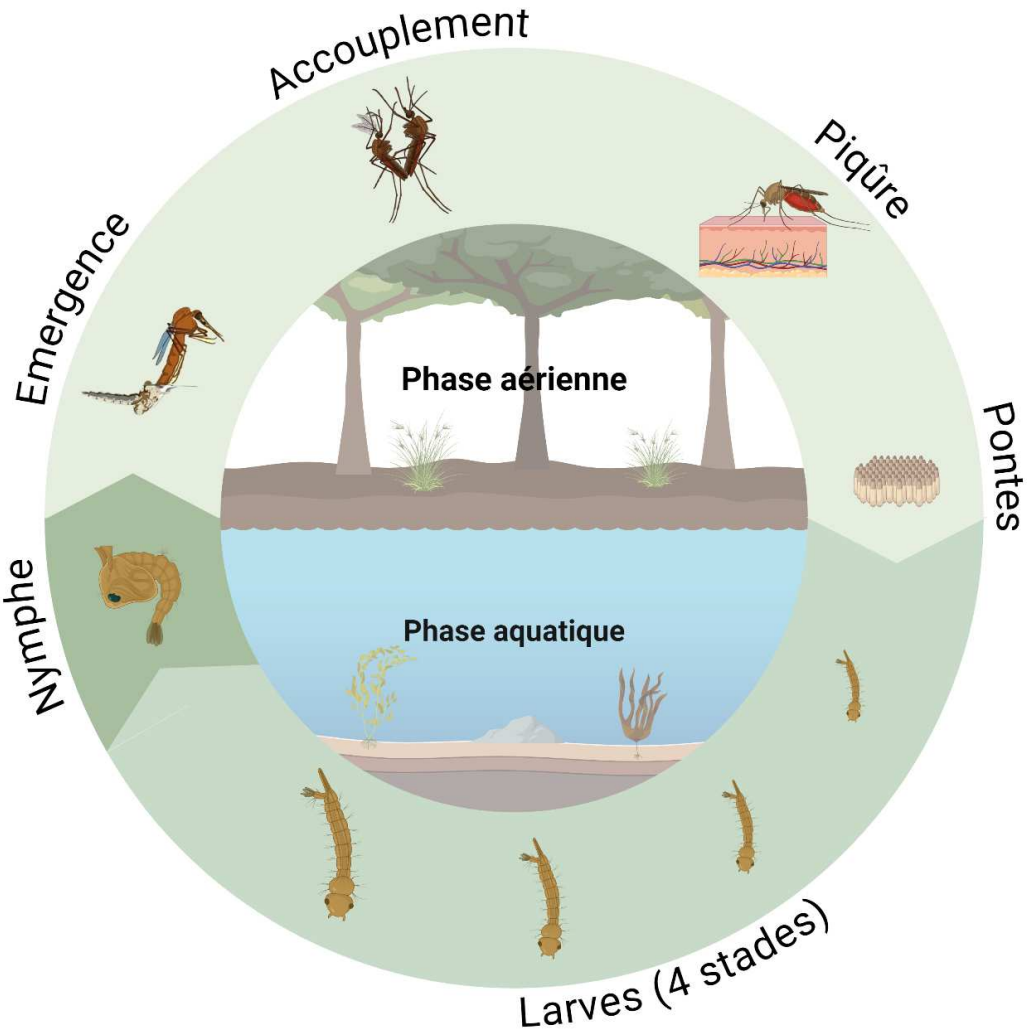


Figure 3 : Schéma du cycle de vie typique d'une espèce de moustique : Au cours de sa vie une femelle peut prendre plusieurs repas sanguins, ainsi produire plusieurs pontes (cycle gonotrophique).

Risques en santé humaine et vétérinaire, la notion de capacité vectorielle :

Les pathogènes à transmission vectorielle sont à l'origine d'environ 17% des maladies infectieuses (OMS 2020). Parmi ces pathogènes, nombreux sont ceux transmis par les moustiques.

Parmi les parasites les plus étudiés, on trouve *Plasmodium*, responsable du paludisme, ou bien *Wuchereria bancrofti,* responsable de la filariose lymphatique. Leur incidence est très importante, notamment pour *P. falciparum*, agent responsable du paludisme humain, qui est responsable de 249 millions de cas d'infections et 608 000 décès en 2022 dans le monde (World Malaria report 2023 ; OMS), et est transmis principalement par des espèces du genre *Anopheles spp* [94% des cas de transmission sur le continent africain (OMS)]. Néanmoins, des parasites du genre *Plasmodium (P. anasum, P. gallinaceum* et *P. relictum)* aussi sont responsables du paludisme aviaire dans les populations d'oiseaux sauvages, mais sont transmis par *Cx. pipiens* (Rivero et Gandon 2018).

Dans le cadre de mes travaux de thèse, nous nous focaliserons sur des pathogènes d'origine virale. Les arbovirus (ARthropods BOrne Virus) sont des agents pathogènes responsables d'environ 700 000 décès par an dans le monde, et on estime que 80% de la population mondiale présente un risque d'exposition a un ou plusieurs arbovirus (WHO : Global vector control response 2017 – 2030). Leur incidence peut être endémique dans certaines régions (exemple du virus de l'encéphalite japonaise, JEV, dans l'Est du continent asiatique) ou quasiment mondialisée (exemple du virus Zika, ZIKV, ou du virus de la Dengue, DENV, dont l'émergence récente dans certains territoires tempérés agrandit encore son aire de distribution) (OMS – 2023).

Avec les nombreux échanges mondiaux (commerce et tourisme) et les conditions climatiques changeantes, des régions jusqu'alors peu exposées peuvent en effet devenir favorables à des phénomènes d'émergence, voire même d'endémisassion, de certains de ces pathogènes. Ces pathogènes importés peuvent en effet bénéficier de l'importation et l'établissement d'espèces de vecteurs exogènes (ex de la dengue et d'*Ae. albopictus*, tous deux d'origine asiatique), voire le recrutement d'espèces de vecteurs endogènes (ex du virus Usutu d'origine africaine et des *Cx. pipiens* européens), qui permettent alors l'installation de cycles de transmission efficaces.

Les systèmes vectoriels représentent les interactions de quatre composantes spécifiques : l'environnement, les hôtes, les vecteurs et les pathogènes.

- Les interactions entre *vecteurs et hôtes* se caractérisent en partie par la *spécificité et la fréquence des contacts*, influencées par plusieurs paramètres :
  - La densité des populations de vecteurs : plus le nombre d'individus est élevé plus la fréquence de contact est grande.
  - Les préférences trophiques, qui peuvent être plus ou moins diversifiées selon les espèces (ornithophile, anthropophile, etc.), et variables selon la disponibilité des hôtes ainsi que leur nombre et leur nature (*cf* paragraphe « écologie »).
  - L'agressivité, qui dépend en partie du cycle gonotrophique et qui est défini par le nombre de contacts nécessaires avec un hôte pour réaliser les repas sanguins.
- Les interactions entre *hôtes et pathogènes* sont définies comme la *pathologie*, c'est-à-dire l'ensemble des manifestations liées à l'infection par un pathogène sur un hôte et ayant des répercutions potentielles sur son état de santé. Ces impacts sont liés à la virulence du pathogène, et ne doivent pas être trop délétères, au risque de voir l'hôte mourir et par conséquent stopper le cycle de transmission.
- Enfin les interactions entre *vecteurs et pathogènes* sont définies par la notion de *compétence vectorielle (voir plus bas)*. Cette dernière est la capacité biologique d'un arthropode à acquérir et permettre le développement, la multiplication, ainsi que la transmission d'un agent pathogène. L'étude de la compétence vectorielle est importante afin de comprendre les mécanismes et les facteurs biologiques du vecteur qui peuvent affecter la transmission d'un pathogène.

Mais la possibilité pour des vecteurs de transmettre un pathogène est également affectée par l'environnement, et implique de prendre en compte d'autres facteurs, plus écologiques. Une métrique, la *capacité vectorielle*, a ainsi été définie pour mesurer l'efficacité de transmission d'un agent pathogène par une population de vecteurs : elle tient compte de facteurs spécifiques du vecteur, de ses interactions avec le pathogène (compétence vectorielle), du temps d'incubation extrinsèque, mais aussi de divers facteurs environnementaux.

La capacité vectorielle C a ainsi été formalisée mathématiquement (Macdonald, 1952) comme :

$$C = \frac{m a_1 a_2 p^n c'}{-\ln p}$$

avec : m : le taux quotidien de piqures de l'hôte,
a : a_1 est le taux de piqure sur un hôte, a_2 sur un autre hôte,
p : espérance de vie infectante en jours,
c': la compétence vectorielle, un paramètre propre à la biologie des vecteurs en conditions d'infection,
n : la période d'incubation extrinsèque en jours.

Développée initialement pour formaliser la transmission du paludisme, cette équation peut être généralisée à tous les pathogènes à transmission vectorielle. Une étude de sensibilité montre facilement que C est très sensible à de petites variations de l'espérance de vie infectante des vecteurs (p) (**Tableau 1**) : une réduction de 10% du taux de survie journalier résulte d'une baisse de 68 % de la capacité vectorielle, p étant ainsi de loin le facteur impactant le plus C. Ceci vient donc conforter la volonté d'agir sur la transmission vectorielle via la réduction de la survie des individus pour enrayer les dynamiques épidémiques. Ceci passe par la lutte antivectorielle (LAV), qui vise à limiter fortement la survie des populations de vecteurs, et à en réduire significativement les densités (diminuant donc aussi a et m). Les différentes méthodes de LAV disponibles seront décrites plus bas.

	Valeur initiale	+10%	C	%ΔC	-10%	C	%ΔC
Densité (m)	1000	1100	0.646	10%	900	0.529	-10%
Taux de piqûre sur l'homme (a)	0.25	0.275	0.711	21%	0.225	0.476	-19%
Préférence humaine (anthropophilie)	0.5	0.55	0.711	21%	0.45	0.476	-19%
Temps entre 2 repas sanguins	2	2.2	0.485	-17%	1.8	0.725	23%
Taux d'infection des vecteurs (c')	0.01	0.011	0.646	10%	0.009	0.529	-10%
Taux de survie journalier (p)	0.8	0.88	1.998	240%	0.72	0.191	-68%
Temps d'incubation extrinsèque (n)	7	7.7	0.502	-14%	6.3	0.687	17%
Capacité vectorielle (C)	0.587						

Table 1 : Analyse de sensibilité de la capacité vectorielle : Permet d'évaluer l'importance de chaque variable. Elle est faite en fixant des valeurs initiales à chaque variable, et par une variation de +/- 10%, un recalcul est fait pour évaluer l'impact de cette variation sur la nouvelle valeur de capacité (%ΔC)

La compétence vectorielle, une notion-clé pour comprendre la transmission :

Au cours de cette thèse, je me suis focalisé sur l'étude de la compétence vectorielle de *Cx. pipiens* pour plusieurs arbovirus. La compétence vectorielle est un pilier des études épidémiologiques liées aux pathogènes transmis par les moustiques. L'infection chez le vecteur doit être efficace pour maximiser la transmission vectorielle, en contournant les barrières physiques et immunitaires des vecteurs qui s'opposent à sa réplication (voir ci-après), et sans pour autant avoir trop d'effets négatifs pour les vecteurs au risque d'en réduire la survie. La compétence vectorielle est ainsi le résultat d'une coévolution entre un pathogène et son/ses vecteurs (De Angeli Dutra *et al.*, 2022) une perpétuelle balance entre réplication virale et défenses du vecteur.

Pour comprendre la compétence vectorielle, il est d'abord nécessaire de comprendre le cycle de transmission au sein du vecteur, qui comporte plusieurs étapes schématisées en **Figure 4**. Suite à la prise d'un repas sanguin (étape 1) chez un hôte infectant (*i.e.* porteurs de formes virales capables de s'introduire dans les vecteurs), le sang ingéré via le proboscis est acheminé jusqu'à l'intestin du moustique (étape 2 ; Flèche verte). L'estomac moyen du moustique est composé d'une partie antérieure (fine) et postérieure (épaisse) avec une seule couche de cellules épithéliales. Pour initier l'infection, et si la charge en virions présents dans le sang est suffisante, ces derniers doivent alors contourner une barrière d'infection de l'intestin (étape 3, Midgut Infection Barrier : MIB). L'intestin est un organe-clé pour la compétence vectorielle, car il correspond aux premiers tissus où l'infection va être initiée. Suite au passage des cellules épithéliales de l'intestin, le virus se réplique et se dissémine dans les tissus du moustique à proximité via l'hémolymphe (analogue du sang chez les arthropodes et les mollusques, étape 4 ; Flèches bleues). L'hémolymphe est alors la voie d'infection des tissus gras, des tissus reproducteurs, des hémocytes, et enfin des glandes salivaires. L'infection des glandes salivaires par les arbovirus commence généralement dans les lobes latéraux distaux (étape 5), qui contiennent les récepteurs permettant l'endocytose des arbovirus, notamment chez les *Aedes* (Salazar *et al.*, 2007). Après réplication, le virus est émis dans les cavités apicales des cellules acineuses où se forme la salive (étape 6), ce qui peut conduire à une nouvelle inoculation lors de la piqure d'un nouvel hôte au moment du repas sanguin (Flèche violette). *NB*: la salive des moustiques contient un mélange complexe de protéines et de peptides tels que les glycosidases (dégradant les sucres), des peptides antimicrobiens, des antihémostatiques, des

protéines aux propriétés angiogéniques ou anti-inflammatoires, et des modulateurs immunitaires, qui sont injectés dans l'hôte vertébré en même temps que les virions (Schneider and Higgs, 2008). Le temps entre l'infection lors du repas sanguin (étape 1) et la présence des nouveaux virions dans la salive du moustique infecté (étape 6) est définie comme le temps d'incubation extrinsèque (EIP = *n* dans la formule de la capacité vectorielle).

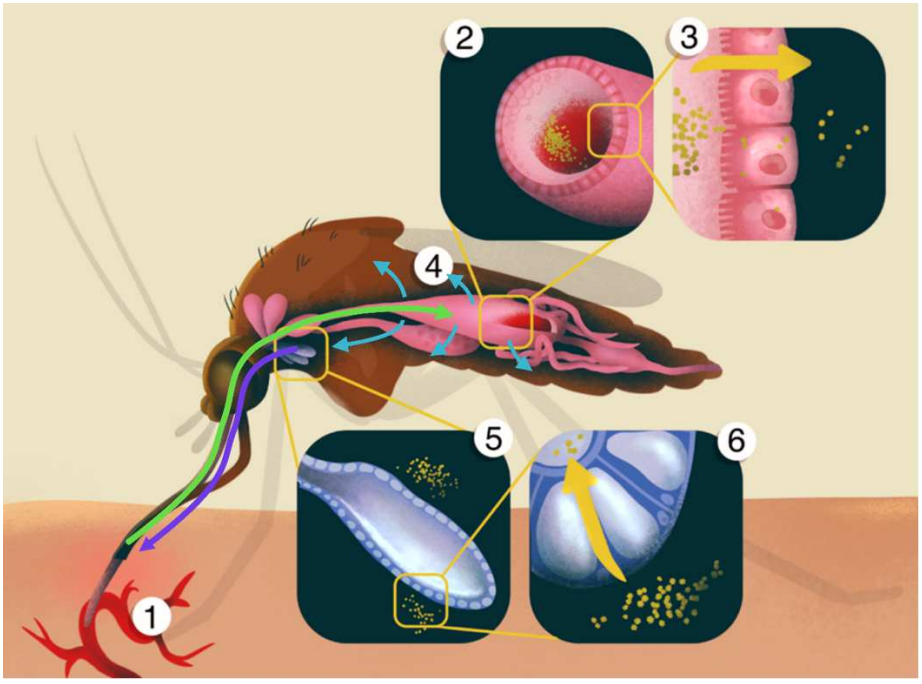


Figure 4 : Schéma descriptif des différentes étapes de l'infection virale chez le moustique : Ces étapes numérotées 1 à 6 ainsi que les flèches sont décrites dans le paragraphe ci-dessus (adapté de (Kain *et al.*, 2022)).

L'évaluation de la compétence vectorielle se fait ainsi par l'étude de plusieurs paramètres se basant sur la détection de particules virales dans les différents tissus témoignant de la progression de l'infection virale (abdomen, puis thorax, puis salive, **Figure. 4**) ; un tissu est dit positif, lorsqu'on y retrouve des particules virales. Témoignant de l'efficacité d'infection par le pathogène, ces paramètres sont classés en deux catégories :

i) Les efficacités mesurent la prévalence des différents stades d'infection du virus par rapport à l'effectif total d'individus exposés :
   - Efficacité d'infection (Infection Efficiency ; IE) = *n* de femelles présentant un abdomen positif / *n* femelles gorgées
   - Efficacité de dissémination (Dissemination Efficiency ; DE) = *n* de femelles présentant un thorax positif / *n* femelles gorgées
   - Efficacité de transmission (Transmission Efficiency ; TE) = *n* de femelles présentant une salive positive / *n* femelles gorgées

ii) Les taux permettent d'estimer l'efficacité des virus à se répliquer et infecter d'autres tissus malgré les barrières immunitaires et physiques des vecteurs (et donc l'efficacité relative de ces barrières). Pour cela, on compare le nombre d'individus présentant un tissu positif donné au nombre d'individus présentant un tissu positif antérieur dans le cycle d'infection :
   - Taux de dissémination (Dissemination Rate ; DR) = *n* de femelles présentant un thorax positif / *n* de femelles présentant un abdomen positif
   - Taux de transmission (Transmission Rate ; TR) = *n* de femelles présentant une salive positive / *n* de femelles présentant un thorax positif

La compétence vectorielle est complexe à étudier parce qu'elle est modulée par de nombreux facteurs internes aux vecteurs et aux pathogènes, mais aussi par des facteurs externes (biotiques ou abiotiques, **Tableau 2)**.

Parmi les *facteurs internes,* on trouve en premier lieux les mécanismes immunitaires du vecteur qui peuvent limiter le franchissement des barrières du vecteur : i) le virus peut ne pas pénétrer dans les cellules épithéliales ou ii) le virus peut pénétrer dans ces cellules mais ne pas s'y répliquer (Franz *et al.*, 2015). Le *système immunitaire* des arthropodes [revue par (Liu *et al.*, 2018)] est composé de plusieurs voies, parmi lesquelles Toll, JAK/STAT et IMD. Ces voies sont initiées suite à la reconnaissance de motifs spécifiques des pathogènes au niveau de récepteurs moléculaires. Elles activent des enzymes, telles que des kinases ou protéases, ou

initient la translocation de facteurs de transcription, menant à l'expression de facteurs antimicrobiens. Il existe une voie immunitaire complexe, la voie des ARN interférents (ARNi), particulièrement sollicitée en condition d'infection virale. Cette voie de défense repose sur la production de petits ARN à partir de l'ARN viral double brin : les siRNA (small interferent RNA), les miRNA (micro RNA) et les piRNA (piwi-interacting RNA) ; les siRNA sont la principale réponse antivirale chez les moustiques (Blair, 2011; Bronkhorst and van Rij, 2014). Pendant la réplication du génome viral, des ARN double brin sont produits en tant qu'intermédiaires, auxquels se lie le complexe Dicer-2-R2D2 du moustique, qui clive ensuite l'ARN pour produire des siRNA d'environ 20 nucléotides ; ces siRNA activent ensuite la machinerie ARNi en se liant à un autre complexe appelé RISC, ce qui permet l'élimination des particules virales (Prasad *et al.*, 2013a; Lee *et al.*, 2019). Les nouvelles méthodes de gene editing ont notamment permis de montrer que l'inhibition de l'expression de Dicer-2 augmente la réplication virale chez *Ae. aegypti* (Merkling *et al.*, 2023).

Du côté du virus, les vésicules extracellulaires (VE) et exosomes jouent de multiples rôles dans le succès d'infection de l'hôte. De nombreux travaux sur des modèles cellulaires infectés par des *Flavivirus* montrent le rôle des VE dans l'évasion immunitaire (Wu *et al.*, 2016) et dans le transport des particules virales ou de l'ARN viral d'une cellule à l'autre, facilitant ainsi la propagation du virus (Vora *et al.*, 2018; Martínez-Rojas *et al.*, 2020). Les VE jouent aussi un rôle dans la modulation de la réponse inflammatoire, par le transport de molécules pro-inflammatoires à l'origine de symptômes sévères (Duchateau *et al.*, 2020). Les protéines non structurales virales sont aussi à l'origine du succès d'infection de l'hôte par le pathogène : parmi elles, la sécrétion de la protéine NS1 dans le sang de l'hôte est associée à une infection plus élevée et à la suppression des réponses immunitaires des moustiques (voies JAK-STAT et ROS) pour DENV, JEV et ZIKV chez *Ae. aegypti*, *Cx. pipiens* et *Ae. albopictus* (Liu *et al.* 2016; Kuo *et al.* 2020).

Tableau 2 : Facteurs internes et externes influençant la compétence vectorielle.

Facteurs internes	*Facteurs externes*	
	Biotiques	**Abiotiques**
-Mécanismes immunitaires du vecteur -Mécanismes d'infection du pathogène -Facteurs génétiques du pathogène et/ou du vecteur -Microbiotes -Virôme/Coinfections -Comportement de piqûre -Abondance	-Origine et diversité des repas sanguins -Origine et diversité des repas sucrés -Développement larvaire -Compétition -Prédation	-Climat -Chimie environnementale

D'autres facteurs internes comme les facteurs génétiques du pathogène et de l'hôte sont aussi impliqués : des différences génotypiques des deux entités peuvent entrainer des effets différentiels sur la réponse à l'infection. Parmi les facteurs génétiques, les allèles de résistance aux insecticides peuvent avoir des effets sur la physiologie des vecteurs et entrainer des différences de transmission des pathogènes. Nous évoquerons ce point plus en détails dans le paragraphe « La résistance, mais à quel prix et quel impact sur la transmission ? ».

Les facteurs symbiotiques liés à la présence d'un microbiote (bactéries) et d'un virôme (virus spécifiques de moustiques non pathogène pour ces derniers) sont aussi à l'origine d'effets sur la compétence vectorielle. Pour le virôme, des études ont montré un effet de réduction de l'infection arbovirale par la co-infection avec ces virus spécifiques d'insectes (Bolling *et al.*, 2015). Malgré tout il reste beaucoup de questions concernant leurs effets globaux sur les infections des vecteurs. Les bactéries symbiotiques peuvent avoir des effets inhibiteurs des infections, soit par une stimulation du système immunitaire, soit par la production de métabolites interférant avec l'infection. Un exemple d'étude a porté sur *Aedes* : la présence de certaines bactéries peut ainsi entrainer une réduction de l'infection de cellules *vero* par le virus *La Cross* (Joyce *et al*., 2011). Un autre effet de ces bactéries peut être un impact direct sur les barrières à l'infection des individus, notamment par la régulation de la formation de la barrière

péritrophique de l'intestin, limitant l'infection par les pathogènes (Rodgers *et al.*, 2017). Mais l'exemple le plus étudié reste la bactérie *Wolbachia*, un symbiote retrouvé chez près de 66% des arthropodes. Les effets des différentes souches de ce symbiote sur la transmission sont dépendant des couples vecteurs-pathogènes étudiés. Selon les espèces, elle peut avoir un effet d'inhibition ou de facilitation de l'infection par différents arbovirus (ZIKV, DENV, etc., revu par (Caragata *et al.*, 2016).

Enfin le dernier facteur interne concerne les coinfections. Un exemple, qui va fortement nous intéresser par la suite, est celui du virus Usutu (USUV) et du virus du Nil occidental (West Nile Virus ou WNV). Ces deux pathogènes co-circulent dans des aires géographiques partagées en Europe (Simonin, 2024). La co-infection expérimentale par les deux virus a montré des effets divers chez *Cx. p. molestus, Cx. p. pipiens* et *Ae. vexans*, notamment pour USUV où la co-infection avec WNV entraine une augmentation ou une diminution de la susceptibilité à l'infection dépendante de l'espèce considérée (Körsten *et al.*, 2023).

Parmi les *facteurs externes biotiques*, l'origine de l'alimentation sanguine ou sucrée peut influencer la compétence vectorielle. Pour les deux sexes, le repas sucré provient de diverses plantes. La composition de ce repas sucré peut être à l'origine d'un effet protecteur contre les infections virales, comme il a été montré chez *Aedes* (Almire *et al.*, 2021). Ces repas sucrés d'origine végétale ont également montré leurs effets sur la transmission de *P. falciparium* par *An. coluzzi,* ainsi que sur la survie des vecteurs (Hien *et al.*, 2016). Une hypothèse serait qu'un stress nutritionnel lié à un manque de sucre entrainerait une plus forte susceptibilité à l'infection virale (Vaidyanathan *et al.*, 2008). Des effets de repas sanguins multiples et d'origines diverses (ovins, bovins , aviaires et humains) ont également montré des effets sur la capacité vectorielle pour *P. falciparum* (Vantaux *et al.*, 2023), mais également pour des virus tel qu'USUV : les taux d'infection de *Cx. pipiens* par USUV semblent plus importants pour un repas de sang humain que un sang d'origine aviaire (Abbo *et al.*, 2021).

La compétition interspécifique pour les ressources ainsi que la prédation ont-elles aussi un impact qui peut être non négligeable, notamment au stade larvaire. Elles entrainent en effet une réduction de la disponibilité en éléments nutritifs due à la densité d'individus présents ou au stress lié aux prédateurs qui limitent le temps alloué à l'alimentation. Par exemple, une quantité plus faible en nourriture au stade larvaire réduit la transmission de *P. falciparum* à l'état adulte chez *An. stephensi*, mais affecte aussi la survie des adultes (Shapiro *et al.*, 2016).

Concernant les *facteurs externes abiotiques*, le climat est un facteur influençant la transmission. Des travaux sur *Cx. quinquefasciatus* et *Cx. pipiens* infectés par le WNV, ont montré une corrélation entre augmentation de la température et taux d'infection (Dohm *et al.*, 2002; Richards *et al.*, 2007). Il a également été observé une diminution du temps d'incubation extrinsèque (Kilpatrick *et al.*, 2008). La température peut aussi avoir des effets sur la composition des microorganismes symbiotiques. Une augmentation de la température corrélée à une diminution de la densité de *Wolbachia* chez *Cx. pipiens* est à l'origine d'une susceptibilité accrue à l'infection par WNV (Novakova *et al.*, 2017). Beaucoup d'étude sur les effets de la température sur la compétence et capacité vectorielle sont réalisées à températures constantes. Mais durant la journée les moustiques sont soumis à des températures fluctuantes entres deux extrêmes (basse et haute). Ces extrêmes et l'amplitude entre elles peuvent présenter des effets sur le développement larvaire, la survie des adultes et la compétence vectorielle, mettant en évidence l'existence d'optimums de températures pour le développement de l'individu et la susceptibilité à l'infection (Lambrechts *et al.*, 2011; Carrington *et al.*, 2013a; b).

La composition chimique des sites de pontes et gites larvaires peut avoir des effets multiples, notamment sur le taux de survie et le développement des larves et des adultes (Hershey *et al.*, 2010; Matthews *et al.*, 2019 ; (Hery *et al.*, 2021). La présence de polluants antibiotiques a aussi des effets sur les bactéries symbiotiques du moustique, pouvant réduire sa survie à l'état adulte (Garrigós *et al.*, 2024). Enfin l'exposition aux insecticides, larvicides ou adulticides, a des effets sur i) la survie des individus exposés et y succombant, et ii) sur la physiologie des individus survivants, où la stimulation par le traitement peut avoir des effets sur la physiologie en lien avec la transmission (voir paragraphe « La résistance, mais à quel prix et quel impact sur la transmission ? »)

Pour finir, tous ces facteurs qui influencent la compétence des individus pour certains pathogènes affectent non seulement la génération de vecteurs qui y est directement exposée, mais des études suggèrent aussi des effets transgénérationnels pouvant impacter leur descendance. Un exemple d'étude sur les effets de la nutrition parentale montre ces effets chez *Ae. aegypti* : un régime nutritionnel riche ou réduit chez les mâles et femelles a des effets sur le nombre d'œufs dans la ponte, et sur la richesse en lipides et protéines dans les descendants ; ceci peut avoir des effets sur les performances des individus issus des pontes et sur la compétence vectorielle pour les pathogènes qu'ils transmettent (Yanchula and Alto, 2021).

On voit donc à quel point la compétence vectorielle est une notion complexe et multifactorielle, ce qui rend son étude tout aussi complexe et nécessite la prise en compte et le contrôle d'un nombre élevé de paramètres d'un point de vue expérimental. Malgré ces écueils, l'étude de la compétence vectorielle de différentes espèces du complexe *Cx. pipiens* pour différent arbovirus a été au cœur de ma thèse, et j'ai tenté de contrôler et d'étudier l'effet d'un maximum de ces facteurs.

Arbovirus émergents d'intérêts :

Parmi les arbovirus, la famille des *Flaviviridae* est une des plus représentée sur la surface du globe. Elle compte quatre genres distincts : Les *Pestivirus*, les *Hépacivirus*, les *Pegivirus* et les *Flavivirus* (Poidinger *et al.*, 1996). Le genre *Flavivirus* contient notamment les arbovirus de la Dengue (DENV), de l'encéphalite japonaise (JEV) ou encore Zika (ZIKV) parmi les plus étudiés. Pour mes travaux de recherches, je me suis focalisé sur deux autres arbovirus de ce genre : Le virus Usutu (USUV) et le virus du Nil occidental (WNV).

Le virus Usutu :

USUV a été isolé pour la première fois en 1959 au Zwaziland (actuel Eswatini), et tient son nom de la rivière locale Usutu (Woodall 1964). C'est un arbovirus à ARN simple brin, de polarité positive [ssRNA(+)], enveloppé dans une capside d'un diamètre d'environ 40 à 60 nm. Son génome compte 11 064 nucléotides et code pour 3 protéines structurales (C, prM et E) et 8 protéines non structurales (NS1/NS1', NS2a, NS2b, NS3, NS4a, 2K, NS4b et NS5) (Bakonyi *et al.*, 2004). La **Figure 5** présente l'organisation du génome et des gènes codants pour les protéines.

Figure 5 : Organisation du génome USUV et des protéines : Le génome de USUV comporte 3 protéines structurales : C (protéine de capside), prM (protéine pré-membranaire) et E (glycoprotéine d'enveloppe), et 8 protéines non structurales : NS1 (association à NS4A pour permettre la réplication génomique), NS2A (coordonne le passage de l'ARN empaqueté à la réplication), NS2B (protéine membranaire, permet la formation d'un complexe protéase avec NS3) ; NS3 (enzyme à activité multiples : protéase à serine de type trypsine, hélicase et ARN triphosphatase ; joue également un rôle dans la réplication de l'ARN) ; NS4A (s'associe à NS1 pour la réplication génomique) ; et NS5 (polymérase à ARN dépendante de l'ARN) (Bakonyi *et al.*, 2004))

USUV présente un cycle enzootique, comprenant principalement des oiseaux en tant qu'hôtes amplificateurs, et des moustiques ornithophiles vecteurs. Les hôtes aviaires les plus sensibles à l'infection sont principalement des espèces appartenant aux ordres des Passeriformes et des Strigiformes (Angeloni *et al.*, 2023). Parmi les vecteurs d'USUV, on retrouve majoritairement des moustiques du genre *Culex* (Nikolay *et al.* 2011).

Un très grand nombre de vertébrés ont montré des anticorps témoignant d'une infection. Parmi eux, on retrouve les chevaux (Durand *et al.* 2016; Bażanów *et al.* 2018 ; Ben Hassine *et al.* 2014), des chiens (Durand *et al.* 2016 ; Montagnaro *et al.* 2019), des sangliers et ruminants, sauvages ou domestiqués (Escribano-Romero *et al.*, 2015), des rongeurs (Diagne *et al.*, 2019), des chauves-souris (Cadar *et al.*, 2014), ou encore des humains (Roesch *et al.* 2019; Cadar et Simonin 2022). Ces hôtes sont sensibles à l'infection, mais sont considérés comme hôtes accidentels, car ils ne contribuent pas à la propagation du virus ; on parle d'impasses épidémiologiques (Vilibic-Cavlek *et al.*, 2020). Chez l'humain, l'infection est généralement asymptomatique (Grottola *et al.*, 2017) ou peu symptomatique (simple fièvre, sans caractéristique particulière), mais peut causer des troubles neurologiques chez les personnes immunodéprimées (Cavrini *et al.*, 2009; Pecorari *et al.*, 2009).

Au cours d'une étude réalisé lors de mon Master 1, nous avons reconstruit la phylogénie et la phylogéographie d'USUV à l'aide de l'outil Nextstrain (Hadfield *et al.*, 2018) sur la base du génome complet disponible dans les bases de données internationales (**Figure 6A et B**). Les résultats obtenus ont été générés grâce a plus de 600 séquences récoltées sur les bases de données ouvertes, et sont disponibles publiquement :

(https://nextstrain.org/community/Wesstic/Usutu-Virus).

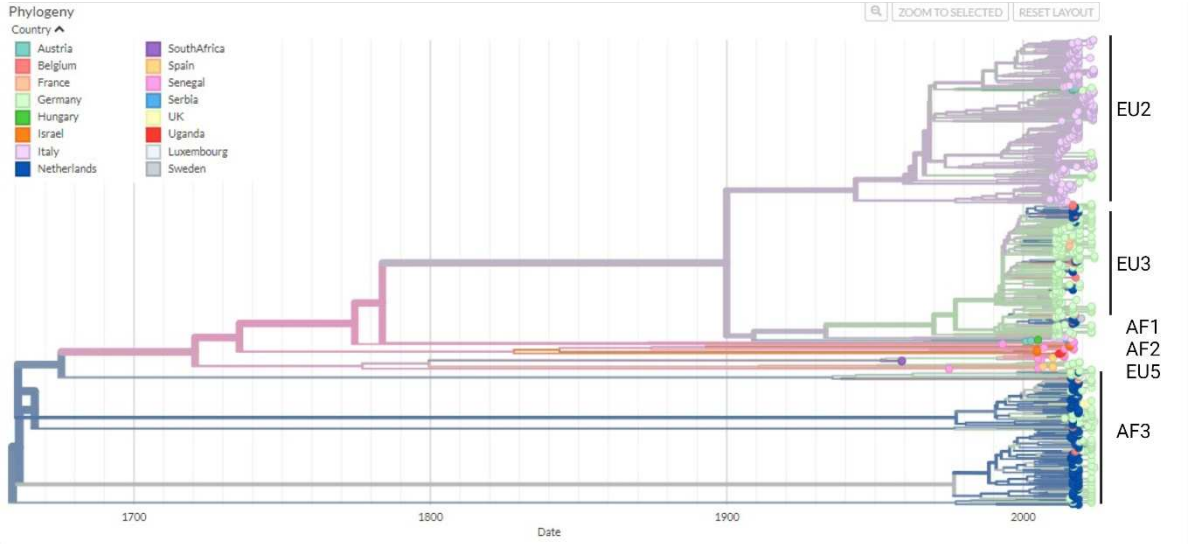
Nos données semblent coïncider avec de précédentes phylogénies réalisées sur la base du gène NS5, E et génome complet (Engel *et al.*, 2016; Roesch *et al.*, 2019), mais aussi avec des données plus récentes (Siljic *et al.*, 2023).

Notre étude a permis de mettre en évidence plusieurs évènements d'introduction en Europe depuis le continent africain, comme en témoigne la proximité génétique de séquences échantillonnées en Afrique et en Allemagne et/ou en Italie (**Fig. 6A et B**). Des études rétrospectives ont montré que sa primo-émergence en Europe daterait de 1996 (Engel *et al.*, 2016). Suite à cela, USUV a été détecté dans 15 pays européens dans divers animaux, des moustiques et chez des humains (Cadar et Simonin 2022). La phylogéographie générée lors de mes travaux de Master suggérait une forte circulation entres pays européens depuis l'introduction africaine. Des études sérologiques multiples recueillies au cours des dernières années ainsi que le séquençage du matériel génétique viral collecté a permis la comparaison avec des séquences virales de référence : la redondance de collectes d'échantillons génétiquement affiliés aux mêmes lignées et dans des localités proches confirment une circulation du virus dans les pays européens et une endémisation d'USUV au niveau du continent, et notamment en France (Constant *et al.*, 2022).

En Europe, les lignées EU1, EU2, EU3, EU4, AF2 et AF3 ont été détectées dans le réservoir aviaire, témoignant de la forte susceptibilité des oiseaux à l'infection par cet arbovirus. La lignée EU2 est celle qui a été le plus fréquemment détectée. Les études comparatives de la virulence entre lignées chez le modèle vertébré restent limitées. Une étude de 2021 montre que la lignée EU2 est la plus virulente sur le modèle murin, et présente un pouvoir réplicatif également significativement supérieur aux autres lignées européennes et africaines (Clé *et al.*, 2021). Sur les échantillons de moustiques collectés, il a été détecté les lignées EU2, EU3, EU4 , AF2 et AF3, la lignée EU2 étant également la plus fréquemment détectée (Vilibic-Cavlek *et al.*, 2020).

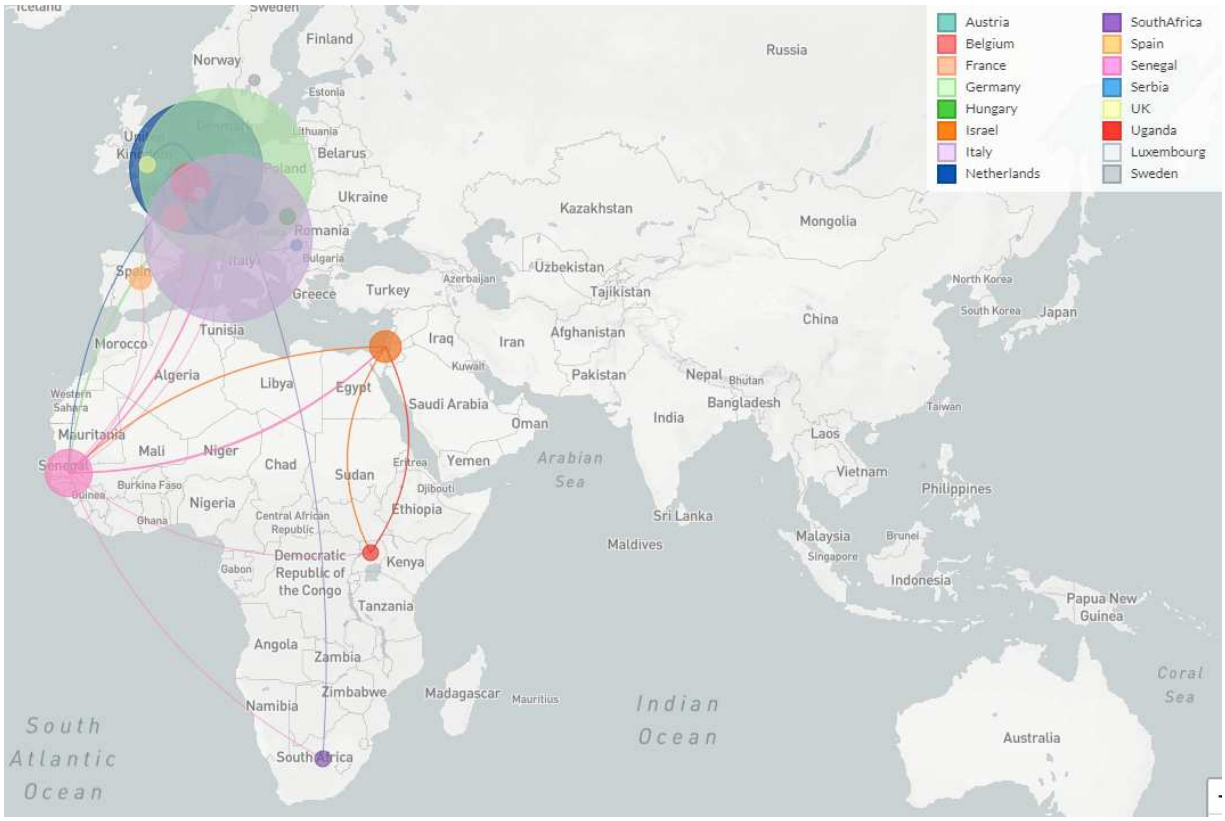
Figure 6 : Arbre phylogénétique (A) et reconstruction phylogéographique de la distribution du virus Usutu (B) :

A)



Arbre phylogénétique d'USUV construit sur la base du génome complet et par méthode par maximum de vraisemblance. Chaque couleur représente les lieux de collecte des échantillons séquencés issus des métadonnées disponibles.

B)



Le virus du Nil occidental :

Le virus du Nil occidental (WNV) a été isolé pour la première fois en 1937 en Ouganda (Williams *et al.,* 1964). C'est un arbovirus à ARN simple brin de polarité positive [ssRNA(+)] et dont le génome a une taille d'environ 11 kb. L'enveloppe du virion est d'environ 50 nm. Son génome code pour 3 protéines structurales (C, prM et E), ainsi que 7 protéines non structurales (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5).

Figure 7 : Organisation du génome USUV et des protéines codées : Le génome de WNV comporte 3 protéines structurales : C (protéine de capside), prM (protéine pré-membranaire) et E (glycoprotéine d'enveloppe), et 7 protéines non structurales : NS1 (association à NS4A pour permettre la réplication génomique), NS2A (coordonne le passage de l'ARN empaqueté à la réplication), NS2B (protéine membranaire, permet la formation d'un complexe protéase avec NS3) ; NS3 (enzyme à activité multiples : protéase à serine de type trypsine, hélicase et ARN triphosphatase ; joue également un rôle dans la réplication de l'ARN) ; NS4A (s'associe à NS1 pour la réplication génomique) ; NS4B (participe à la résistance antivirale) ; et NS5 (polymérase à ARN dépendante de l'ARN (RNA dependant RNA polymerase, RdRp)) (Lindenbach, B. D., Thiel, H. J. & Rice, C. M. (2007))

Le cycle de transmission du virus a été décrit pour la première fois en 1956 (Taylor *et al.*, 1956). De la même manière qu'USUV, WNV est maintenu dans un cycle impliquant un réservoir aviaire (Komar *et al.*, 2003; Kramer *et al.*, 2008) et des vecteurs arthropodes principalement du genre *Culex* (Nikolay, 2015; Fros *et al.*, 2015; Vogels *et al.*, 2016).

Parmi les hôtes vertébrés, on compte un grand nombre d'hôte accidentels, mammifères sauvages (Root and Bosco-Lauth, 2019), amphibiens et reptiles (Kostiukov *et al.*, 1985; Farfán-Ale *et al.*, 2006), mais les plus fréquents restent les chevaux ou les humains (Saiz *et al.* 2021 ; « Epidemiological Update: West Nile Virus Transmission Season in Europe, 2023 » 2024). Une virémie faible développée lors de leur infection ne permet pas une nouvelle transmission, ils sont donc considérés comme des impasses épidémiologiques (Joubert *et al.*, 1970). Chez l'humain, l'infection est là-encore généralement asymptomatique ou peu symptomatique (syndrome pseudo-grippal), mais WNV mais peut causer des troubles neurologiques importants, et parfois mortels, notamment chez les sujets âgés (CDC, 2024).

En Europe, le virus émerge dans le bassin méditerranéen, en Albanie, dans les années 1950 (Bardos *et al.*, 1959). WNV est détecté pour la première fois en France en 1962, dans des échantillons de moustiques issus de Camargue (Murgue *et al.*, 2001). En 1999, le virus a été introduit aux États-Unis, engendrant des flambées épidémiques majeures et une propagation sur l'ensemble du pays dans les années qui suivirent (Nash *et al.*, 2001). Depuis, sa circulation est fréquemment rapportée dans ces zones, témoignant d'une circulation locale, *i.e.* d'une endémisation (Bahuon *et al.*, 2016).

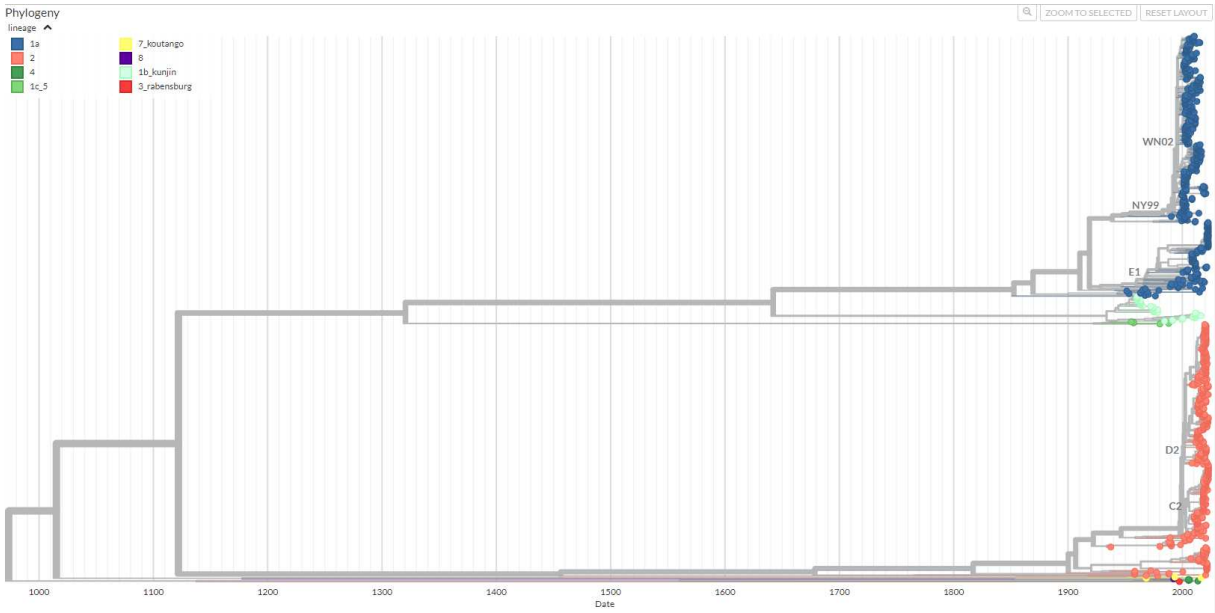
Phylogénétiquement, ce virus compte 9 lignées réparties sur le globe (Mencattelli *et al.*, 2023). Les lignées 1, 2, 7 et 8 ont été isolées en Afrique; ce sont majoritairement les lignées 1 et 2 qui circulent en Europe (Mencattelli *et al.*, 2023). Aux USA, contrairement à l'Europe, une introduction unique, détectée la première fois en 1999 à New-York serait à l'origine de l'émergence du virus (Jia *et al.*, 1999; Lanciotti *et al.*, 1999). A l'heure actuelle, la lignée 1 du virus est la lignée majoritaire détectée en Amérique du nord, comprenant 3 génotypes très proches en terme d'homologie de séquences (NY99, WN02 et SW03) (Di Giallonardo *et al.*, 2015). La phylogénie et la phylogéographie du virus ont été elles-aussi générées sur la base du génome complet, à partir de plus de 900 séquences disponibles publiquement et datées de 1937 à 2022, par T. Koch et N. Grubaugh (Koch *et al.*, 2024), et sont disponibles publiquement (**Figure 8A et B**) :

https://nextstrain.org/community/grubaughlab/WNV-Global?c=lineage&p=grid

Ces résultats (Fig. 7A et B) montrent l'origine africaine du virus, et l'introduction récente en Europe puis aux Etats-Unis. Ces données illustrent aussi la circulation locale des lignées virales, avec en Amérique du nord la domination de la lignée 1 dans les échantillons séquencés, confirmant les données de la littérature.

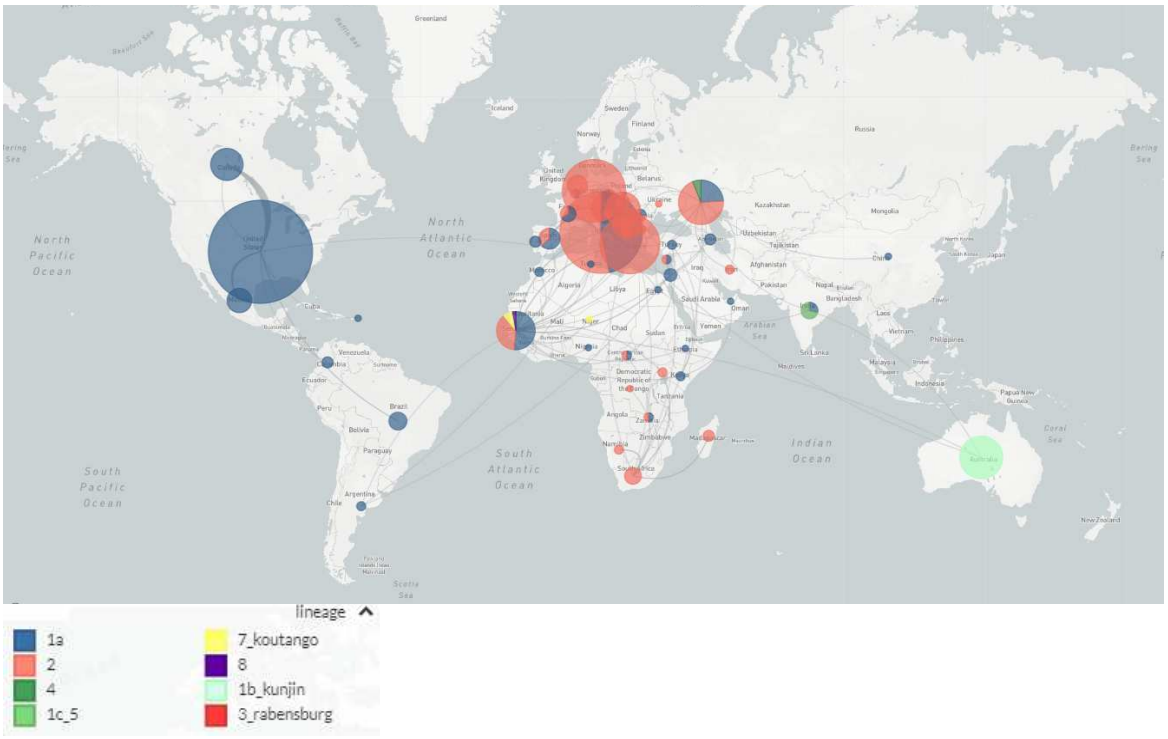
Figure 8 : Arbre phylogénétique (A) et reconstruction phylogéographique de la distribution (B) du virus du Nil occidental :

A)



Arbre phylogénétique d'USUV construit sur la base du génome complet et par méthode par maximum de vraisemblance. Chaque couleur représente une lignée virale identifiée des métadonnées disponibles. (D'après (Koch *et al.*, 2024)

B)



USUV et WNW, deux arbovirus sous surveillance :

USUV et WNV sont deux arbovirus très similaires, à la fois sur un plan biologique et sur le plan épidémiologique. L'avifaune joue un rôle central dans le maintien local de ces cycles de transmission, et les flux migratoires aviaires depuis le continent africain vers des pays européens ont sans doute été la principale voie d'introduction (Mancuso *et al.*, 2022). Ils ont en commun un grand nombre d'espèces vectrices ou réservoirs, et de nombreux hôtes accidentels. On compte ainsi 34 espèces d'oiseaux (résidentes ou migratoires) communes aux deux virus (Nikolay 2015). Néanmoins le spectre d'hôte et les impacts sur ces derniers sont « inversés »: WNV a un impact réduit sur la mortalité aviaire, tandis que USUV est très pathogène et entraine de nombreuses pertes au sein des populations touchées (Vilibic-Cavlek *et al.*, 2020).

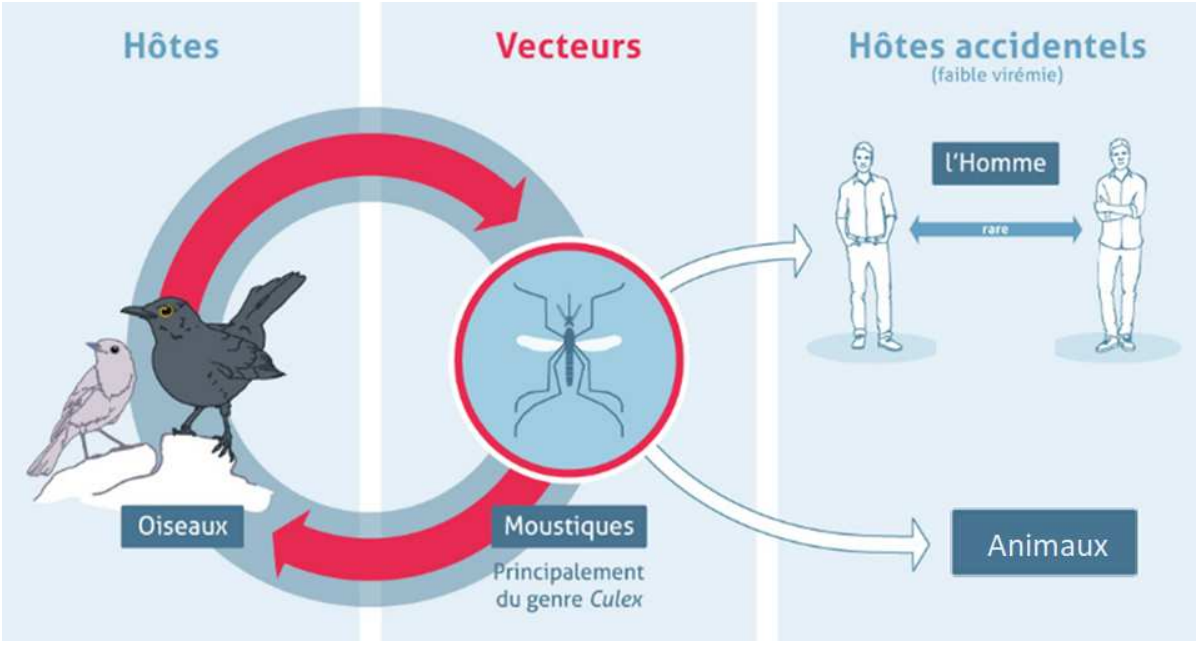


Figure 9 : Schéma du cycle de transmission du virus Usutu et du virus du Nil occidental : Les flèches rouges représentent le cycle biologique du virus (entre moustiques et espèces aviaires), les flèches blanches représentent les infections possibles vers des hôtes accidentels (adapté de C. Muller Biogent)

WNV bénéficie d'une surveillance institutionnelle organisée en France. Elle est assurée par différents acteurs : surveillance entomologique par l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication (EID), surveillance équine par les vétérinaires, la Direction départementale de l'emploi, du travail, des solidarités et de la protection des populations (DDcsPP) et les

Laboratoires départementaux d'analyses vétérinaires (LDAV), surveillance humaine par le Centre national de référence (CNR), les hôpitaux, l'Agence régionale de santé (ARS) et le SpF, et enfin la surveillance de l'avifaune par l'Office français de la biodiversité (OFB), le réseau SAGIR et les parcs zoologiques. Pour WNV, il s'agit d'une maladie à déclaration obligatoire en France depuis le 12 Mai 2021 (SPF). Le laboratoire national de référence (LNR) de l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) coordonne un réseau de laboratoires agréés. En cas de suspicion d'infection d'un animal par WNV, des analyses sérologiques (ELISA IgG) ou moléculaires (PCR, séquençage) sont réalisées par le LNR. Lorsqu'un cas est avéré, le LNR alerte les autorités, notamment la DGAL et la DDcsPP concernée, afin d'étudier les mesures à mettre en place.

Il n'existe en revanche pas en France de surveillance institutionnelle mobilisée pour USUV. Les travaux de recherche intégrée réalisés par des organismes de recherche lors d'infections suspectes permettent d'avoir une vision des lignées circulantes et des cas associés sur l'hexagone (exemple : Projet Arbosud 2018-2021 : INSERM – Univ. Montpellier – CIRAD – CHU). Les méthodes moléculaires et sérologiques pour détecter la présence du virus sont similaires à celles réalisées pour WNV (PCR et ELISA).

Bien que leurs impacts humains restent limités, ils présentent néanmoins des impacts plus importants sur les populations aviaires et sur la faune sauvage ou domestique, les chevaux notamment. Pour le moment il n'existe pas de traitements ni vaccins spécifiques contre ces deux pathogènes, la prise en charge est de type symptomatique. Toutefois il existe un vaccin pour cheval contre WNV, autorisé uniquement aux USA (Ulbert, 2019; Kaiser and Barrett, 2019). Dans ce contexte, les seuls moyens d'enrayer des dynamiques épidémiques sont donc la surveillance et la lutte contre les vecteurs, pour limiter la transmission.

Lutte anti-vectorielle :

Les conséquences sanitaires ainsi que les nuisances associées aux moustiques ont conduit les populations humaines à tenter de contrôler la prolifération et l'abondance des vecteurs. Au cours de l'histoire, les moyens de luttes ont été déclinés sous plusieurs formes et leur développement a évolué en fonction des avancées scientifiques et techniques. Cette lutte anti-vectorielle (LAV) est une notion large, de la destruction directe à la prévention et la surveillance en amont, dans le but d'adapter les stratégies disponibles au contexte écologique et socio-économique environnant. Les méthodes peuvent utiliser des moyens physiques, chimiques, mais aussi biologiques et génétiques. Elles visent soit à réduire les populations de vecteurs, soit à diminuer leur capacité à transmettre les pathogènes.

La lutte physique comporte l'ensemble des méthodes visant à rendre les habitats défavorables au développement et à la survie des moustiques. Ces derniers peuvent être tournés vers l'élimination des gites larvaires au moyen de drainages ou de recouvrement des zones humides. Ces méthodes sont efficaces pour des espèces dont les gites de pontes sont facilement identifiables et modifiables, comme *Cx. pipiens* par exemple. C'est plus difficile pour des espèces comme *Ae. albopictus*, avec ses habitats de pontes plus petits et très dispersés en zone urbaine, même si certains sont facilement identifiables et peuvent être facilement éliminés (bacs de rétention d'eau, petits points d'eau temporaires, etc.). La lutte physique peut aussi être tournée contre les adultes, avec diverses méthodes de piégeages. Ces pièges visent à capturer les femelles en recherche d'hôtes pour leur repas sanguin (pièges à attractants, gaz carbonique ou molécules odorantes tels que l'acide lactique, l'octenol), ou celles en recherche d'un site de ponte (pièges pondoirs). Initialement utiles pour l'étude de la dynamique des populations de moustiques, ces pièges montrent une certaine capacité à limiter les nuisances dans des contextes publiques ou privés, si leur densité est suffisante. Une dernière forme de lutte physique consiste à éviter le contact entre les hôtes et les vecteurs, que ce soit par le port de vêtements longs, par l'utilisation de répulsifs, ou par l'utilisation de moustiquaires.

La méthode la plus répandue, et souvent la plus accessible, reste néanmoins l'*utilisation de biocides chimiques* (insecticides) pour cibler les larves ou les adultes. C'est au milieu du 20^{e} siècle que le domaine de la chimie organique a permis l'avènement de ces composés de synthèse issus de l'industrie de l'armement. Parmi les grandes familles chimiques aux propriétés insecticides, les organochlorés (OC) ont été développés à la fin des années 1930, les

organophosphorés (OP) dans les années 1940, les carbamates (CX) en 1960, puis les pyréthrinoïdes (PYR) dans les années 1970. Les insecticides d'intérêt en LAV ciblent principalement des protéines-clés du système nerveux des arthropodes: i) Les récepteurs GABA (codés par le gène *rdl*) sont les cibles des OC, des phénylpyrazoles et des isoxazolines ; ii) les canaux sodium voltage-dépendants (codés par le gène *vgsc*) sont les cibles des OC (DDT) et des PYR ; iii) l'acétylcholinestérase (codée par le gène *ace-1*) est la cible des OP et des CX ; iv) les récepteurs nicotiniques à l'acétylcholine (nAChR, codés par un groupe de plusieurs gènes codant pour les différentes sous-unités) sont les cibles des néonicotinoïdes. Ces biocides peuvent être utilisés comme larvicides (traitement des gîtes larvaires) ou adulticides (aspersion intradomiciliaire ou pulvérisations). Ils peuvent aussi être combinés à d'autres méthodes de lutte : au-delà de simples barrières physiques, vêtements et moustiquaires peuvent ainsi être imprégnés de certains de ces insecticides (PYR), devenant ainsi un moyen de LAV additionnel, individuel mais aussi communautaire dès lors qu'une majeure partie de la population en est dotée, pour diminuer la quantité de vecteurs. Cette LAV « hybride », mélangeant la lutte physique et biocide, est un atout majeur dans la lutte contre les épidémies, notamment dans les zones tropicales (Moustiquaires imprégnées d'insecticide, OMS 2002).

Parmi les autres méthodes de lutte, il existe les *méthodes génétiques*, qui ont deux objectifs : la réduction et/ou la modification des populations. L'idée ici est de rendre stérile ou de modifier le matériel génétique de lignées de moustiques qui seront ensuite relarguées dans les populations naturelles. La technique de l'insecte stérile (TIS) vise ainsi à réduire la population de vecteurs, via des lâchés de males stérilisés, irradiés ou OGM, afin qu'ils s'accouplent avec des femelles de populations naturelles qui ne produiront aucune descendance (FAO/IAEA. 2020. Guidelines for Irradiation of Mosquito Pupae in Sterile Insect Technique Programmes). Une autre approche est de sélectionner (croisement) ou de créer (OGM) des résistances au développement et à la multiplication des pathogènes chez les vecteurs. Parmi les méthodes innovantes de modification du génome, on trouve les éléments transposables ou l'utilisation de CRISPR Cas9 (Hammond *et al.*, 2017). Pour favoriser la diffusion de ces traits dans les populations, d'autres modifications génétiques peuvent être associées, permettant un forçage génétique (*gene drive*) et non une transmission mendélienne (Champer *et al.*, 2016).

Enfin la *lutte biologique* implique l'utilisation d'organismes vivants (dits auxiliaires) comme moyen de contrôle. Ce peut être des organismes tels que des poissons larvivores, comme *Gambusia affinis* (Chandra *et al.*, 2008) utilisé dans les régions rizicoles d'Indes (Das and Prasad, 1991), ou des copépodes (lutte contre la dengue en Asie). Ces moyens de luttes restent encore à

l'heure actuelle des mesures limitées et difficilement applicable à grande échelle. Le fait d'introduire de nouvelles espèces dans le milieu pour lutter contre les larves est un sujet à enjeux écologiques forts, pour éviter leur prolifération incontrôlée. La lutte biologique peut aussi passer par l'utilisation de microorganismes. C'est le cas de la technique de l'insecte incompatible (IIT) fondée sur l'utilisation de la bactérie endosymbiotique *Wolbachia*, naturellement présentes ou introduites artificiellement dans des populations de moustiques. Les *Wolbachia* présentes chez les mâles induisent une stérilité conditionnelle des femelles en qui en sont dépourvues ou qui portent des *Wolbachia* de lignée différente (incompatibilité cytoplasmique), qui peut être exploitée de façon similaire à la SIT pour réduire la densité des populations de moustiques (Flores and O'Neill, 2018; Sicard *et al.*, 2019). Comme on l'a vu plus haut, certaines lignées de *Wolbachia* peuvent aussi entrainer des diminutions de la compétence vectorielle des moustiques et donc des baisses de transmission de certains virus (ex. DENV), l'IC agissant comme un *gene drive* naturel, constituant ainsi une alternative biologique aux OGM. D'autres microorganismes utilisés comme biocides biologiques, de façon plus limitée à ce jour, sont les champignons entomopathogènes (Scholte *et al.*, 2004) ou les virus spécifiques d'insectes (VSI), tels que les Densovirus entomopathogènes. Utilisés en application sur des gites larvaires, ces VSI sont des alternatives innovantes aux biocides chimiques, avec une transmission horizontale et/ou verticale (Johnson and Rasgon, 2018). Par ailleurs, quelques études suggèrent qu'en modifiant ainsi le virôme, les interactions entre VSI et arbovirus pourraient limiter la transmission de ces derniers (Koh and Saleh, 2024).

La résistance aux insecticides

Historiquement, l'utilisation d'insecticides chimiques a souvent été la seule méthode disponible, accessible et effective, et le reste bien souvent encore aujourd'hui. Mais ces traitements insecticides, visant à réduire la nuisance et à freiner certaines progressions épidémiques, n'ont cessé d'exercer une pression de sélection sur les populations exposées, conduisant à l'augmentation de la fréquence des génotypes résistants au cours des générations (les individus sensibles meurent et ne transmettent donc pas leur patrimoine génétique). Les traitements insecticides deviennent donc de moins en moins efficaces au cours du temps.

La résistance aux insecticides est définie comme une modification génétique et héritable, physiologique ou comportementale, conduisant à une diminution de la mortalité engendrée par un insecticide donné. Elle peut être classée selon 4 grands mécanismes (**Figure 10**).

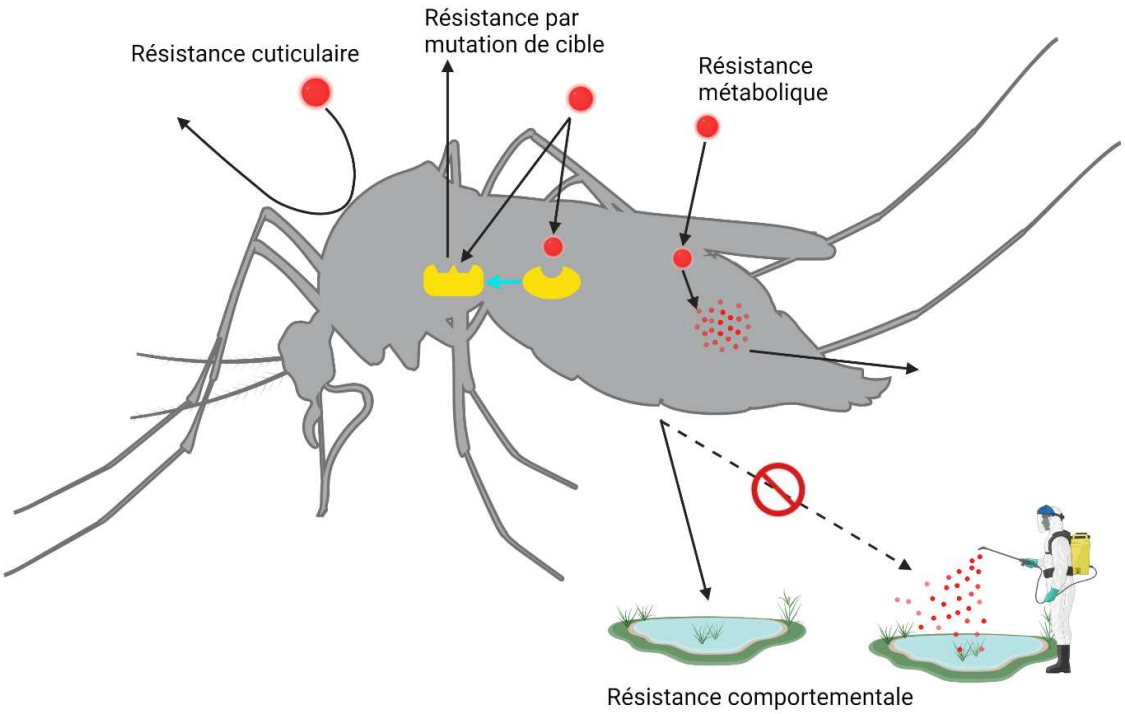


Figure 10 : Schéma récapitulatif des 4 grands mécanismes de résistance physiologique aux insecticides : les points rouges représentant les insecticides, en jaune les protéines cibles.

La *résistance cuticulaire* résulte de la modification (épaississement, constitution) de la cuticule des arthropodes, réduisant ainsi la pénétration des substances insecticides dans l'organisme. Les principaux mécanismes décrits sont liés à la surexpression de gènes impliqués dans la production de protéines et de transporteurs de la structure cuticulaire, ainsi que d'enzymes pléiotropes impliquées dans des mécanismes de détoxification/oxydation et dans la synthèse de la cuticule (Balabanidou *et al.*, 2018). Seul, ce type de résistance confère un niveau de résistance limité ; il est souvent couplé à des mécanismes de résistance métabolique comme décrit chez *Drosophila* (Strycharz *et al.*, 2013).

La *résistance comportementale* réside principalement sur l'évitement des zones traitées aux insecticides par les vecteurs. Ces comportements d'évitement des zones traitées sont difficiles à évaluer, et leurs déterminants restent à élucider. La part génétique, donc héritable, reste controversée ; ces comportements pourraient aussi être dus à de la plasticité phénotypique et à des comportements d'apprentissage, non héritables.

La *résistance physiologique* est due principalement à deux mécanismes, i) la résistance métabolique et ii) la résistance par modification de la cible.

- La *résistance métabolique* résulte de la surproduction d'enzymes de détoxication, dont le rôle est de séquestrer et/ou de dégrader les insecticides en métabolites moins toxiques et plus facilement éliminables par l'organisme. La résistance métabolique est probablement apparue il y a des millions d'années chez les arthropodes, en réponse aux éléments toxiques présents dans l'environnement, ou xénobiotiques, par exemple des composés de défenses synthétisés par les végétaux (Després *et al.*, 2007). Cette longue histoire co-évolutive a entrainé la sélection d'une grande diversité d'enzymes en réponse à une grande diversité de xénobiotiques naturels. Certains variants de ces enzymes permettent aussi la résistance aux insecticides, l'essentiel des allèles de résistance aux insecticides étant retrouvé dans trois familles d'enzymes. La plus nombreuse est celle des mono-oxygénases à cytochrome P450 (CYP), dont le rôle est notamment de catalyser l'hydroxylation des insecticides par ajout d'un groupement -OH. Parmi la multitude de gènes codant les CYP, les familles CYP6 et CYP9 représentent la majorité des gènes présentant des allèles de résistance décrits chez *An. gambiae*, *Ae. aegypti* et *Cx. quinquefasciatus* (revue par (David *et al.*, 2013)). Une seconde famille est celle des glutathion S-transférases (GST), qui catalysent l'addition d'un groupement hydrophile à la molécule insecticide. Pour les mécanismes liés aux GST, les

deux orthologues AgGSTE2 et AeGSTE2 retrouvés respectivement chez *An. gambiae* et *Ae. aegypti* permettent la déchloration du DDT (Ranson *et al.*, 2001; Lumjuan *et al.*, 2007). La dernière famille est celle des carboxylestérases (COE), qui catalysent l'hydrolyse des liaisons ester, retrouvées dans de nombreux xénobiotiques et plusieurs familles d'insecticides (OP, CX, PYR, etc.). Les deux locus *Est-2* et *Est-3*, associés au sein du superlocus *Ester*, ont été particulièrement étudiés pour le rôle de certains de leur allèles dans la résistance aux insecticides OP chez *Cx. pipiens* (Weill *et al.*, 2000; Milesi *et al.*, 2016). La résistance métabolique est généralement quantitative, et due à la surproduction de ces enzymes. Cette surproduction est le plus souvent constitutive, *i.e.* déterminée génétiquement, souvent par des variations du nombre de copies des gènes codant pour ces enzymes (ou CNV, voir plus bas), mais dans certaines situations l'environnement prend une place importante, *i.e.* plasticité. C'est le cas lors de l'exposition à certains polluants comme des hydrocarbures, des herbicides ou des métaux lourds, puisque ces substances induisent également la surproduction des enzymes impliquées dans la détoxication. On parle dans ce cas plutôt de tolérance que de résistance, mais ces deux phénomènes sont sélectionnés par les insecticides chimiques utilisés en LAV et contre les nuisances.

- Par contraste, la résistance par <u>*modification de cible*</u> est généralement plus qualitative, *i.e.* la conséquence d'une mutation qui entraine une modification de la conformation de la protéine ciblée par les insecticides. Cette mutation réduit l'affinité de l'insecticide qui ne peut plus agir sur sa cible. Ces mécanismes sont souvent liés à un nombre très limité de mutations, car celles-ci doivent entrainer une insensibilité à l'action des insecticides sans affecter les fonctions normales des enzymes ciblées (souvent choisies pour leur rôle fondamental dans la survie de l'insecte et donc sous très forte sélection purifiante). Bien que ces mutations ponctuelles donnent un avantage sélectif en milieu traité, elles réduisent souvent la valeur sélective (ou *fitness*) des mutants par rapport aux individus sensibles en absence de traitements insecticides. Elles résultent donc en un compromis évolutif ou *trade-off* entre résistance et compétitivité, le génotype favorisé dépendant alors des conditions environnementales (Milesi *et al.*, 2016). On trouve des allèles de résistance pour chacun des principaux locus codant pour les protéines cibles des insecticides, notamment *rdl*, *vgsc* et *ace-1*. Un des exemples les plus étudiés chez *Cx. pipiens* est la mutation G119S sur le gène *ace-1,* qui modifie le site de liaison de la molécule insecticide pour sa cible, l'acétylcholinestérase (Weill *et al.*, 2004).

Au-delà des simples mutations ponctuelles, des modifications structurales, en particulier des variations dans le nombre de copies des gènes (*copy number variants* ou CNV) ont souvent un rôle important dans la résistance aux insecticides. Ces CNV peuvent être le résultat de duplications multiples, ou amplifications, d'un unique allèle présent à un locus donné (le nombre de copies est alors souvent très dynamique dans une population donnée). On parle alors de *duplications homogènes*, sélectionnées pour des avantages quantitatifs dus à une production accrue de protéines. Elles sont très fréquentes dans le cas des résistances métaboliques, ex. pour les CYP ou les COE (Raymond *et al.* 1998). On trouve par exemple des allèles présentant de multiples copies *Ester*, jusqu'à 80 parfois, pour la résistance aux OP (Weill *et al.*, 2000). On trouve également des copies multiples des locus codant pour les cibles des insecticides, en particulier des copies multiples des allèles de résistance. Par exemple, des duplications homogènes du locus (*ace-1*^{Rx}) trouvées chez *Cx. pipiens* ou *An. gambiae* entrainent une augmentation de la résistance proportionnelle au nombre de copies (Assogba *et al.*, 2016a; Milesi *et al.*, 2017a). Il existe cependant pour ces locus-cibles un second type de duplications, dites *duplications hétérogènes*. Il s'agit de duplications associant des allèles différents du locus, une copie sensible et une copie résistante (Labbé *et al.*, 2007a). Ces duplications peuvent être sélectionnées dans des zones où les traitements favorisent les hétérozygotes (alternance spatiale ou temporelle d'absence/ présence de traitements insecticides) (Labbé *et al.*, 2007a, 2014; Assogba *et al.*, 2016a; Milesi *et al.*, 2018). Elles permettent en effet de fixer ce phénotype superdominant et de produire de façon constitutive différents variants de la même protéine (elles ne sont pas affectées par le coût de ségrégation associé aux hétérozygotes ;(Milesi *et al.*, 2016)). Les deux copies remplissent des caractéristiques différentes avant la fixation, mais peuvent ensuite diverger et se spécialiser davantage.

Il existe donc une grande variété d'architectures génétiques, résultant en différent compromis évolutifs, qui permettent aux moustiques une adaptation fine aux conditions locales de traitements insecticides (intensité, fréquence, etc.).

Un dernier point important est que ces différentes résistances, métaboliques et modifications de cibles, sont souvent trouvées dans un même individu ; on parle alors de multirésistance (Assogba *et al.*, 2014). De plus, un même individu peut parfois avoir des phénotypes de résistances contre plusieurs familles d'insecticides à partir d'un seul mécanisme de résistance, on parle alors de résistance croisée.

La résistance, mais à quel prix ? et quel impact sur la transmission ?

Comme indiqué plus haut, les allèles de résistance aux insecticides ont généralement des effets délétères sur différents traits d'histoire de vie chez leurs porteurs. S'agissant d'insectes vecteurs, ils peuvent donc aussi impacter la transmission de différents pathogènes.

Dans le cas de la mutation ponctuelle *ace-1* G119S, la protéine mutée présente une activité réduite par apport à la protéine sensible (Alout *et al.* 2008). Cette réduction d'activité AChE est très probablement la cause directe des performances moindres observées pour les insectes résistants en termes d'activité motrice des larves, de développement des individus (Raymond *et al.*, 2001), mais aussi pour la reproduction (Berticat *et al.*, 2002). Un des traits majeurs également affectés par la résistance est la survie des vecteurs, qui est elle-même un élément-clé de la capacité vectorielle (**Eq. 1**). Nous l'avons vu précédemment, la réduction de la survie journalière des individus a des conséquences directes particulièrement fortes sur la réduction de la capacité vectorielle (**Tableau 1**). Plusieurs études montrent ainsi, en absence d'insecticide, une diminution de la survie des individus porteurs de l'allèle *ace-1* 119S, au stade pré-imaginal (Berticat *et al.*, 2008) comme à l'état adulte (Agnew *et al.*, 2004; Vézilier *et al.*, 2012). Ces résultats issus d'expérimentations contrôles, c'est-à-dire sans infections préalables, sont à contraster avec ceux provenant d'individus ayant été infectés par un pathogène des résultats ont au contraire, montrés une modération de certains coûts associés aux allèles de résistances, par rapport à des souches sensibles exposées elles aussi (exemple pour *Cx. pipiens* infecté par *P. relictum* (Vézilier *et al.*, 2012).

De la même façon, les architectures génomiques complexes telles que les duplications sont aussi à l'origine d'effets délétères. Dans le cas de duplications homogènes, la surexpression de l'allèle résistant est souvent associée à une réduction de la valeur sélective des individus porteurs par rapport à des génotypes sensibles en absence d'insecticides. Par exemple, la surproduction d'estérases détoxifiantes, avec parfois jusqu'à 80 copies des allèles du locus *Ester*, entraine un coût énergétique pouvant impacter négativement (et proportionnellement au nombre de copies) la physiologie des vecteurs (Rivero *et al.* 2011). On retrouve des effets similaires pour les duplications homogènes affectant le locus *ace-1* chez *An. gambiae* et *Cx. pipiens* (Assogba *et al.* 2016, Milesi et al, 2022). Par contraste, les duplications hétérogènes présentent des effets négatifs en général nettement plus modérés: l'association d'allèles sensibles et résistants tend au contraire à limiter les impacts sur les traits d'histoire de vie qu'on observe chez les porteurs des seuls allèles résistants (Labbé *et al.*, 2014).

Finalement, la sélection de plusieurs mécanismes de résistance peut avoir des effets négatifs cumulatifs, mais aussi parfois des synergies positives: les individus porteurs des deux mutations *ace-1* G119S et *kdr* L1014F présentent par exemple une valeur sélective plus élevée que les individus porteurs d'une seule d'entre elles (Berticat *et al.*, 2008).

On comprend donc aisément qu'en affectant les traits d'histoire de vie des moustiques résistants, en particulier leur survie, tous ces différents allèles de résistance sont susceptibles de modifier la compétence et la capacité vectorielle des populations de vecteurs, et par là les cycles de transmission des pathogènes. Peu d'études se sont intéressées à cette question de l'interaction résistance/transmission, et elles portent essentiellement sur le système vectoriel *Anopheles*/*Plasmodium* (Alout *et al.*, 2013, 2016). Il existe également une étude chez Cx. pipiens qui montre que la compétence vectorielle pour le virus West Nile et le virus de la fièvre de la vallée du Rift est impactée par la résistance (Atyame *et al.*, 2019). Ma thèse s'inscrit dans la continuité de ces travaux, et j'ai cherché à avoir une approche la plus intégrative possible de cette question.

Objectifs de cette thèse :

J'ai au cours de mon doctorat tenté de combiner deux sujets d'études particulièrement complexes, i) les mécanismes de résistance aux insecticides, avec leurs architectures génomiques diversifiées ainsi que les impacts variés de leurs expressions sur les performances de leurs porteurs, et ii) les interactions entre des vecteurs et des pathogènes viraux, et leurs impacts sur l'épidémiologie. L'objectif général de ces travaux était ainsi de caractériser les effets des allèles de résistance sur la relation vecteur-pathogène, et d'en comprendre les mécanismes, *i.e.* de rajouter une couche supplémentaire de complexité à ces systèmes déjà impactés par de nombreux autres facteurs biotiques ou abiotiques.

La thèse que vous avez entre les mains vise à synthétiser les résultats obtenus dans cette entreprise. Elle se compose de deux grands chapitres :

Dans le premier chapitre, je rapporte d'abord comment j'ai commencé par tenter de mieux comprendre les systèmes vectoriels modèles que j'avais choisi, le vecteur *Cx. pipiens* et les arbovirus USUV et WNV. En effet, la plupart des études se contentent d'une colonie de moustique et d'une lignée de virus. Puisque j'envisageais d'étudier des variants résistants chez le moustique, *i.e.* une diversité adaptative, il m'a semblé crucial d'évaluer aussi l'impact de la diversité génétique non-adaptative des virus et des vecteurs sur la capacité vectorielle. Je rapporte donc dans un premier temps mes études sur les différences de transmission et de virulence de plusieurs lignées USUV chez *Cx. pipiens s.s.* Dans un second temps, j'ai étudié la corrélation entre phénotypes d'infection et génotypes de résistances. Enfin, j'ai étudié l'impact des différents allèles de résistance sélectionnés au locus *ace-1* sur la transmission de USUV et WNV, grâce à l'utilisation de plusieurs colonies isogéniques de *Cx. quinquefasciatus*.

Le second chapitre décrit comment j'ai ensuite cherché à identifier les mécanismes affectés par ces diversités (adaptatives ou non), et donc à comprendre les différentes réponses à l'exposition au virus observées chez les individus testés. Pour cela, j'ai changé d'échelle : en utilisant une approche transcriptomique, j'ai exploré quels gènes pouvaient avoir un impact sur la compétence vectorielle des colonies en fonction, notamment de leur résistance, ainsi que les processus biologiques dans lesquels ces gènes sont impliqués.

Enfin, je termine le manuscrit par une discussion générale sur l'ensemble de ces travaux, et les perspectives qui s'ouvrent pour la suite de ces études. Je replace notamment mes résultats dans un contexte épidémiologique afin d'évaluer l'impact global des adaptations des vecteurs aux

insecticides sur la dynamique des arbovirus au sein des systèmes vectoriels, dans une approche intégrative de type OneHealth. Dans les perspectives à donner à ces travaux, je rapporte l'importance de considérer la diversité génétique des populations virales au cours de l'infection du moustique. La multiplication des particules virales lors de l'infection et les barrières physiologiques et immunitaires auxquelles elles sont soumises, entraine la génération de toute une nouvelle diversité de cette population du virus (mutation). Et là-encore, seule une partie de cette diversité sera transmise par le vecteur (goulot d'étranglement). A l'avenir je chercherai à déterminer si la résistance du vecteur pouvait elle aussi influencer cette possible sélection, en comparant des colonies de *Culex* fixées pour différents allèles.

Chapitre I : Influence des facteurs génétiques du virus

Comme décrit en introduction, la compétence vectorielle est un des paramètres importants de la capacité vectorielle, et cette compétence peut être affectée par de nombreux facteurs, intrinsèques comme extrinsèques (voir Introduction « Risques en santé humaine et vétérinaire, la notion de capacité vectorielle »). J'ai orienté mes travaux de recherche sur l'analyse d'un de ces facteurs en particulier : j'ai cherché à comprendre comment les variations génétiques au sein des populations, de vecteurs comme de virus, peuvent affecter la compétence vectorielle, et plus largement la transmission, directement et indirectement, et en particulier via la survie des vecteurs, dont on a vu le rôle prééminent dans la capacité vectorielle. Ce chapitre sera donc divisé en deux parties, la première traitant de l'impact de la variation génétique des arbovirus, avec l'exemple d'USUV, et la seconde de l'impact de la variation génétique du moustique vecteur, notamment avec l'exemple des allèles de résistance aux insecticides.

Capacité vectorielle de *Cx. pipiens* pour deux lignées du virus Usutu

La classification en différentes lignées virales au sein d'une espèce de virus est réalisée à partir de différences génétiques importantes et conservées observées dans leurs séquences. Des études préalables sur USUV ont montré que certaines de ces mutations pouvaient aussi être associées à des différences de réplication et de virulence chez les hôtes infectés (Clé *et al.*, 2021), mais il est possible que de telles différences soient observables chez le vecteur. J'ai donc mené une première étude visant à mesurer la différence de virulence et de transmission de deux lignées virales du virus Usutu au sein d'une même souche de *Cx. pipiens*.

Nous avons choisi d'étudier deux lignées USUV EU2 et EU3, parmi les plus prévalentes en Europe (Vilibic-Cavlek *et al.*, 2020). En effet, une étude précédente a montré qu'elles différaient en termes de sensibilité à l'infection, de réplication et de virulence chez les hôtes vertébrés: sur modèle murin et sur cellules humaines, la lignée EU2 se réplique ainsi plus rapidement et à des niveaux plus importants que la lignée EU3, et entraine une mortalité supérieure et plus précoce que EU3 (Clé *et al.*, 2021). Puisque ces lignées affectent différemment les vertébrés, j'ai voulu savoir si cette différence de virulence était aussi associée à une différence de transmission aux vecteurs, et si cette différence de mortalité induite était reproduite chez les vecteurs infectés.

Des études théoriques (Ciota and Kramer, 2010) suggèrent en effet qu'il devrait exister différents compromis évolutifs entre les compartiments hôtes vertébrés et vecteurs arthropodes: 1) on peut ainsi attendre un compromis sur la réplication virale, une meilleure adaptation du virus à i) son hôte vertébré se faisant potentiellement au détriment de son adaptation à ii) son vecteur ; 2) on peut aussi attendre un compromis entre i) la virulence, i.e. la réplication au sein d'un hôte et la pathogénicité qu'elle entraine, notamment en termes de mortalité, et ii) la transmission, *i.e.* la circulation à l'échelle de la population d'hôte/vecteur, donc du système vectoriel (Anderson and May, 1982). Les compartiments hôtes vertébrés et vecteurs arthropodes du cycle de transmission des *Flavivirus* diffèrent en effet sur de nombreux aspects : voies immunitaires différentes, régulation de la température (endotherme vs ectotherme), régime alimentaire, etc. Or les arbovirus doivent, sous peine d'interruption des chaines de transmission, pouvoir se répliquer efficacement dans ces deux hôtes, c'est-à-dire produire un nombre de virions suffisant pour passer successivement d'un compartiment à l'autre. De même, si cette réplication est trop importante, elle peut devenir délétère pour l'hôte, et là-encore interrompre prématurément la transmission. Comme la virulence chez un hôte/vecteur est dépendante de l'impact de la multiplication des virions chez l'hôte, on comprend que plus il y a de virions plus la probabilité de transmission est grande, mais plus la virulence augmente aussi, ce qui diminue cette probabilité de transmission, notamment si la virulence augmente la mortalité de l'hôte/vecteur : on attend donc un optimum de transmission entre réplication et virulence. Des travaux ont ainsi montré l'existence de tels compromis chez des pathogènes à transmission directe ou vectorielle (Alizon and van Baalen, 2008; Alizon *et al.*, 2009). Il a ainsi été montré que certains pathogènes non-viraux transmis par les moustiques pouvaient réduire la longévité des moustiques infectés et, par conséquent, réduire fortement leur capacité vectorielle (Alout *et al.* 2016).

Dans ces premiers travaux, j'ai donc examiné ces compromis dans le contexte d'une arbovirose : 1) comme le cycle de transmission des arbovirus implique l'infection d'hôtes arthropodes et vertébrés, il est possible que l'adaptation à l'un des hôtes affecte négativement l'adaptation à l'autre, et 2) si certains variants de ces arbovirus se révèlent entomopathogènes à certaines doses, on attend un compromis virulence/transmission. J'ai donc cherché à déterminer si de tels compromis existent dans le système vectoriel *Cx. pipiens*/USUV/hôte vertébré.

Matériel et méthode :

Toutes les expérimentations et analyses sont présentées en détails dans l'article 1 en annexe. Ici, je ne décrirais que les procédures des infections expérimentales qui ont été mises en œuvre tout au long de mes travaux.

Nous avons réalisé des infections expérimentales sur une colonie de *Cx. pipiens* avec les lignées EU2 ou EU3 de USUV. Nous avons fourni aux moustiques un repas sanguin infectieux comportant pour une part des titres initiaux « Fort » en virus (10^6 $TCID_{50}$/mL) et d'autre part un titre « Faible » ($10^4 TCID_{50}$/mL). Ces deux valeurs d'inoculum ont été choisi dans le but d'étudier si la réponse du vecteur différait en fonction des conditions d'infections. En outre, ces valeurs reflètent la gamme des virémies retrouvées chez des hôtes aviaires pour WNV (Komar *et al.*, 2003; Allison *et al.*, 2004): elles nous ont donc servi de référence pour USUV, en nous appuyant sur le fait que ces deux virus sont très proches, phylogénétiquement comme en termes de systèmes vectoriels.

Nous avons ensuite trié et suivi les femelles gorgées sur une période d'incubation extrinsèque de 14 jours, en conditions contrôlées dans des enceintes climatiques. La mortalité a été régulièrement relevée, et les individus morts ont été conservés. A la suite des 14 jours, la salive a été récupérée sur les individus vivants, dont l'abdomen et le thorax ont été ensuite disséqués. L'infection est mesurée par la détection et la quantification de l'ARN viral, réalisée par RT-qPCR (Nikolay *et al.*, 2014). La détection de virus a également été réalisée dans le corps entier des individus morts durant les 14 jours, afin de définir le statut d'infection des individus au moment de leur mort.

Résultats :

Une première observation est la forte variabilité entre les réplicas d'infection. Cela démontre, si cela était encore nécessaire, l'importance de la réplication des expériences : on ne peut pas se contenter d'une seule infection, quel que soit le nombre de moustiques disséqués ensuite, car on observe une forte hétérogénéité des résultats pour une même lignée virale. Pourtant, on lit encore trop souvent dans la littérature des études basées sur une seule infection. Si les ressources matérielles et techniques sont disponibles (colonies stables en insectarium, disponibilité des stocks viraux) répliquer ces expérimentations est une nécessité indiscutable.

Malgré cette hétérogénéité entre réplicas, nous avons mis en évidence des différences entre les deux lignées virales dans leurs performances lors de l'infection du vecteur. Nous avons ainsi montré une efficacité de transmission (TE) significativement plus forte pour EU3 par rapport à EU2 pour des titres initiaux forts dans le sang. Concernant la charge virale dans les tissus, la lignée EU2 se réplique de manière similaire pour les deux titres dans les tissus de l'abdomen et du thorax, mais est significativement plus forte dans la salive si l'on augmente le titre dans le sang. La charge virale de la lignée EU3 est fortement influencée par le titre viral : si le titre dans le sang augmente, la charge virale dans les tissus augmente significativement. Enfin, un résultat majeur est que les courbes de survie montrent une réduction de la survie des moustiques après l'exposition à un repas sanguin infectieux[1] par rapport aux groupes contrôles, suggérant que les lignées de USUV sont virulentes pour les moustiques. Néanmoins, cette virulence de EU2 est significative seulement lorsque le titre viral est fort, alors que la virulence de EU3 est importante quel que soit le titre viral. Par ailleurs, la survie est significativement réduite chez les individus positifs à l'infection pour la lignée EU3 (i.e. montrant une amplification en RT-qPCR), mais aussi chez les individus négatifs (i.e. exposés mais pas infectés) ce qui suggère que la seule exposition au virus (et potentiellement la lutte immunologique qu'elle peut entrainer) peut aussi affecter la survie des moustiques.

Conclusions :

Cette étude illustre comment des facteurs génétiques viraux peuvent influencer la compétence vectorielle et les traits d'histoire de vie, en particulier la survie, des vecteurs. Les infections réalisées avec deux lignées de USUV, se distinguant par une virulence et une réplication différente chez les hôtes murins, ont montré aussi des effets différents chez les vecteurs arthropodes. Quand on la compare à la lignée EU3, la lignée EU2 est en même temps

[1] NB : Dans ce manuscrit nous dissocierons la notion « d'infection » et « d'exposition »: nous parlerons d'infection pour les individus ayant ingéré un repas sanguin infectieux et qui possèdent a minima un abdomen positif à l'infection; nous parlerons seulement d'exposition pour les individus ayant ingéré un repas sanguin infectieux, mais sans que des virus soient retrouvés postérieurement dans leurs différents tissus.

significativement plus mortelle chez la souris, et significativement moins mortelle chez le moustique *Cx. pipiens*. Néanmoins cette lignée se réplique relativement plus dans les deux compartiments. Par ailleurs, la lignée EU3 induit une mortalité supérieure même pour les individus vecteurs exposés mais n'ayant pas développé d'infection détectable. La réplication de EU3 chez le moustique semble pourtant moins efficiente, car elle est dépendante du titre viral.

Globalement, ces résultats suggèrent que des facteurs génétiques viraux différents entre EU2 et EU3 peuvent avoir une influence majeure sur la capacité vectorielle. Cela se manifeste en particulier par une virulence « inversée »: la lignée la plus virulente chez la souris (EU2) est la moins virulence chez *Cx. pipiens*, et la moins virulente chez la souris (EU3) entraine une surmortalité significative chez *Cx. pipiens*. Cette surmortalité induite par la lignée virale EU3 devrait en particulier entrainer une baisse de sa transmission, car le vecteur meurt de manière plus précoce.

Ces résultats suggèrent enfin l'existence d'un compromis entre les différents compartiments du cycle de transmission, conformément aux attendus théoriques. En tenant compte de l'ensemble du cycle de transmission avec les hôtes et les vecteurs, et de l'impact de l'infection par ce virus, nous illustrons par ces travaux la complexité de ces systèmes, et renforçons la nécessité de les considérer dans un ensemble afin de guider nos recherches.

Les résultats de cette étude ont été présenté au congrès « Vector Kolymbari Meeting 2024 » (poster) et ont été publiés dans le journal PLoS NTD en juillet 2024.

Article 1 : Virulence and transmission vary between Usutu virus lineages in *Culex pipiens*. (PLoS NTD, 2024)

PLOS NEGLECTED TROPICAL DISEASES

RESEARCH ARTICLE

Virulence and transmission vary between Usutu virus lineages in *Culex pipiens*

Maxime Prat[1,2], Mélanie Jeanneau[2], Ignace Rakotoarivony[2], Maxime Duhayon[2], Yannick Simonin[3], Giovanni Savini[4], Pierrick Labbé[1], Haoues Alout[2]*

1 Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, Université de Montpellier-CNRS-IRD, Montpellier, France, **2** UMR ASTRE, Univ Montpellier, INRAE-CIRAD, Montpellier, France, **3** Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Université de Montpellier-INSERM-EFS, Montpellier, France, **4** OIE Reference Centre for West Nile Disease, Istituto Zooprofilattico Sperimentale "G. Caporale", Teramo, Italy

* haoues.alout@inrae.fr; haoues.alout@cirad.fr

Check for updates

OPEN ACCESS

Citation: Prat M, Jeanneau M, Rakotoarivony I, Duhayon M, Simonin Y, Savini G, et al. (2024) Virulence and transmission vary between Usutu virus lineages in *Culex pipiens*. PLoS Negl Trop Dis 18(6): e0012295. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295

Editor: Mariangela Bonizzoni, Universita degli Studi di Pavia, ITALY

Received: January 29, 2024

Accepted: June 14, 2024

Published: June 27, 2024

Peer Review History: PLOS recognizes the benefits of transparency in the peer review process; therefore, we enable the publication of all of the content of peer review and author responses alongside final, published articles. The editorial history of this article is available here: https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295

Copyright: © 2024 Prat et al. This is an open access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Data and scripts are available at https://zenodo.org/records/11093366?oken=eyJhbGciOiJIUzUxMiIsImlhdCI6MTcxNDQ4NDY2MiwiZXhwIjoxNzI1MTQ4Nzk5fQ.eyJpZCI

Abstract

Usutu virus (USUV) is a zoonotic arbovirus infecting mainly wild birds. It is transmitted by ornithophilic mosquitoes, mainly of the genus *Culex* from birds to birds and to several vertebrate dead-end hosts. Several USUV lineages, differing in their virulence have emerged in the last decades and now co-circulate in Europe, impacting human populations. However, their relative transmission and effects on their mosquito vectors is still not known. We thus compared the vector competence and survival of *Culex pipiens* mosquitoes experimentally infected with two distinct USUV lineages, EU2 and EU3, that are known to differ in their virulence and replication in vertebrate hosts. Infection rate was variable among blood feeding assays but variations between EU2 and EU3 lineages were consistent suggesting that *Culex pipiens* was equally susceptible to infection by both lineages. However, EU3 viral load increased with viral titer in the blood meal while EU2 viral load was high at all titers which suggest a greater replication of EU2 than EU3 in mosquito. While their relative transmission efficiencies are similar, at least at low blood meal titer, positive correlation between transmission and blood meal titer was observed for EU3 only. Contrary to published results in vertebrates, EU3 induced a higher mortality to mosquitoes (i.e. virulence) than EU2 whatever the blood meal titer. Therefore, we found evidence of lineage-specific differences in vectorial capacity and virulence to both the vector and vertebrate host which lead to balanced propagation of both viral lineages. These results highlight the need to decipher the interactions between vectors, vertebrate hosts, and the diversity of arbovirus lineages to fully understand transmission dynamics.

Author summary

Usutu virus is a zoonotic arbovirus that emerged in the last decades in Europe, impacting wild bird and human populations. Several co-circulating USUV lineages differ in their virulence to vertebrate hosts but their relative transmission and effects on their mosquito vectors is still not known. We compared the vector competence and survival of *Culex pipiens* mosquitoes experimentally infected with two distinct USUV lineages. We showed

6IjJiYjhhZThjLTE4NTgtNGQyZS1iZDBkLThlMTllZTRmYTgzMSIsImRhdGEiOnt9LCJyYW5kb20iOiI0YTgyNDYzYThmYmNjNzRhMTdjNjk0OTkzMGE4NzVmNCJ9.tXk_mfDPknpzN_n0lBrg4DCMMqggEvJGmCdPB8QJ5i7TzLeAHX7nG_Swi-9F20fxMFuK9kM1Xj8SK9lv8A-UEg.

Funding: This work has been funded in part by the ANR PRC "ArchR" ANR-20-CE34-0007 (2021-2024) to PL and HA. PhD fellowship to MP has been funded by the ANR PRC "ArchR" ANR-20-CE34-0007 and the Animal Health department of INRAE. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

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

that their relative transmission efficiencies are similar but EU3 was more virulent to mosquitoes than EU2. In addition to published results, we revealed lineage-specific differences in vectorial capacity and virulence to both the vector and the vertebrate host suggesting that propagation of both viral lineages might be balanced. Our study provides new insights into the transmission of an emerging arbovirus and highlights the need to investigate the interactions between vectors, vertebrate hosts, and the diversity of arbovirus lineages to fully understand transmission dynamics.

Introduction

Usutu Virus (USUV) is a mosquito-borne flavivirus (family: *Flaviviridae*, genus: *flavivirus*) and is part of the Japanese encephalitis serocomplex with other phylogenetically related virus like Yellow Fever virus (YFV), Japanese Encephalitis virus (JEV) and West Nile virus (WNV). It was first identified in 1959 [1] along the Usutu River in Swaziland. Like WNV, USUV is maintained in a transmission cycle involving wild birds and ornithophilic mosquitoes, mainly of the genus *Culex* [2]. There have been recurrent outbreaks of USUV among birds with a few instances of spillover into humans and other mammals in several European countries since its emergence in 1996 in Italy [3,4]. These outbreaks were characterized by high mortality rates in passeriform and strigiform birds, with some species, such as blackbirds (*Turdus merula*), being particularly affected. Infections in other animals have been reported, including bats of the genus *Pipistrellus* [5], dogs [6,7], ruminants [8], wild boar [9], shrews and rodents [10], horses [11,12,13], and humans [2,4]. However, infections in these non-avian hosts are likely not transmissive (dead-end hosts) as for West Nile virus [14].

Flavivirus RNA genomes experience high mutation rates, which may facilitate rapid adaptation to new environments with potentially new hosts and new vectors [15]. As population sizes increase and the virus becomes more widespread, there is a greater likelihood of fitness-enhancing mutations furthering spread within and across continents. Such adaptation may directly and indirectly affect patterns of viral transmission, virulence, and host specificity. Phylogenetic studies have shown that USUV isolates can be divided into eight lineages: five European lineages (EU1 to EU5) and three African lineages (AF1 to AF3) [16]. Many of these lineages have been found co-circulating in Europe (i.e., EU1, EU2, EU3, EU5, AF2, and AF3). EU2 is the most detected lineage in mosquitoes, birds, and humans in central and southern Europe, while EU3 is the most prevalent in northern Europe [4,17]. Analyses of viral pathogenesis in mice and human cell culture revealed significant variation in virulence among-lineage: EU2 lineage appeared to be the most virulent, as it was more pathogenic to mice and replicated more efficiently and persistently in human neuronal cells [18] while AF2 and EU3 lineages appeared to be the least virulent [18,19].

Vectorial capacity is defined as the transmission potential of a vector population and depends on both ecological (vector density m, daily host biting rate a, daily survival rate p) and biological traits (vector competence c', Extrinsic Incubation Period or EIP n), as summarized in Eq 1 [20,21]:

$$C = \frac{m a_1 a_2 p^n c'}{-\ln p} \quad (1)$$

Eq 1. Vectorial capacity equation for multi-host transmission. Parameters are vector density m, daily host biting rate a (a_1 *is the biting rate on one host;* a_2 *on another host)*, daily survival rate p, vector competence c', and Extrinsic Incubation Period n.

These traits are themselves affected by environmental factors (temperature, humidity, chemical exposure) modulating vector-borne transmission. Assessing vectorial capacity is critical for understanding transmission dynamics and, managing and controlling arbovirus transmission.

Vector competence defines the intrinsic ability of mosquitoes to transmit pathogens—from feeding on an infected host to transmission to a new host, thus including within-vector viral replication and dissemination up to the salivary glands. Competent mosquitoes will acquire virus from an infected host and later transmit the virus to other susceptible birds, or other animals, including humans. Entomological surveillances have reported USUV infections in several ornithophilic mosquitoes, mainly of the *Culex* genus but also in *Culiseta annulata*, *Anopheles maculipenis*, *Aedes spp*, *Mansonia spp*, and *Ochlerotatus spp* [3]. However, their role as vector for USUV has only been demonstrated in four *Culex* species: *Cx. neavi*, *Cx. pipiens* (biotypes *pipiens* and *molestus*), *Cx. quinquefasciatus*, and *Cx. torrentium* [22,23].

Environmental, genetic, symbiotic, and ecological factors may affect the likelihood of disease transmission by vectors, but genetic factors in the arboviruses themselves may also play a significant role. Given the significant pathogenic difference on vertebrate hosts among USUV lineages, it is important to consider whether similar difference is observed in how these lineages interact with and are transmitted by their vectors. We considered this question within the context of the virulence-transmission tradeoff hypothesis. The hypothesis posits that while highly replicating viruses may be transmitted more readily, they risk killing the host before transmission can occur. Thus, natural selection might favor viruses that balance high transmission and host mortality, resulting in intermediate levels of virulence [24–26]. Evidence of virulence-transmission tradeoffs has been suggested for rodent malaria [27], Schistosoma [28], and myxoma [27], although more data is needed to confirm their generality [28]. There is some evidence that mosquito-borne pathogens can reduce the longevity of infected mosquitoes [29] and, therefore, their vectorial capacity, which calls into question whether the virulence-transmission tradeoff is also important in the vector. Additionally, because the transmission cycle of arboviruses involves the infection of arthropod and vertebrate hosts, arboviruses may face an additional tradeoff if adaptation to one of the hosts negatively affects adaptation to the other [30].

Here, we investigated the relative vectorial capacity for two USUV lineages (EU2 and EU3), which differ significantly in their virulence in the vertebrate host. Throughout the 14 days of extrinsic incubation period [31], we measured daily mortality, viral load, and infection prevalence in diverse tissues of *Cx. pipiens* biotype *pipiens* mosquitoes (hereafter named *Cx. p. pipiens*) following infectious blood meals containing high or low viral titers to better characterize *Culex*-USUV interactions. We tested a 100-fold variation of viral titer reflecting the variation of replication of EU2 and EU3 linages in vertebrate host [18]. Our analyses allowed us to test for differences between lineages in transmission and mortality as well as the relationship between these traits within the mosquito and compared to patterns observed in the vertebrate host.

Materials and methods

Mosquito lines

Culex p. pipiens larvae were collected in September 2021 from ponds in a protected natural area of the Camargue at La Tour du Valat (https://tourduvalat.org/, coordinate: 43.509297, 4.668958) and maintained in the insectarium. PCR of the polymorphic Cq11 microsatellite [32] was used to confirm that mosquitoes belong to the biotype *pipiens*. The *C. p. pipiens* larvae and adults were raised in a secured insectarium (Baillarguet insectarium platform,

Montpellier) at 27±1˚C, 65±8% relative humidity, and a 14h light/10h dark photoperiod. After egg-hatching, approximately 500 larvae per tray were randomly dispatched into three to five plastic trays containing 1 liter of tap water and fed with Tetramin fish granules. At emergence, adults were fed *ad libitum* with a 5% honey solution and maintained in 30x30x30 cm cages. The day before blood feeding, mosquitoes were starved by removing the honey solution.

Viral strains

Two USUV isolates were used, the first belonging to the Europe 2 lineage (EU2, Accession Number [AN]: MT784899) and the second to the EU3 lineage (AN: KX601690) [33]. They were isolated after three passages on VERO cells (ATCC CCL-81) and one on C6/36 cells (ATCC CRL-1660). All virus stocks were then amplified on Vero cells in MEM media, and the supernatants stored at -80˚C until experimental infections. EU2 and EU3 virus stocks were titrated to $10^{7.2}$ $TCID_{50}$/mL and $10^{6.8}$ $TCID_{50}$/ml, respectively (Tissue Culture Infectious Dose 50), using the SpearmanKärber method [34].

Infection by membrane feeding assay

Infectious blood feedings were carried out with 5- to 8-day-old females who had not previously taken a blood meal. The day before the infectious blood meal, small cages (15x15x15 cm) containing approximately 200 females were placed in climatic chambers in the BSL3 laboratory (BioSecurity Level 3) with the same constant environmental conditions as the insectarium but no access to the honey solution. On the day of infection, 2 ml of infectious blood was prepared by mixing 1.5 ml of heparinized turkey blood, 0.5 mM ATP as a phagostimulant [35], and 500 μl of MEM containing virus at a final titer of 10^4 $TCID_{50}$/ml (low titer) or 10^6 $TCID_{50}$/ml (high titer). Mosquitoes were allowed to feed on infectious blood using a Hemotek system at 37˚C for 3 hours in darkness. Control females were treated in the same manner but fed with blood containing ATP and MEM but lacking virus. After blood feeding, 500μl of infectious blood was stored at -80˚C, and mosquitoes were anesthetized using CO_2 to sort out the fully engorged females. They were kept individually for 14 days in *Drosophila* tubes containing a moistened foam and topped with a veil on which sat a cotton ball soaked in a 5% honey solution that was renewed every 2–3 days. At the end of this period, saliva was collected from live mosquitoes who were first anesthetized to remove the wings and legs and then placed with their proboscis inserted into 20 μL tips filled with 10 μL of MEM + 10% Fetal Bovine Serum (FBS). Saliva was collected for 30 minutes and stored at -80˚C. Then, the thorax, head, and midgut of each female were dissected and stored separately at -80˚C. Experimental infections were repeated three times for each USUV lineage and blood titer, resulting in 12 independent experimental infections.

Survival analysis

Every day over the 14-day course of infection, dead mosquito females were recorded daily and stored at -80˚C. Dead and surviving females were analyzed for USUV infection (see method below). Note that females that died at day 1 were removed from the analysis to avoid virus detection from undigested or partially digested blood in the midgut.

Vector competence analysis

Total RNA was extracted using the KingFisher Flex automat and the NucleoMag RNA isolation kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer protocols and stored at -80˚C. The detection and quantification of USUV viral genome was carried out by RT-qPCR as described

in Nikolay *et al.* [36] using the NEB Luna Universal One-step RT-qPCR kit and the primer set: USUV-Forward (5'-AAAAATGTACGCGGATGACACA-3') and USUV-Reverse (5'-TTTGG CCTCGTTGTCAAGATC-3'). The samples were analyzed in duplicate concomitantly with a negative control and serial dilutions of USUV RNA extracted from USUV virus stock as standard to quantify individual viral load. The limit of detection has been defined as the Ct value of the last standard dilution with reproductible detection (i.e. all replicates for a dilution are positives, see S1 Fig). Vector competence was assessed based on several parameters: i) the prevalence of infection is the proportion of infected tissues among mosquitoes alive at 14 dpi (days post-infection), and ii) the viral load is the number of virus genome copies per mL of extracted RNA in infected tissues. For a fine characterization of vector competence, we calculated the transmission efficiency (TE: the proportion of mosquitoes with infected saliva among all blood-fed mosquitoes), the dissemination efficiency (DE: the proportion of mosquitoes with infected thoraces among all blood-fed mosquitoes), the infection efficiency (IE: the proportion of mosquitoes with infected midguts among all blood-fed mosquitoes), the dissemination rate (DR: the proportion of mosquitoes with infected thoraces among mosquitoes with infected midguts), and the transmission rate (TR: the proportion of mosquitoes with infected saliva among mosquitoes with infected thoraces). The infection status of dead mosquitoes was determined by the detection of virus in the whole body by RT-qPCR.

Statistical analysis

We analyzed the outcome of USUV infections in *Cx. p. pipiens* using two parameters as response variables: i) the infection prevalence and ii) the viral load. We examined the effects of diverse explanatory variables: "lineage" (categorial variable with two levels: EU2 and EU3), "blood meal titer" (a categorical variable with two levels: low and high), "true blood meal titer" (viral titer in blood after blood-feeding, numerical variable), "wing size" (numerical variable) and "replicate" (categorical variable with six levels: A, B, C, D, E, and F).

All statistical analyses were conducted using the R software 4.2.0. We computed generalized linear mixed effect models using the *glmmTMB* package [37] with i) a binomial error structure for analyzing the prevalence and ii) a negative binomial error structure for the viral load. Maximal models included the variables "lineage", "blood meal titer", "true blood meal titer", "wing size" and all their interactions. The "replicate" variable was used as a random variable to account for the nested data structure, i.e., the correlations between individuals from the same feeding experiment, and was either selected or removed based on the lowest AIC. Failed virus quantification in one tissue was specified as NA (Non Available) and was not included in the analysis. The significance of variables and selection of the minimal model was assessed using the ANOVA procedure within the package *car* [38], which performs type III hypothesis likelihood ratio tests (LRT). Mean parameter estimates were computed and *post-hoc* tests carried out to assess the differences between estimates with corrections for multiple comparisons using the package *emmeans* [39]. Kaplan Meier survival analyses were carried out and compared with that of the control group. The differences between survival distributions were estimated using the asymptotic Log-Rank Test [40], and the Hazard Ratio (HR defined as the ratio of the risk of death) was estimated from the *riskRegression* package [41].

The relative vectorial capacity of EU3 over EU2 has been calculated using the estimated vector competence (c') and survival (p) from this study keeping all other parameters equals (m, a and n). After simplification, the equation of the relative vectorial capacity is:

$$\frac{C_{EU3}}{C_{EU2}} = \left(\frac{p_{EU3}}{p_{EU2}}\right)^{n} \times \frac{\ln p_{EU2}}{\ln p_{EU3}} \times \frac{c\prime_{EU3}}{c\prime_{EU2}} \quad (2)$$

Eq 2. **Equation of relative vectorial capacity.** The equation was simplified based on fixed values for the density (m), the biting rate (a) and the extrinsic incubation period (n = 14 days).

Results

We examined the vector competence of *Cx. p. pipiens* for two USUV lineages (EU2 and EU3) provided in blood meals containing two distinct viral titers (referred as blood meal titers). We measured infection parameters and mortality after 14 days. Overall, 559 blood-fed females (188 with EU2, 236 with EU3, and 135 controls) from 3 replicates (*i.e.*, blood-feeding assays) per blood meal titer and USUV lineage were analyzed.

Prevalence of USUV infection in diverse tissues

We first investigated the USUV prevalence in mosquito to analyze the different parameters over all tissues and then analyze the different tissues separately to characterize the vector competence by calculating the infection, dissemination, and transmission efficiencies (IE, DE, and TE, respectively; see *Vector competence analysis* in *Material and Method*). Considering all tissues together (S1 Table), the prevalence of infection was a significantly influenced by the "*bloodmeal titer*" ($\chi^2 = 7.61$; *p*-value = 0.0058) and the "*bloodmeal titer x lineage*" interaction ($\chi^2 = 6.22$; *p*-value = 0.012). Prevalence was higher when mosquitoes fed on blood meal containing a higher virus titer than the one fed with lower virus titer for EU3 but not for EU2. In addition, infection prevalence was significantly influenced by the "*bloodmeal titer x tissue*" interaction ($\chi^2 = 10.54$; *p*-value = 0.0051) suggesting a different impact of bloodmeal titer in the different tissues. The minimal model revealed a significant effect of "*Lineage x Bloodmeal titer x Wing size*" interaction indicating an influence of mosquito size on infection that depends on USUV lineage and on the bloodmeal titer.

Focusing on the different tissues, the statistical analyses showed: i) For IE (midguts), none of the variable had a significant effect on prevalence for EU2 and EU3 (see Table 1 and Fig 1A) (low titer: $IE_{EU2} = 0.24 \pm 0.19$ and $IE_{EU3} = 0.46 \pm 0.25$, *p*-value > 0.05; high titer: $IE_{EU2} = 0.45 \pm 0.24$ and $IE_{EU3} = 0.61 \pm 0.23$, *p*-value > 0.05; Fig 1A). ii). For DE (thoraces), none of the variables had a significant effect (Table 1 and Fig 1B; low titer: $DE_{EU2} = 0.14 \pm 0.11$ and $DE_{EU3} = 0.20 \pm 0.14$, *p*-value > 0.05; high titer: $DE_{EU2} = 0.38 \pm 0.21$ and $DE_{EU3} = 0.52 \pm 0.22$, *p*-value > 0.05, Fig 1B). iii). For TE (saliva), the "*Lineage x Blood meal titer*" interaction was significant ($\chi^2 = 6.45$; *p*-value = 0.011, Table 1 and Fig 1C), as well as the "*Lineage*" effect ($\chi^2 = 4.83$, *p*-value = 0.027). Difference in TE was not significant between EU2 and EU3 at low titer contrary to high titer (low titer: $TE_{EU2} = 0.07 \pm 0.04$ and $TE_{EU3} = 0.02 \pm 0.02$, *p*-value = 0.11) but significant at high titer: ($TE_{EU2} = 0.10 \pm 0.05$ and $TE_{EU3} = 0.25 \pm 0.1$, *p*-value = 0.03).

Table 1. Statistical analyses of infection, dissemination and transmission efficiencies of USUV lineages 14 days post infection.

	Infection efficiency (IE)			Dissemination efficiency (DE)			Transmission efficiency (TE)		
Variable	χ^2	d.f.	*p-value*	χ^2	d.f.	*p-value*	χ^2	d.f.	*p-value*
Lineage	3.67	1	0.051	2.49	1	0.11	**4.83**	**1**	**0.027**
Bloodmeal titer	0.42	1	0.51	1.03	1	0.30	0.27	1	0.59
Interaction	0.19	1	0.65	0.08	1	0.77	**6.45**	**1**	**0.011**

Parameters selected in the minimal generalized linear mixed models are presented. X^2 is the Chi-square value of the likelihood ratio test and d.f. is the degree of freedom. The p-values are bolded when significant.

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.t001

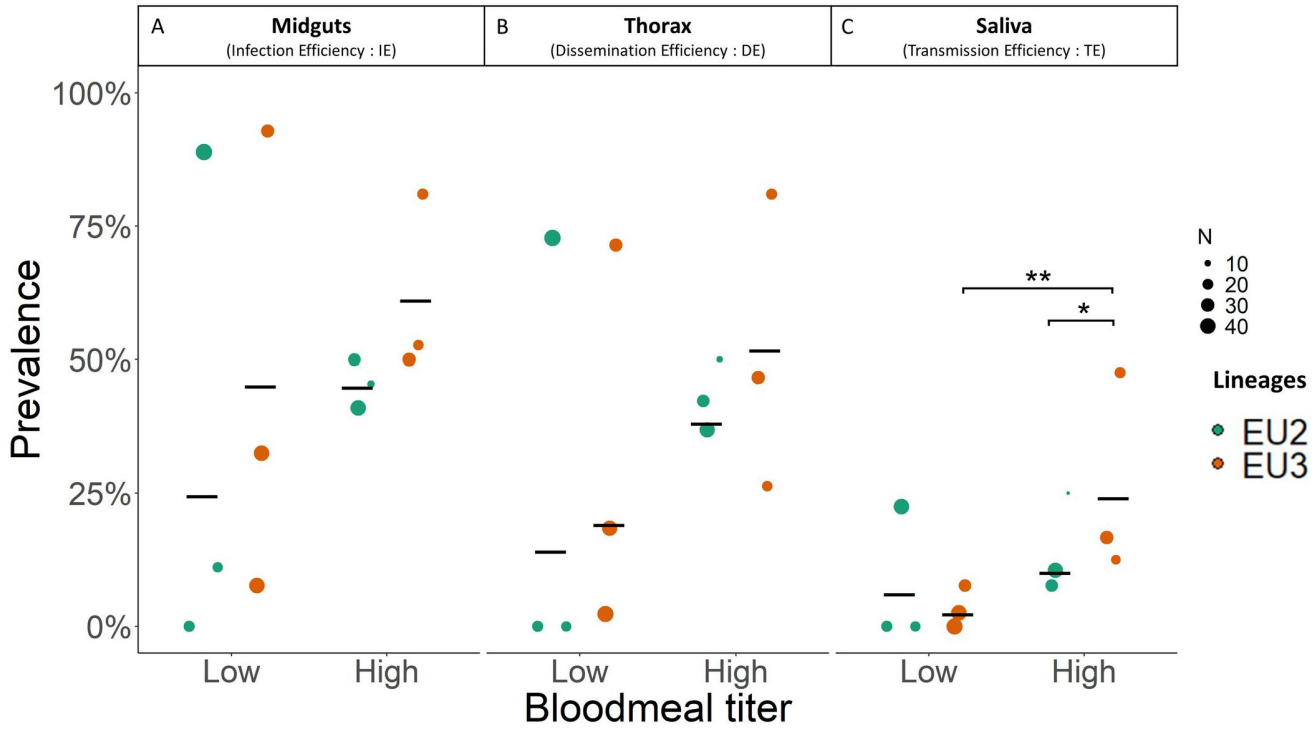


Fig 1. Prevalence of USUV infection in different *Cx. p. pipiens* tissues. The proportions of individual mosquitoes infected 14 dpi with EU2 (green points) and EU3 lineages (orange points), at low (left) and high (right) bloodmeal titer, are indicated for three body parts: A) midgut, B) thorax and C) saliva. Circles represent each replicate, with their diameter proportional to the corresponding sample size. Black bars represent the mean of the three replicates with overall sample sizes of 84 for EU2 and 109 for EU3 at low bloodmeal titer, and 76 for EU2 and 70 for EU3 at high bloodmeal titer. Only the significant differences are represented with stars (*: p-value < 0.05).

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.g001

However, EU3 lineage present a significant dose-effect on TE (TE_{EU3} low vs. TE_{EU3} high, p-value = 0.004, Fig 1C).

Overall, the dissemination rate (DR, the proportion of infected thoraces among mosquitoes with infected midguts) and the transmission rate (TR, the proportion of mosquitoes with infected saliva among those with infected thoraces; Table 2 and Fig 2) were below 100%, indicating the presence of infection barriers in mosquitoes preventing USUV dissemination outside the midgut and in mosquito saliva. Neither USUV lineage nor blood meal titer significantly affected the DR (Fig 2A; low titer: $DR_{EU2} = 0.14 \pm 0.11$, $DR_{EU3} = 0.18 \pm 0.13$; p-value = 0.45; high titer: $DR_{EU2} = 0.37 \pm 0.2$ and $DR_{EU3} = 0.52 \pm 0.2$, p-value = 0.09; EU2 low vs high p-value = 0.31, EU3 low vs high p-value = 0.21). By contrast, the TR was significantly

Table 2. Dissemination rate and transmission rates of USUV lineages by *Cx. p. pipiens*.

Blood meal titer	Low		High	
USUV lineage	**EU2**	**EU3**	**EU2**	**EU3**
N infected midguts	44	42	34	42
N infected thorax	32	28	30	36
N infected saliva	9	3	8	17
Dissemination Rate (DR)	0.14 +/- 0.11	0.18 +/- 0.13	0.36 +/- 0.2	0.51 +/- 0.21
Transmission Rate (TR)	0.06 +/- 0.04	0.02 +/- 0.016	0.09 +/- 0.04	0.23 +/- 0.09

Estimates from general linear mixed models are presented with standard error.

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.t002

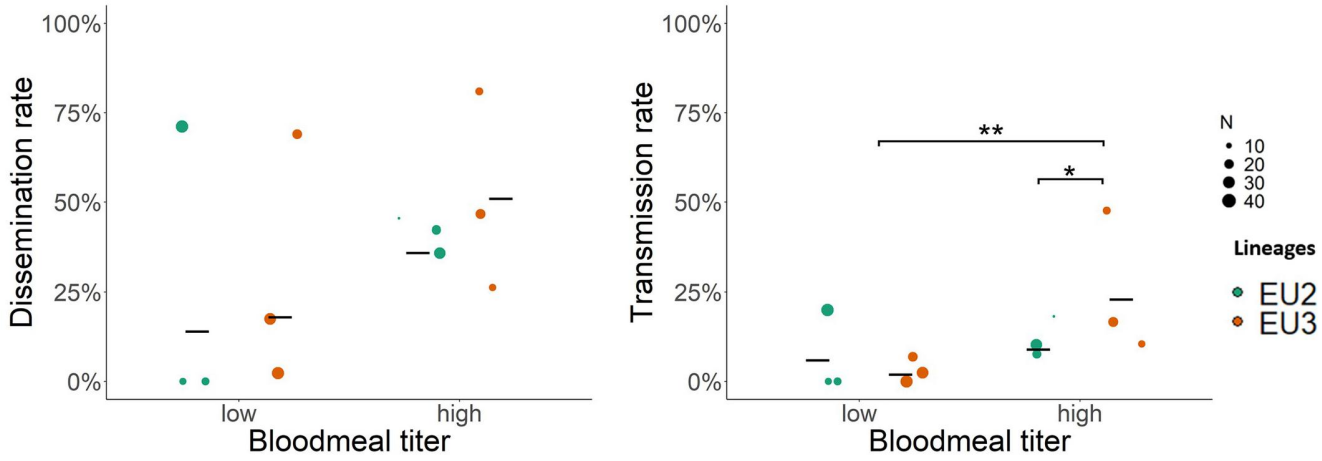


Fig 2. Dissemination rate (DR) and transmission rate (TR) of EU2 and EU3 lineages in *Cx. p. pipiens*. The mean proportions of mosquitoes with infected thoraces among those with infected midguts (DR, panel A) and of individual mosquitoes with infected saliva among those with infected thoraces (TR, panel B) are indicated for EU2 (green points) and EU3 lineages (orange points), at low (left) and high (right) viral titer. Circles represent each replicate, with their diameter proportional to the corresponding sample size. Black bars represent the mean of the three replicates. Sample sizes are presented in Table 2. Only the significant differences are represented with stars (*: p-value < 0.05).

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.g002

lower for USUV EU3 at low titer but not different between titers for EU2 or between EU2 and EU3 at high titer (Fig 2B; low titer: TR_{EU2} = 0.06 ± 0.04 and TR_{EU3} = 0.02 ± 0.016, p-value = 0.11; high titer: TR_{EU2} = 0.09 ± 0.04 and TR_{EU3} = 0.23 ± 0.09, p-value = 0.02; EU2 low vs high p-value = 0.61, EU3 low vs high p-value = 0.004).

Viral load in mosquito tissues

The analysis of infected females showed that viral load (VL, expressed in genome copies GE/mL) was generally lower for EU3 than EU2, but only at low titer and not in all tissues (Fig 3): the "*Lineage x Blood meal titer*" interaction was significant for VL in midguts and thoraces (respectively χ^2 = 180.8; p-value < 0.0001 and χ^2 = 139.68; p-value < 0.0001; Table 3). Post hoc analyses revealed that EU3 viral load was significantly lower than EU2 at low titer but not at high titer in both the midgut and thorax (Fig 3A: low titer: VL_{EU2} = 1.15x10^6 ± 5.16x10^6 GE/ml and VL_{EU3} = 2.79 ± 1.36 GE/ml, p-value < 0.0001; high titer: VL_{EU2} =: 2.64x10^6 ± 1.38x10^6 GE/ml, VL_{EU3} = 2.88x10^6 ± 1.37x10^6 GE/ml, p-value = 0.99; EU2 low vs high p-value = 0.6, EU3 low vs high p-value < 0.0001; Fig 3B: low titer: VL_{EU2} = 8.62x10^6 ± 4.24x10^6 GE/ml and VL_{EU3} = 33.4 ± 11.7 GE/ml, p-value < 0.0001; high titer: VL_{EU2} = 3.07x10^6± 1.56x10^6 GE/ml, VL_{EU3} = 1.75x10^6 ± 8.36x10^5 GE/ml, p-value = 0.85; EU2 low vs high p-value = 0.46, EU3 low vs high p-value < 0.0001). In saliva, viral load was much lower than in the other tissues (Fig 3C) and was slightly higher in mosquitoes that had taken a blood meal with a higher titer (χ^2 = 5.88; p-value = 0.015). Post hoc analysis showed that there was only a slightly significant increase in EU2 viral load between titers (Fig 3C; low titer: VL_{EU2} = 594.1 ± 416 GE/ml vs high titer: VL_{EU2} =: 7.08x10^3± 5.26x10^3, p-value = 0.02). All other pairwise comparisons were not significant.

Effect of USUV on mosquito survival

Mortality was analyzed in two ways. First, we compared survivorship between mosquitoes fed on infectious blood (EU2 or EU3) and control mosquitoes fed on non-infectious blood (Fig 4 and Table 4). For each blood meal titer (low and high), the Kaplan-Meier survival curves

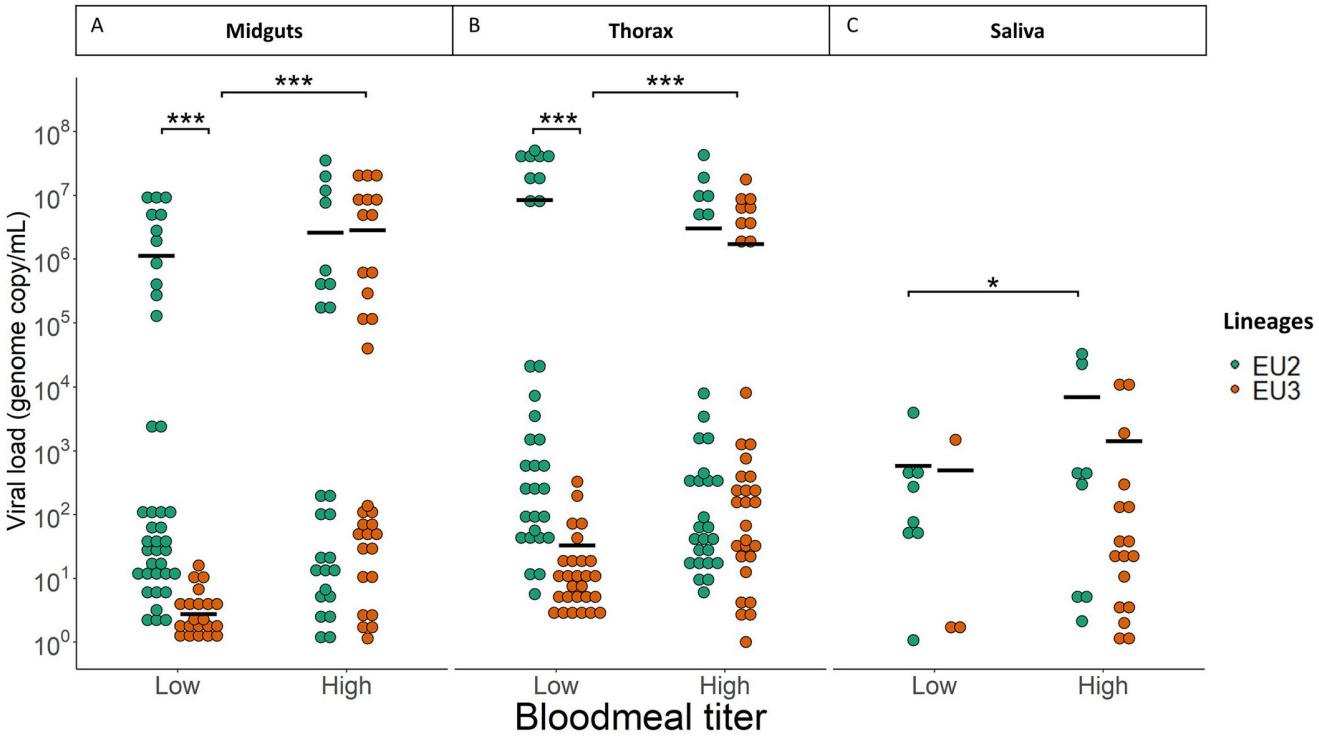


Fig 3. Viral load of USUV EU2 and EU3 in different *Cx. p. pipiens* tissues. Viral load (genome copy/μL) is represented for each USUV EU2 (green dots) and EU3 (orange dots) infected individuals, at low and high bloodmeal titers, in A) midguts, B) thorax and C) saliva. The black bar represents the mean. Only significant differences are represented with stars (*: p-value < 0.05; ***: p-value < 0.001).

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.g003

showed a significant impact of feeding on infectious blood (*i.e.* being exposed to the virus) compared to feeding on non-infectious blood (Log-rank test: High: $\chi^2_{df=2} = 20.3$; p-value < 0.0001; Low: $\chi^2_{df=2} = 25.1$; p-value < 0.0001, Fig 4). This was true at both low and high titer for EU3 (p-value < 0.001 and p-value = 0.027, respectively, in comparisons with controls). However, EU2 lineage's impact on survival was only significant when fed a high blood meal titer (p-value = 0.115 and p-value < 0.0001 at low and high titer, respectively). Interestingly, there were no differences in survival between mosquitoes infected with the EU2 and EU3 lineages at high titer (p-value = 1), but at low titers, feeding on blood with EU3 lineage had a greater impact on survival than with EU2 (p-value = 0.035). Overall, the Hazard Ratios (HR) after feeding on infectious blood were $HR_{low} = 7.13$ and $HR_{high} = 6.81$ fold for EU3, and $HR_{low} = 2.95$ and $HR_{high} = 5.8$ fold for EU2 (Table 4).

Table 3. Statistical analyses of USUV EU2 and EU3 viral load in mosquito tissues.

	Midgut			Thorax			Saliva		
Variable	χ^2	**d.f.**	***p-value***	χ^2	**d.f.**	***p-value***	χ^2	**d.f.**	***p-value***
Lineage	0.014	1	0.9	0.65	1	0.42	3.10	1	0.07
Blood meal titer	1.47	1	0.22	2.13	1	0.14	**5.88**	**1**	**0.015**
Interaction	**180.8**	**1**	**<0.0001**	**139.68**	**1**	**<0.0001**	0.72	1	0.39

Parameters selected in the minimal generalized linear mixed models are presented. X^2 is the Chi-square value of the likelihood ratio test and d.f. is the degree of freedom. The p-values are bolded when significant.

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.t003

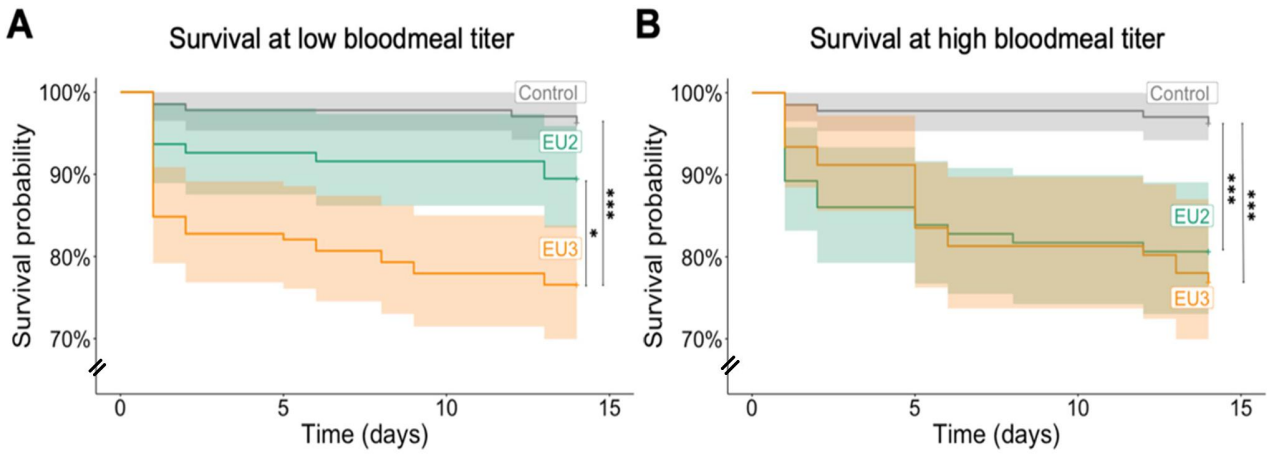


Fig 4. Effect of infectious blood feeding on *Cx. p. pipiens* survival. Survival of mosquito blood-fed with USUV EU2 and EU3 at low (A) and at high bloodmeal titer (B) were compared to survival of mosquito fed with non-infectious blood, to assess the combined effects of exposition to and infection by the viruses. All fully blood-fed females have been followed during 14 days and dead females were recorded daily. Pairwise Log-rank tests were used to compare survival between females that fed on infectious versus non-infectious bloodmeal and only significant differences were represented (*: *p*-value < 0.05; ***: *p*-value < 0.001).

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.g004

In the second analysis, we separated USUV-positive and USUV-negative mosquito midguts for comparisons with controls (Fig 5 and Table 4). We used the infection data obtained on midguts because this is the first place of mosquito-arbovirus interactions that could lead to an effect on mosquito life history traits. By taking into account the infection status we can better test whether replicating virus within mosquitoes, and not just exposure to the virus, impacts survival. For this analysis, we did not include females dead at day one because of the risk of detecting USUV from the blood in their midgut (Sample size: $EU2_{Low} = 89$ $EU3_{Low} = 123$ $EU2_{High} = 82$ $EU3_{High} = 82$).

At low blood meal titer, the survival of USUV-negative individuals (*i.e.*, no detection EU2 or EU3 viral genome) did not differ from controls (Log-rank test: $\chi^2_{df=2} = 2.1$ *p*-value = 0.3; Fig 5A). However, this difference was significant for USUV-positive mosquitoes (Log-rank test: $\chi^2_{df=2} = 7$ *p*-value = 0.03; Fig 5B). In pairwise comparisons with controls, the survival of EU2-positive mosquitoes did not differ statistically from controls (EU2 *vs.* CG p-value = 1, $HR_{EU2} = 1.89$ Fig 5B). In contrast, for EU3-positive mosquitoes there was a significant reduction in survival (EU3 *vs.* CG *p*-value = 0.024, $HR_{EU3} = 4.4$).

Table 4. Hazard ratio of USUV lineages associated death with 95% confidence intervals.

		Blood meal titer			Blood meal titer	
		Low	High	Infection status	Low	High
USUV lineages	**EU2** N = 188	2.95 1.0–8.6	5.82 2.1–15.7	Negative N = 92	0.58 0.1–4.9	2.38 0.6–8.9
				Positive N = 79	1.89 0.4–7.9	2.32 0.5–9.7
	EU3 N = 236	7.13 2.8–18.2	6.81 2.5–18.1	Negative N = 121	1.95 0.6–6.4	4.65 1.4–15.2
				Positive N = 84	4.40 1.3–14.4	5.05 1.6–15.5

N represents the sample size.

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.t004

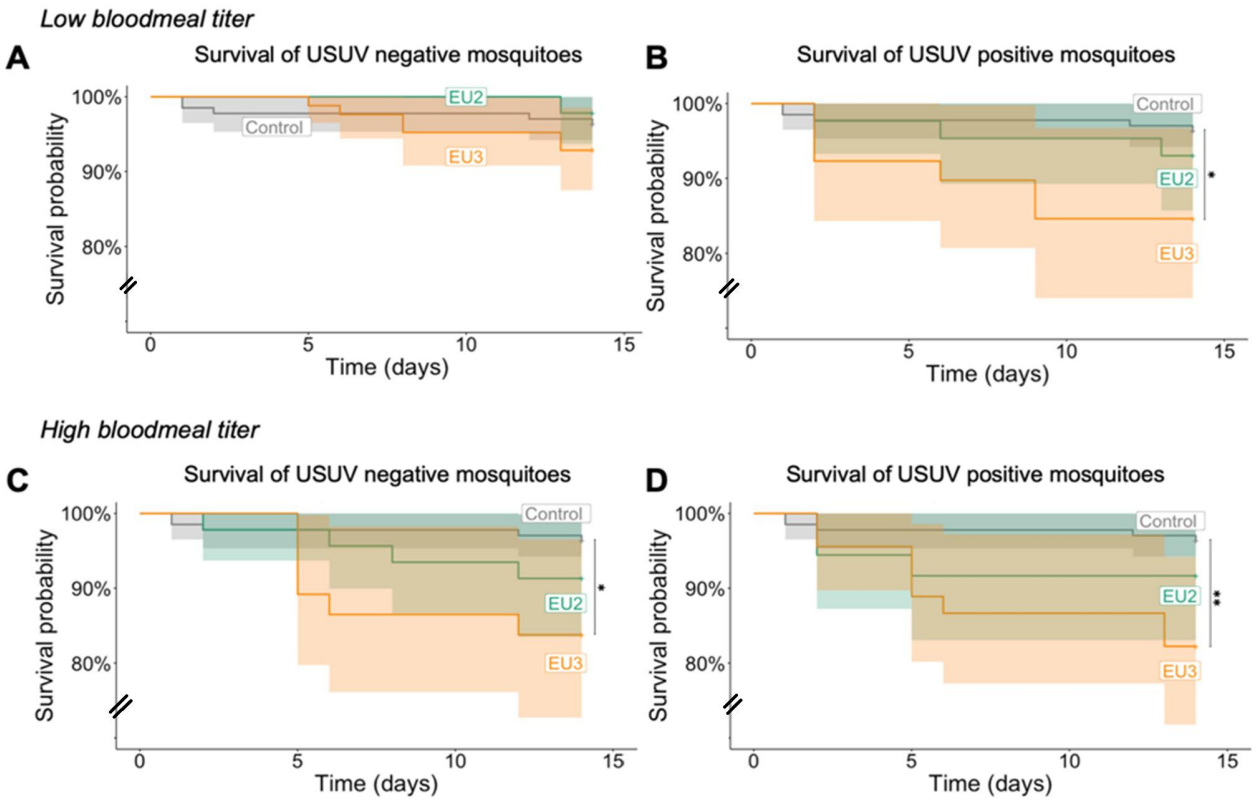


Fig 5. Effect of USUV EU2 and EU3 infection on *Cx. p. pipiens* survival. All fully blood-fed females have been followed during 14 days. USUV detection has been performed on dead and surviving mosquitoes except females that died the first day after blood feeding in order to avoid virus detection from undigested blood. The upper panel shows Kaplan Meier survival curves of USUV negative *vs*. control individuals (A) and positive *vs*. control individuals (B) at low bloodmeal titer. The lower panel shows Kaplan Meier survival curves of USUV negative *vs*. control individuals (C) and positive *vs*. control individuals (D) at high bloodmeal titer. Pairwise Log-rank tests were used to compare survival between groups and only significant differences were represented with their p-value. (*: p-value < 0.05; **: p-value < 0.01).

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.g005

By contrast, at high blood meal titer, both USUV-negative and USUV-positive individuals showed reduced survival in comparisons with control mosquitoes (Log-rank test: $\chi^2_{df=2} = 7.4$ p-value = 0.02 and Log-rank test: $\chi^2_{df=2} = 9.7$ p-value = 0.008, respectively), suggesting that exposure to infectious blood (Fig 5C) and presence of replicating virus (Fig 5D) are both responsible of the observed effect. In pairwise comparisons with controls, taking a blood meal containing a high titer of EU3 lineage significantly reduced survival in both USUV-positive ($EU3_{pos}$ vs. CG p-value = 0.0046, $HR_{EU3} = 5.03$) and negative ($EU3_{neg}$ vs. CG p-value = 0.018, $HR_{EU3} = 4.64$) individuals. By contrast, pairwise comparisons found no significant differences in the survival of USUV-positive or negative individuals that had taken a blood meal with EU2 lineage (p-values > 0.05, respectively) despite the significant difference observed when taken as a whole (Fig 4B).

Lastly, we tested whether viral load in USUV-positive mosquitoes affected survival. Cox proportional hazard regression did not show any impact of viral load on survival for either lineage or blood meal titer (Table 5).

Discussion

Assessing the vectorial capacity for vector-borne diseases is critical to understanding arboviral emergence and characterizing their epidemiological cycles. *Cx. p. pipiens* is a known vector of

Table 5. Statistical analysis of viral load on mosquito survival.

Lineage	Blood meal titer	χ^2	d.f.	*p-value*
EU2	**Low**	0.65	1	0.421
EU3	**Low**	0.92	1	0.337
EU2	**High**	0.11	1	0.739
EU2	**High**	2.00	1	0.157

Cox proportional analyses were performed on infected individuals only. X^2 is the Chi-square value of the likelihood ratio test and d.f. is the degree of freedom. The p-values are bolded when significant.

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.t005

USUV, a virus primarily of birds that has undergone recent phylogenetic and pathogenic divergence as it has spread throughout Europe. While there is known variation among the viral lineages in their virulence and pathogenicity, there has yet been no study of potential among-lineage variation in vector competence in addition to the effect on mosquito survival (as a proxy of virulence). Indeed, as for many arboviruses, vectorial capacity and more specifically vector competence is often tested with only one reference lineage. This neglect of viral diversity of virulence in and transmission from the vector host may profoundly limit our understanding of disease emergence and propagation. This study sought to determine whether these lineages vary in their interaction with the mosquito vector and in the relationship between virulence in the vertebrate host and in the mosquito vector. To better characterize these interactions, we tested two distinct viral titers in blood meal provided to mosquitoes because it influences vector susceptibility to Usutu, West Nile and St Louis encephalitis viruses [22,42,43] as well as virulence [44].

Vector competence differs between USUV lineages and depends on the blood meal titer

We first examined vector competence by determining viral prevalence of the two lineages in different tissues of *Cx. p. pipiens* (Fig 1). While *Cx. p. pipiens* was competent for both USUV lineages, there was considerable among-replicate and among-individual variability. These differences likely arise from multiple factors, including physiological and immunological response heterogeneity and genetic differences in mosquitoes affecting blood feeding and infection. This variability highlights the need in future studies for adequate sample sizes and replication of artificial blood-feeding assays to generate reliable data on vector competence.

Infection of the mosquito vector proceeds from viral particles entering the midgut following an infectious blood meal, to dissemination into other tissues outside of the midgut, and finally into the saliva where virus can be transmitted when the mosquito takes another blood meal. This within-host viral propagation may be slowed or halted by various barriers to infection (reviewed by Franz et al. [45]). Beyond the physical/cellular barriers, the arthropod immune system may be able at each step to fight the viral infection through many interacting pathways, (e.g., RNA interference (RNAi), JAK-STAT, Toll and Imd pathways [46]). We observed a decrease in USUV prevalence from the midgut, to the thorax, and then the saliva, suggesting barriers do indeed prevent the entrance and propagation of viral particles within mosquito vectors. Our analysis of the infection efficiency and dissemination and transmission rates point to the importance of such barriers and, more interestingly, that the effects of these barriers depend on the viral lineage and the blood meal titer (Fig 2 and Table 2).

The infection efficiency reflects the ability of viral particles to infect the midgut after feeding on infectious blood. Midgut infection barriers prevent viral particles from entering the midgut epithelium due, for instance, to an absence of appropriate surface receptors, as described in

three *Ae*. *Aegypti* colonies for a Dengue virus strain [47]. In our data about 50% of the mosquitoes that had taken an infectious blood meal had infected midguts, regardless of the differences in blood meal titer, suggesting that the midgut infection barrier is relatively easily overcome. The infection efficiency of the two lineages did not differ significantly (Table 1), suggesting a similar mosquito susceptibility to infection (Fig 1A). Difference in prevalence between blood meal titers was significant when all tissues were analyzed together, suggesting that increasing viral titer in the inoculum may facilitate infection.

From the midgut, viral particles must then move into other tissues. Midgut escape barriers may prevent such dissemination, perhaps through mechanisms acting in the basal lamina of the midgut epithelium [48]. Such barriers will reduce the dissemination rate from the midgut to tissues in the thorax. While overall there was a slight reduction in viral prevalence in mosquito thoraces, there was no effect of viral lineage or titer provided to blood-feeding mosquitoes on the dissemination efficiency, indicating that these lineages are equally efficient in their ability to infect other tissues within mosquito vector, independent of the blood meal titer.

Viral particles must then move into the salivary glands and saliva for transmission to occur when the mosquito vector takes a blood meal. Once again, escape barriers may affect this step in viral propagation by halting or slowing infection of the salivary gland cells or release into the saliva. Because we detected the presence of viral genome in saliva but not infectious particles, our data thus provided evidence of viral replication and release of viral genomes into the saliva allowing to characterize the salivary gland barrier but we cannot conclude on the infectiousness on the saliva. We found that differences in the transmission efficiency and transmission rate of the EU3 lineage depended on the viral titer in the blood meal contrary to EU2 (Figs 1C and 2B and Tables 1 and 2) suggesting that a high titer appears necessary to reach a higher transmission rate for the EU3 lineage but did not for EU2 lineage. This suggests a dose-dependent transmission efficiency for EU3 but not for EU2 lineage: a higher viral load may increase the likelihood of dissemination across the salivary gland barrier for EU3 (Fig 3B and Table 3).

Together, these observations suggest that EU2 replicates more efficiently in mosquitoes than EU3 and that the lineage specific variation to overcome infection barriers and disseminate to the next tissue depend on the inoculating dose of viral particles. Arboviruses may face a proximate viral fitness (defined as the number of viral particles within one host) tradeoff if adaptation to one host environment reduces fitness in the other host [30] due to taxonomic divergence. Our data did not indicate such proximate trade-off as Clé *et al.* [18] described a higher and continuous EU2 replication in human neuronal cells up to six days, while EU3 replication decreased two days post-infection. If similar differences exist in mosquitoes, the less effective EU3 replication could limit within-mosquito viral production when the initial inoculum is low. The viral load in EU2-infected mosquitoes would not be affected by the blood meal titer due in part to its higher replication rate: at high blood meal titer, EU2 viral load may have reached a plateau after only a few days. Infection and replication at earlier and intermediate time points are necessary to test this hypothesis. The poor EU3 replication might also explain the low transmission rate observed at low titer (Fig 3), suggesting that a minimal number of viral particles is required to overcome the salivary gland barrier. This barrier appeared much more difficult to overcome, as both lineages saw a sheer drop in viral load in saliva. It is also worth considering that viral propagation into the salivary glands may occur later in time post-infection. Characterization of the key factors affecting the salivary gland barrier will focus on future genomic and transcriptomic differences between mosquitoes infected by the different lineages and their consequences for vector competence for USUV.

USUV lineages differ in virulence in vector and vertebrate hosts

We also investigated the virulence of the two USUV lineages in the *Cx. p. pipiens* vector. We first analyzed the effect on mosquito survival of taking an infectious blood meal, which combines the effects of viral exposure and potential infection (viral replication and propagation, Fig 4). To distinguish the impact of infection alone, we then analyzed survival taking into account the infection status of the dead and surviving mosquitoes (Fig 5). Indeed, between 29 to 58% of blood-fed mosquitoes developed an infection (Fig 1A), allowing for an effective comparison of USUV-positive and USUV-negative females (Fig 5).

Overall, it appears EU3 lineage is more virulent to its mosquito host than EU2. Indeed, survival analysis suggests that both exposure to and infection by EU3 affect vector survival. Interestingly, the higher virulence of the EU3 lineage appears little affected by the blood meal titer and despite a lower viral load in mosquitoes (Figs 3 and 4 and Table 4). However, when fed a low blood meal titer, simple exposure to EU3 is not enough to reduce survival (Fig 5A and Table 4). Such reduction in survival could have a great impact on transmission because the daily survival rate is the most influential parameter of the vectorial capacity equation (Eq 1) [49].

The mechanisms promoting EU3's increased virulence in mosquito are not known. It seems likely that it is a consequence of the production of a virulence factor that is present in EU3 but absent in EU2. Such an effect has been reported previously for Dengue, Japanese encephalitis and Zika viruses in *Ae. aegypti*, *Cx. pipiens* and *Ae. albopictus*, where the secretion of NS1 protein in host blood is associated with higher infection and suppression of mosquito immune responses (JAK-STAT and ROS pathways) [50–52] as well as virulence in mammalian hosts [53]. The presence of an EU3-specific NS1 could play a role in the observed differences in virulence. There are three non-synonymous substitutions (R36K, S57T, E139G) among 12 polymorphic sites in the coding region of NS1 between EU2 (MT784899) and EU3 (KX601690) but the functional consequences of these substitutions are not known. In addition, mutations in regulatory non-coding sequences could also be at play. More investigations are required to explore these issues.

An alternative hypothesis is that the reduction in host survival is due to the cost of mounting an immune response. In the frame of the life-history trait theory, trade-offs involving mosquito immune response may arise if the response against pathogens damages host tissues or takes energy and resources away from other fitness-promoting traits such as survival or reproduction. We did not directly measure the USUV-associated immune response in mosquitoes, so we cannot assess the importance of such trade-offs in mosquitoes. The mechanisms of the reduction in host survival, either virus-mediated through the production of virulence factors, host-mediated through the costs of immunity, or a combination of host and viral factors, will require further investigation.

Different replication, different transmission risks

Epidemiologically, the impact of USUV infection on host survival means less transmission because females will take fewer blood meals—a positive for public health in this context of a newly emerging virus. As the costs of USUV exposition and infection on mosquito vector survival appears different between lineages, it is also expected to differently impact the transmission of these various USUV lineages. To compare the combined effects of viral replication and virulence between the two lineages, we calculated the relative vectorial capacity (Eq 2) using the estimated daily survival and infection/transmission efficiencies (Table 6), the most influential parameters of the vectorial capacity. We hypothesized that EIP does not differ between USUV lineages but it would be interesting to test for variation of EIP between lineages in future studies. We found that EU3 does indeed appear less transmissible at low blood meal

Table 6. USUV EU3 over EU2 relative vectorial capacity for *Culex pipiens*.

	Blood meal titer	
	Low	High
Vector infection efficiency	0.0013	0.0207
Daily survival rate	0.99	0.8316
Relative vectorial capacity (EU3/EU2)	0.036	0.190

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.t006

titer than EU2 (ratio EU3/EU2 = 0.036), because daily survival rate is relatively reduced; at high blood meal titer, while mosquitoes showed a similar vector competence between EU2 and EU3, the latter remained the less transmissible lineage due to its higher impact on vector survival (ratio EU3/EU2 = 0.19).

From an evolutionary point of view, the reduction in transmission from increased virulence reduces ultimate viral fitness (defined as the number of new infected hosts), resulting in natural selection favoring genotypes that optimize the trade-off between transmission and virulence. This trade-off is generally thought to arise because increasing viral replication has the dual effect of increasing the probability of transmission but also increasing virulence [54]. We found no evidence of such a relationship between neither replication and virulence nor a between replication and transmission in mosquitoes. Indeed, EU3 lineage had lower replication rates, at least at low blood meal titer, but a greater virulence in mosquitoes, the opposite of the expectation from the virulence-transmission trade-off hypothesis. One hypothesis to explain this pattern would be that the immune response against EU3 is deleterious to mosquitoes, leading to earlier death after blood-feeding, but this needs to be confirmed with more data on the extrinsic incubation period and the blood-feeding behavior of mosquito vectors on real vertebrate hosts.

Contrary to what we observed in the mosquito vector, EU2 appears more virulent than EU3 in the vertebrate host [19]. Reduced lifespan of infected vertebrate host would reduce the probability of EU2 transmission to mosquitoes. Although EU2 replicates to a higher level in vertebrates, we showed that prevalence of infection in mosquito midgut were not significantly different between EU2 at high titer and EU3 at low titer. Therefore, while more mosquitoes could be infected by EU3 due to a longer infectious period of the vertebrate hosts, the increased virulence and lower replication rate in mosquito may reduce transmission of EU3 to a new vertebrate host. Therefore, considering the impact of USUV on survival of both vertebrate hosts and mosquito vectors, the propagation of the two lineages should be overall balanced, because of their opposite effect (Fig 6). These results suggest a trade-off between virulence, measured as reduction of survival, and transmission taking into account the whole transmission cycle with both hosts and vectors.

Conclusion

This study confirms that *Cx. p. pipiens* is a competent vector for USUV and that infection dynamics differ depending on the viral lineage and blood meal titer. At low blood meal titers, EU2 displayed higher viral load and was more often found in saliva, while EU3 is more virulent; the combined effect was that the relative vectorial capacity of mosquitoes infected with EU3 was much lower than with EU2. At high blood meal titers, viral load between the lineages was similar, but the high virulence of EU3 in mosquitoes meant a continued reduction in vectorial capacity. The absence of a relationship between viral load and virulence is inconsistent with the virulence/transmission trade-off. However, our data, coupled with those in a murine model, suggests a possible trade-off between virulence and transmission considering both

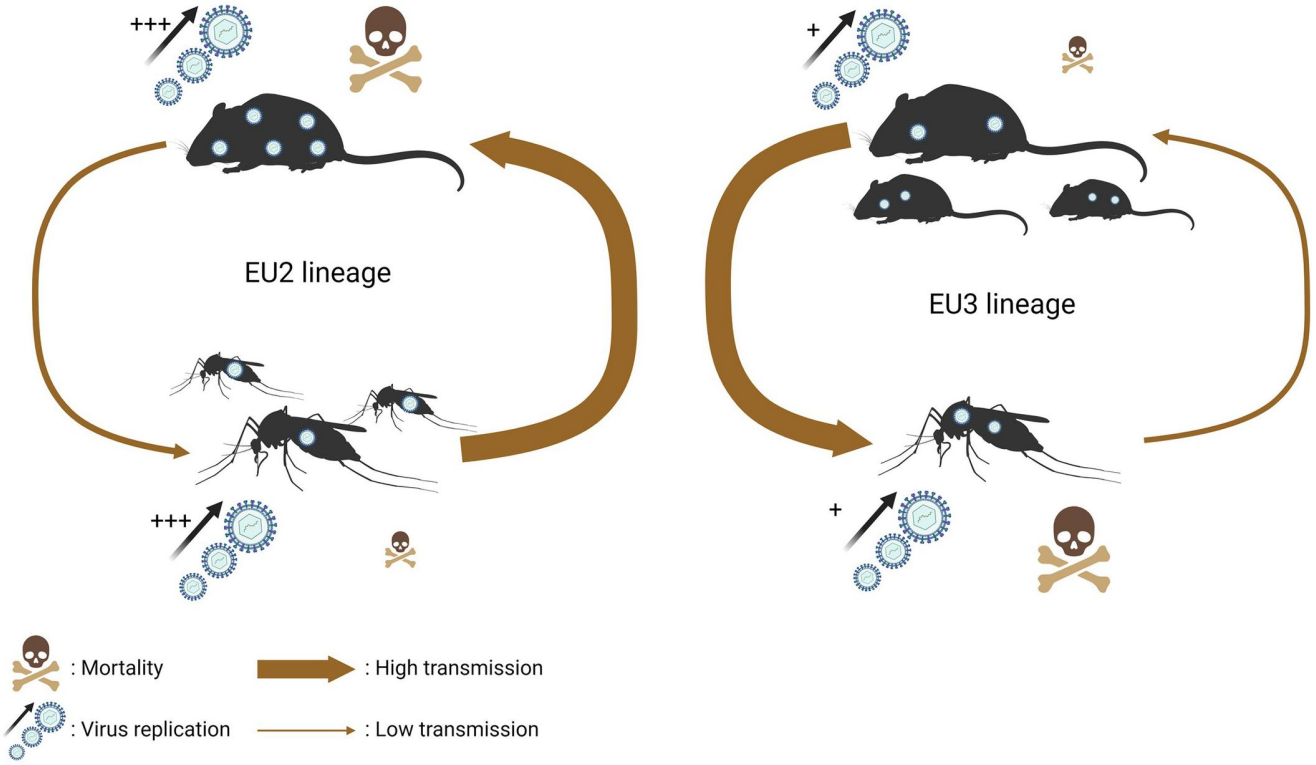


Fig 6. Schematic synthesis of USUV lineage specific transmission. The vertebrate (mouse) and arthropods (mosquitoes) hosts are represented on the arbovirus cycle. USUV replication level in hosts are indicated with the (+). The induced mortality rates of the hosts are proportional to the skull size. The transmission intensity is represented by the width of the arrows. The contrasting fitness between the different hosts of each USUV lineage suggests similar propagations of both lineages overall. This figure was created with BioRender.com.

https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0012295.g006

mosquito vector and vertebrate host and demonstrate that viral lineages could be maintained in a balanced equilibrium (Fig 6). Further investigation is required to identify the genetic factors that could explain the lineage-specific differences in virulence and vector competence. Lastly, our study stresses that to fully understand the epidemic dynamics of emergent arboviruses, it is necessary to study more than one viral lineage as well as several isolates of each lineage and not focus solely on vertebrate hosts.

Supporting information

S1 Table. Statistical analyses of infection prevalence in mosquito 14 days post infection.
(DOCX)

S1 Fig. Limit of detection (LOD) of USUV genome by RT-qPCR. Ct values obtained by RT-qPCR (Nikolay et al. 2014 [36]) were plotted against the corresponding viral RNA titers after serial dilutions (orange for EU3 and blue for EU2). Errors bars represent the standard error of the mean. Viral stocks were titrated at $10^{7.2}$ and $10^{6.8}$TCID$_{50}$/ml for EU2 and EU3, respectively by the method of SpearmanKärber method [34]. RNA was extracted from 150μl of virus stock using the NucleoMag RNA isolation kit (Macherey-Nagel) and eluted in 50μl before 10-fold serial dilution. RT-qPCR of serial dilutions and negative control were performed in duplicate on every plate (N = 8) containing RNA from mosquito tissues. We defined the limit of detection (*i.e.* individuals are considered infected or uninfected above or below this limit, resp.) as the Ct value of the last standard dilution with reproductible detection (*i.e.* all replicates for a

dilution are positives), here 34 [95CI: 33.11; 34.96], which corresponded to the 10^{-7} dilution, i.e to 1 $TCID_{50}$/mL or 10^{-3} $TCID_{50}$/μL of virus stock.
(TIFF)

Acknowledgments

All experiments on arthropods have been performed on the Baillarguet insectarium platform (https://doi.org/10.18167/infrastructure/00001), member of the National Infrastructure EMERG'IN and of the Vectopole Sud network (http://www.vectopole-sud.fr/). The Baillarguet insectarium platform is led by the joint units Intertryp (IRD, CIRAD) and ASTRE (CIRAD, INRAE). We thank Y. Simonin (UMR PCCEI) and N. Dheilly (UMR VIRO) for providing EU2 and EU3 virus isolates, F. Munoz for support in data visualization. We also thank the staff from La Tour du Valat for allowing us to collect *Culex pipiens* larvae. We thank Mylène Weill for helpful comments on this manuscript.

Author Contributions

Conceptualization: Haoues Alout.

Data curation: Maxime Prat, Haoues Alout.

Formal analysis: Maxime Prat, Haoues Alout.

Funding acquisition: Pierrick Labbé, Haoues Alout.

Investigation: Maxime Prat, Haoues Alout.

Methodology: Maxime Prat, Mélanie Jeanneau, Haoues Alout.

Project administration: Pierrick Labbé.

Resources: Maxime Prat, Ignace Rakotoarivony, Maxime Duhayon, Yannick Simonin, Giovanni Savini.

Supervision: Haoues Alout.

Visualization: Maxime Prat.

Writing – original draft: Maxime Prat, Haoues Alout.

Writing – review & editing: Maxime Prat, Yannick Simonin, Pierrick Labbé, Haoues Alout.

References

1. Williams MC, Simpson DIH, Haddow AJ, Knight EM. The Isolation of West Nile Virus from Man and of Usutu Virus from the Bird-Biting Mosquito Mansonia Aurites (Theobald) in the Entebbe Area of Uganda. Ann Trop Med Parasitol. 1964; 58: 367–374. https://doi.org/10.1080/00034983.1964.11686258 PMID: 14212897
2. Nikolay B, Diallo M, Boye CSB, Sall AA. Usutu Virus in Africa. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2011; 11: 1417–1423. https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0631 PMID: 21767160
3. Clé M, Beck C, Salinas S, Lecollinet S, Gutierrez S, Van de Perre P, et al. Usutu virus: A new threat? Epidemiol Infect. 2019; 147: e232. https://doi.org/10.1017/S0950268819001213 PMID: 31364580
4. Cadar D, Simonin Y. Human Usutu Virus Infections in Europe: A New Risk on Horizon? Viruses. 2022; 15: 77. https://doi.org/10.3390/v15010077 PMID: 36680117
5. Cadar D, Becker N, Campos R de M, Börstler J, Jöst H, Schmidt-Chanasit J. Usutu virus in bats, Germany, 2013. Emerg Infect Dis. 2014; 20: 1771–1773. https://doi.org/10.3201/eid2010.140909 PMID: 25271769
6. Durand B, Haskouri H, Lowenski S, Vachiery N, Beck C, Lecollinet S. Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel

species? Epidemiol Infect. 2016; 144: 1857–1864. https://doi.org/10.1017/S095026881600011X PMID: 26838515

7. Montagnaro S, Piantedosi D, Ciarcia R, Loponte R, Veneziano V, Fusco G, et al. Serological Evidence of Mosquito-Borne Flaviviruses Circulation in Hunting Dogs in Campania Region, Italy. Vector-Borne Zoonotic Dis. 2019; 19: 142–147. https://doi.org/10.1089/vbz.2018.2337 PMID: 30160624
8. García-Bocanegra I, Paniagua J, Gutiérrez-Guzmán AV, Lecollinet S, Boadella M, Arenas-Montes A, et al. Spatio-temporal trends and risk factors affecting West Nile virus and related flavivirus exposure in Spanish wild ruminants. BMC Vet Res. 2016; 12: 249. https://doi.org/10.1186/s12917-016-0876-4 PMID: 27829427
9. Escribano-Romero E, Lupulović D, Merino-Ramos T, Blázquez A-B, Lazić G, Lazić S, et al. West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. Vet Microbiol. 2015; 176: 365–369. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.005 PMID: 25724332
10. Diagne MM, Ndione MHD, Di Paola N, Fall G, Bedekelabou AP, Sembène PM, et al. Usutu Virus Isolated from Rodents in Senegal. Viruses. 2019; 11: 181. https://doi.org/10.3390/v11020181 PMID: 30795524
11. Ben Hassine T, De Massis F, Calistri P, Savini G, BelHaj Mohamed B, Ranen A, et al. First detection of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids in the south-west of Tunisia. Transbound Emerg Dis. 2014; 61: 385–389. https://doi.org/10.1111/tbed.12259 PMID: 25065813
12. Bażanów B, Jansen van Vuren P, Szymański P, Stygar D, Frącka A, Twardoń J, et al. A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. Viruses. 2018; 10: 87. https://doi.org/10.3390/v10020087 PMID: 29462983
13. Gaibani P, Rossini G. An overview of Usutu virus. Microbes Infect. 2017; 19: 382–387. https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.05.003 PMID: 28602915
14. Bowen RA, Nemeth NM. Experimental infections with West Nile virus. Curr Opin Infect Dis. 2007; 20: 293–297. https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32816b5cad PMID: 17471040
15. Holmes EC. The Evolutionary Genetics of Emerging Viruses. Annu Rev Ecol Evol Syst. 2009; 40: 353–372. https://doi.org/10.1146/annurev.ecolsys.110308.120248
16. Siljic M, Sehovic R, Jankovic M, Stamenkovic G, Loncar A, Todorovic M, et al. Evolutionary dynamics of Usutu virus: Worldwide dispersal patterns and transmission dynamics in Europe. Front Microbiol. 2023; 14. Available from: https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2023.1145981. https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1145981 PMID: 37032910
17. Vilibic-Cavlek T, Petrovic T, Savic V, Barbic L, Tabain I, Stevanovic V, et al. Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. Pathogens. 2020; 9: 699. https://doi.org/10.3390/pathogens9090699 PMID: 32858963
18. Clé M, Constant O, Barthelemy J, Desmetz C, Martin MF, Lapeyre L, et al. Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells. J Neuroinflammation. 2021; 18: 11. https://doi.org/10.1186/s12974-020-02060-4 PMID: 33407600
19. Kuchinsky SC, Hawks SA, Mossel EC, Coutermarsh-Ott S, Duggal NK. Differential pathogenesis of Usutu virus isolates in mice. PLoS Negl Trop Dis. 2020; 14: e0008765. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008765 PMID: 33044987
20. Macdonald G The analysis of the sporozoite rate. Trop Dis Bull. 1952; 49: 569–586.
21. Brady OJ, Godfray HCJ, Tatem AJ, Gething PW, Cohen JM, McKenzie FE, et al. Vectorial capacity and vector control: reconsidering sensitivity to parameters for malaria elimination. Trans R Soc Trop Med Hyg. 2016; 110: 107–117. https://doi.org/10.1093/trstmh/trv113 PMID: 26822603
22. Nikolay B, Diallo M, Faye O, Boye CS, Sall AA. Vector Competence of Culex neavei (Diptera: Culicidae) for Usutu Virus. Am J Trop Med Hyg. 2012; 86: 993–996. https://doi.org/10.4269/ajtmh.2012.11-0509 PMID: 22665607
23. Holicki CM, Scheuch DE, Ziegler U, Lettow J, Kampen H, Werner D, et al. German Culex pipiens biotype molestus and Culex torrentium are vector-competent for Usutu virus. Parasit Vectors. 2020; 13: 625. https://doi.org/10.1186/s13071-020-04532-1 PMID: 33380339
24. Anderson RM, May RM. Coevolution of hosts and parasites. Parasitology. 1982; 85: 411–426. https://doi.org/10.1017/s0031182000055360 PMID: 6755367
25. Ewald PW. Host-Parasite Relations, Vectors, and the Evolution of Disease Severity. Annu Rev Ecol Syst. 1983; 14: 465–485. https://doi.org/10.1146/annurev.es.14.110183.002341
26. Frank SA. Models of Parasite Virulence. Q Rev Biol. 1996; 71: 37–78. https://doi.org/10.1086/419267 PMID: 8919665
27. Dwyer G, Levin SA, Buttel L. A Simulation Model of the Population Dynamics and Evolution of Myxomatosis. Ecol Monogr. 1990; 60: 423–447. https://doi.org/10.2307/1943014

28. Alizon S, van Baalen M. Transmission–virulence trade-offs in vector-borne diseases. Theor Popul Biol. 2008; 74: 6–15. https://doi.org/10.1016/j.tpb.2008.04.003 PMID: 18508101

29. Alout H, Dabiré RK, Djogbénou LS, Abate L, Corbel V, Chandre F, et al. Interactive cost of Plasmodium infection and insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae. Sci Rep. 2016; 6: 29755. https://doi.org/10.1038/srep29755 PMID: 27432257

30. Coffey LL, Vasilakis N, Brault AC, Powers AM, Tripet F, Weaver SC. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. Proc Natl Acad Sci. 2008; 105: 6970–6975. https://doi.org/10.1073/pnas.0712130105 PMID: 18458341

31. Krambrich J, Bole-Feysot E, Höller P, Lundkvist Å, Hesson JC. Vector competence of Swedish *Culex pipiens* mosquitoes for Usutu virus. One Health. 2024; 18: 100707. https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2024.100707 PMID: 38500563

32. Bahnck CM, Fonseca DM. Rapid assay to identify the two genetic forms of Culex (Culex) pipiens L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. Am J Trop Med Hyg. 2006; 75: 251–255. PMID: 16896127

33. Lecollinet S, Blanchard Y, Manson C, Lowenski S, Laloy E, Quenault H, et al. Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015. Emerg Infect Dis. 2016; 22: 2225. https://doi.org/10.3201/eid2212.161272 PMID: 27869608

34. Kärber G. Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Naunyn-Schmiedebergs Arch Für Exp Pathol Pharmakol. 1931; 162: 480–483. https://doi.org/10.1007/BF01863914

35. Galun R, Avi-Dor Y, Bar-Zeev M. Feeding Response in Aedes aegypti: Stimulation by Adenosine Triphosphate. Science. 1963; 142: 1674–1675. https://doi.org/10.1126/science.142.3600.1674 PMID: 17834375

36. Nikolay B, Weidmann M, Dupressoir A, Faye O, Boye CS, Diallo M, et al. Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. J Virol Methods. 2014; 197: 51–54. https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.08.039 PMID: 24036076

37. Brooks M E, Kristensen K, Benthem K J, van, Magnusson A, Berg C W, Nielsen A, et al. glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. R J. 2017; 9: 378. https://doi.org/10.32614/RJ-2017-066

38. An R Companion to Applied Regression. In: SAGE Publications Inc [Internet]. 28 Sep 2023 [cited 5 Oct 2023]. Available from: https://us.sagepub.com/en-us/nam/an-r-companion-to-applied-regression/book246125.

39. Lenth RV, Bolker B, Buerkner P, Giné-Vázquez I, Herve M, Jung M, et al. emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means. 2023. Available from: https://cran.r-project.org/web/packages/emmeans/index.html.

40. Cox DR. Regression Models and Life-Tables. J R Stat Soc Ser B Methodol. 1972; 34: 187–202. https://doi.org/10.1111/j.2517-6161.1972.tb00899.x

41. Gerds T, Ohlendorff J, Ozenne B. riskRegression: Risk Regression Models and Prediction Scores for Survival Analysis with Competing Risks. 2023. Available from: https://cran.r-project.org/package=riskRegression.

42. Richards SL, Mores CN, Lord CC, Tabachnick WJ. Impact of Extrinsic Incubation Temperature and Virus Exposure on Vector Competence of Culex pipiens quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus. Vector Borne Zoonotic Dis Larchmt N. 2007; 7: 629–636. https://doi.org/10.1089/vbz.2007.0101 PMID: 18021028

43. Richards SL, Lord CC, Pesko K, Tabachnick WJ. Environmental and Biological Factors Influencing Culex pipiens quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae) Vector Competence for Saint Louis Encephalitis Virus. Am J Trop Med Hyg. 2009; 81: 264–272. PMID: 19635881

44. Benzarti E, Rivas J, Sarlet M, Franssen M, Desmecht D, Schmidt-Chanasit J, et al. Experimental Usutu Virus Infection in Domestic Canaries Serinus canaria. Viruses. 2020; 12: 164. https://doi.org/10.3390/v12020164 PMID: 32023880

45. Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. Viruses. 2015; 7: 3741–3767. https://doi.org/10.3390/v7072795 PMID: 26184281

46. Lee W-S, Webster JA, Madzokere ET, Stephenson EB, Herrero LJ. Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. Parasit Vectors. 2019; 12: 165. https://doi.org/10.1186/s13071-019-3433-8 PMID: 30975197

47. Mercado-Curiel RF, Black WC, Muñoz M de L. A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in Aedes aegypti. BMC Microbiol. 2008; 8: 118. https://doi.org/10.1186/1471-2180-8-118 PMID: 18625079

48. Carpenter A, Clem RJ. Factors Affecting Arbovirus Midgut Escape in Mosquitoes. Pathogens. 2023; 12: 220. https://doi.org/10.3390/pathogens12020220 PMID: 36839492

49. Garrett-Jones C, Shidrawi GR. Malaria vectorial capacity of a population of Anopheles gambiae: an exercise in epidemiological entomology. Bull World Health Organ. 1969; 40: 531–545. PMID: 5306719

50. Liu J, Liu Y, Nie K, Du S, Qiu J, Pang X, et al. Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. Nat Microbiol. 2016; 1: 16087. https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2016.87 PMID: 27562253

51. Liu Y, Liu J, Du S, Shan C, Nie K, Zhang R, et al. Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in Aedes aegypti mosquitoes. Nature. 2017; 545: 482–486. https://doi.org/10.1038/nature22365 PMID: 28514450

52. Kuo L, Jaeger AS, Banker EM, Bialosuknia SM, Mathias N, Payne AF, et al. Reversion to ancestral Zika virus NS1 residues increases competence of Aedes albopictus. PLoS Pathog. 2020; 16: e1008951. https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008951 PMID: 33052957

53. Muller DA, Young PR. The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. Antiviral Res. 2013; 98: 192–208. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2013.03.008 PMID: 23523765

54. Alizon S, Hurford A, Mideo N, Van Baalen M. Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. J Evol Biol. 2009; 22: 245–259. https://doi.org/10.1111/j.1420-9101.2008.01658.x PMID: 19196383

Influence des facteurs génétiques du vecteur

Après avoir étudié l'influence des facteurs génétiques viraux sur la compétence vectorielle et la capacité vectorielle, mes travaux se sont poursuivis par l'étude de facteurs génétiques du vecteur lui-même, notamment sur la capacité vectorielle pour USUV. Je me suis en particulier intéressé à l'impact potentiel des allèles de résistances aux insecticides sur cette capacité, et sur les différences entre deux espèces au sein du complexe *Cx. pipiens*.

A) Influence de plusieurs gènes de résistance (*ace-1 ; kdr ; rdl, Ester*) sur la capacité vectorielle de *Cx. pipiens* pour le virus Usutu.

La colonie de moustiques utilisée pour les infections (Partie I), est originaire de la Tour du Valat, située dans un parc naturel classé zone Natura2000, et donc a priori peu soumises aux traitements insecticides (bien que les traitements n'y soient pas totalement interdits en cas de nécessité (Labbé, communication personnelle)). Pourtant, nous avons eu la surprise de constater la présence de plusieurs mécanismes de résistance aux insecticides dans cette colonie 6 mois à 11 mois avant les infections expérimentales (soit entre la 5ème et la 10ème génération). En effet, la fréquence des allèles de résistance diminue généralement, car ces allèles sont souvent associés à une baisse de la valeur sélective des individus en absence de pression de sélection (Labbé *et al.* 2017). Cependant, il est possible que quelques traitements résiduels aient persisté, ou que ces allèles soient arrivés par migration depuis des zones exposées aux insecticides.

J'ai alors entrepris de génotyper tous les individus dont la compétence vectorielle pour USUV avait été mesurée lors de la première expérience (Prat *et al.*, 2024). Le but est d'étudier *a posteriori* l'association entre les allèles de résistances de différents locus (*ace-1* G119S, *rdl* A302S/G, *kdr* L1014F et *Ester*) et la compétence vectorielle de *Cx. pipiens* à partir des infections décrites dans le chapitre précédent. Notre hypothèse était en effet que ces allèles de résistance aux insecticides pouvaient avoir un effet sur la compétence vectorielle de *Cx. pipiens* pour USUV, comme cela avait été montré précédemment pour WNV (Atyame *et al.*, 2019).

Matériel et méthodes :

Les infections expérimentales sont décrites dans le chapitre précédent et dans l'article en annexe (Prat *et al.*, 2024). Le génotypage des 341 individus a été réalisés par PCR conventionnelle avec des procédures publiées, dans le cadre d'un stage de Master 1 Eco-EPI réalisé par Noémie Lalanne, que j'ai co-encadré. Différentes approches de génotypage ont été utilisées pour les différents gènes de résistance. Pour *ace-1*, *Rdl* et *Ester* (Weill *et al.*, 2004) (Tantely *et al.*, 2010) (Berticat *et al.*, 2000), une PCR suivie d'une digestion enzymatique a été réalisée. Grâce à la présence/absence d'un site de restriction enzymatique, différentes tailles d'amplicons digérés sont obtenues et permettent d'identifier les génotypes homozygotes sensibles (SS) et résistants (RR), et hétérozygotes (RS). Pour le gène *kdr*, le génotypage s'effectue grâce à des oligonucléotides spécifiques de la région qui porte la mutation associée à la résistance aux insecticides (Martinez-Torres *et al.*, 1998).

Résultats :

Une première observation est que nous ne disposons que d'un nombre réduit d'individus porteurs des différents allèles et de leurs différentes combinaisons, chaque génotype étant le plus souvent trouvé chez moins de 10, voire de 5 individus. Cela rend la puissance statistique de notre analyse relativement faible. Nous avons donc choisi de regrouper les génotypes multilocus par classes en fonction du nombre d'allèles de résistance.

Individuellement aucun des allèles de résistance des trois gènes impliqués dans des mécanismes de résistances par mutation de cible (*ace-1, rdl* et *kdr*) n'a présenté d'association avec les prévalences d'infections, pour aucun des trois tissus analysés sur ces moustiques (abdomen, thorax, glandes salivaires). Cependant l'allèle *Ester* (résistance métabolique) est associé positivement aux taux d'infection des moustiques : la prévalence de USUV (tous titres et lignées confondus) est significativement plus importante chez les individus RR que les individus SS pour cet allèle.

Toutefois, nos résultats suggèrent une association de chacun de ces allèles de résistance avec la charge virale, plus ou moins forte selon les allèles. Les génotypes aux locus *kdr* et *Ester* ont ainsi montré une association avec la charge virale uniquement pour la lignée EU3 et dans la salive : les individus RR y ont une charge virale significativement supérieure par rapport aux individus SS et RS pour ces deux gènes indépendamment. On observe aussi une association entre la charge virale et le génotype RR au locus *rdl* pour les infections à titre fort, la charge

virale des individus RR étant significativement plus forte que celle des hétérozygotes RS[2], pour les deux lignées du virus. Enfin, une association entre *ace-1*^{R} et la charge virale a également été observée, notamment à titre fort dans l'abdomen et le thorax, où les individus hétérozygotes (RS) ont une charge en EU2 plus élevée que les individus sensibles (SS).

D'autre part, nous avons testé si les variations des phénotypes d'infection sont corrélées aux combinaisons (nombre et identité) d'allèles de résistance au sein d'un même individu. Nous avons déterminé les génotypes multilocus et leur distribution au sein des individus. Une corrélation positive est observée entre l'efficacité de dissémination et le nombre d'allèles de résistance pour la lignée EU3, notamment à fort titre initial. En revanche, les résultats pour la lignée EU2 sont hétérogènes et moins marqués. La corrélation entre le nombre d'allèles mutés et les prévalences mesurées ne semble pas pouvoir être généralisée. On observe d'autre part une corrélation positive entre nombre d'allèles de résistance et la charge virale dans la salive pour la lignée EU2 et EU3 à titre faible et pour EU3 à titre fort (la tendance est présente mais non significative pour EU2).

Discussion et perspectives :

Cette approche corrélative de l'étude de la résistance aux insecticides sur la compétence vectorielle de *Cx. p. pipiens* pour USUV suggère des effets multiples et complexes. Les individus RR au locus *Ester* montrent une prévalence plus élevée de l'infection dans l'abdomen par rapport aux SS, mais cette différence n'est pas observée dans le thorax et la salive. Ce résultat est cohérent avec l'expression préférentielle des gènes *Ester* dans l'abdomen (Pasteur, Nancé, et Bons 2001). Aucun lien n'est en revanche observé entre la prévalence dans les tissus et les génotypes résistants aux locus *kdr*, *ace-1* et *rdl*, suggérant que ces allèles de résistance ne contribueraient pas, individuellement, à une infection plus forte/efficace des tissus.

L'analyse de la charge virale (en génomes viraux/mL) révèle une influence des génotypes de résistance dans la salive pour les gènes *kdr*, *rdl*, et *Ester* avec un effet dépendant de la lignée virale pour *kdr* et *Ester*. Tandis que pour *ace-1*, les résultats sont différents : les individus RS semblent favoriser la multiplication de la lignée EU2 à titre fort, dans l'abdomen et le thorax mais pas dans la salive.

[2] pas de *rdl* SS détectés dans les données

Les mécanismes de résistances par mutation de cible (*ace-1*^{R}, *rdl* et *kdr*) n'ont pas montré d'association individuelle avec la prévalence de l'infection, contrairement à la résistance métabolique où l'expression d'*Ester* est associée à une augmentation de l'infection par USUV (toutes conditions confondues). Au regard de ces résultats, nous pouvons émettre l'hypothèse que les mécanismes associés à une surproduction d'enzymes de détoxication tels que les estérases pourraient avoir des effets directs sur d'autres processus biologiques (tels que l'immunité) ou indirects, ex. par la réallocation des ressources due à la surproduction constitutive ; cette perturbation générale du métabolisme entrainerait une plus grande susceptibilité à l'infection. A l'inverse, les mutations ponctuelles associées aux gènes *ace-1, kdr* et *rdl* dont l'expression et les produits sont essentiellement localisés dans le système nerveux, perturberaient moins la physiologie du vecteur, et de ce fait, auraient des effets plus limités sur la compétence vectorielle. On sait toutefois que les effets du génotype RR au locus *ace-1* sur la valeur sélective et les traits d'histoire de vie des moustiques qui le portent sont très importants (Raymond *et al.*, 2001; Berticat *et al.*, 2002, 2008; Agnew *et al.*, 2004; Vézilier *et al.*, 2013), ce qui rend cette absence d'effet néanmoins surprenante.

De façon moins étonnante, on observe une tendance générale (plus ou moins marquée selon les allèles, les lignées virales et les doses) à ce qu'un nombre d'allèles de résistance plus important soit corrélés à une prévalence plus importante du virus dans la salive (effet cumulatif). Cela suggère, comme on peut le voir sur d'autres traits d'histoire de vie (Raymond *et al.*, 1989; Hardstone and Scott, 2010; Alout *et al.*, 2016) que plus un individu porte d'allèles de résistance, plus sa physiologie est perturbée ce qui faciliterait la réplication (charge virale augmentée) et la dissémination du virus). Néanmoins ce n'est pas toujours le cas, et on peut observer des effets compensatoires de la multirésistance (ex. *kdr*^{R} pourrait compenser les couts associés à *ace-1*^{R}, Berticat *et al.*, 2008). De telles comparaisons directes entre les mécanismes de résistance, leurs effets cumulatifs, et leurs impacts différentiels sur la compétence vectorielle pour les *Flavivirus* n'avaient pas encore été étudiés.

Les résultats détaillés de cette étude sont présents dans un second article présenté en annexe.

Article 2 : Impact of multiples insecticide resistant allele on *Culex pipiens* vector competence for Usutu virus. (in prep.)

Impact of multiples insecticide resistant allele on *Culex pipiens* vector competence for Usutu virus. (in prep.)

Introduction

In recent decades, arthropod-borne viruses (arboviruses) have become increasingly prominent due to their resurgence in endemic regions and emergence in previously unaffected countries. One such virus is the Usutu Virus (USUV), a mosquito-borne flavivirus (family: Flaviviridae, genus: Flavivirus) related to other significant viruses like Yellow Fever (YFV), Japanese Encephalitis (JEV), and West Nile Virus (WNV). USUV is primarily maintained in a transmission cycle involving wild birds and ornithophilic mosquitoes, especially those of the genus *Culex*. The virus has caused numerous avian outbreaks, leading to high mortality rates among passeriform and strigiform birds, with blackbirds (Turdus merula) being particularly affected (Nikolay, 2015). Additionally, USUV has been identified in various non-avian hosts, including bats, dogs, ruminants, wild boar, shrews, rodents, horses, and humans (Cadar *et al.*, 2014; Durand *et al.*, 2016; Diagne *et al.*, 2019).

The vector competence describes the intrinsic ability of mosquitoes to transmit pathogens, covering the entire process from feeding on an infected host to the capacity of transmitting the virus to a new host. This includes within-vector viral replication and dissemination to the salivary glands. Vector competence is influenced by factors such as the genetic backgrounds of hosts and vectors, pathogen strains, and various ecological and environmental variables, including larval competition, adult diets, and gut microbiota (reviewed in (Viglietta *et al.*, 2021)).

In the absence of vaccines or treatments, controlling mosquito populations remains the most effective way to interrupt arbovirus transmission. Insecticides have been widely used for this purpose, but their extensive use in agriculture and against mosquito nuisance has led to the selection of resistance genes in mosquito populations. Two main mechanisms confer high levels of resistance: metabolic resistance, involving the overproduction of enzymes that degrade/sequestrate insecticides, and target-site resistance, involving mutations that prevent insecticides from binding to their targets. These mechanisms allow mosquitoes to survive in treated environments, potentially increasing their population sizes and vectorial capacity.

Resistance alleles become more prevalent in insecticide-treated areas but often come with fitness costs in untreated areas, such as reduced reproductive success or increased susceptibility to predators and infections. These fitness costs have been studied across various traits, including development time, mortality rates, flight and host-seeking behaviors, and susceptibility to infections. The pleiotropic nature of these fitness costs is complex and challenging to predict, yet the selection of resistant alleles can alter mosquito physiology and impact pathogen transmission.

For example, insecticide-resistant *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes with higher carboxylesterase mediated OP resistance were less parasitized by the filarial parasite *Wuchereria bancrofti* compared to susceptible mosquitoes (McCarroll and Hemingway, 2002). In *An. gambiae*, target-site mutations responsible for insecticide resistance to either OP (*ace-1* G119S) or PYR (*kdr*-west) increased the prevalence of *Plasmodium falciparum* infections, potentially enhancing malaria transmission (Alout *et al.*, 2013). Additionally, pyrethroid-resistant *An. gambiae* from Tanzania showed higher competence for malaria compared to susceptible vectors (Kabula *et al.*, 2016). In *Cx. quinquefasciatus*, insecticide resistance increased vector competence for West Nile virus but had no effect on Rift Valley virus transmission (Atyame *et al.*, 2019).

In this study, we aimed to determine whether insecticide resistance genotypes could explain the variability in vector competence of *Culex pipiens* for Usutu virus that we have reported (Prat *et al.*, 2024). We genotyped individuals at four loci implicated in insecticide resistance (*kdr*, *rdl*, *ace-1*, and *Est*) and analyzed whether infection rate (IR), dissemination rate (DR), transmission efficiency (TE), and viral load in distinct tissues at 14 days post-infection (dpi) correlated with genotypes at each locus or the number of resistant alleles within each individual.

Material and Methods

Mosquito lines

Culex p. pipiens larvae were collected in September 2021 from ponds in a protected natural area of the Camargue at La Tour du Valat (https://tourduvalat.org/, coordinate: 43.509297, 4.668958) and maintained in the insectarium. PCR of the polymorphic Cq11 microsatellite (Bahnck and Fonseca, 2006) was used to confirm that mosquitoes belong to the biotype *pipiens*. The *C. p. pipiens* larvae and adults were raised in a secured insectarium (Baillarguet insectarium platform, Montpellier) at 27±1°C, 65±8% relative humidity, and a 14h light/10h dark photoperiod. After egg-hatching, approximately 500 larvae per tray were randomly dispatched into three to five plastic trays containing 1 liter of tap water and fed with Tetramin fish granules. At emergence, adults were fed *ad libitum* with a 5% honey solution and maintained in 30x30x30 cm cages. The day before blood feeding, mosquitoes were starved by removing the honey solution.

Viral strains

Two USUV isolates were used, the first belonging to the Europe 2 lineage (EU2, Accession Number [AN]: MT784899) and the second to the EU3 lineage (AN: KX601690) (Lecollinet *et al.*, 2016). They were isolated after three passages on VERO cells (ATCC CCL-81) and one on C6/36 cells (ATCC CRL-1660). All virus stocks were then amplified on Vero cells in MEM media, and the supernatants stored at -80°C until experimental infections. EU2 and EU3 virus stocks were titrated to $10^{7.2}$ $TCID_{50}$/mL and $10^{6.8}$ $TCID_{50}$/ml, respectively (Tissue Culture Infectious Dose 50), using the SpearmanKärber method (Kärber, 1931).

Vector competence analysis :

Total RNA was extracted using the KingFisher Flex automat and the NucleoMag RNA isolation kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer protocols with DNase treatment on individual saliva and thoraces but not on individual midguts to preserve DNA. Extracted nucleic acids were stored at -80°C. The detection and quantification of USUV viral genome was carried out by RT-qPCR as described in Prat *et al.* using the method developed by (Nikolay

et al., 2014) with the primer set: USUV-Forward (5'-AAAAATGTACGCGGATGACACA-3') and USUV-Reverse (5'-TTTGGCCTCGTTGTCAAGATC-3'). Vector competence was assessed based on several parameters: i) the prevalence of infection is the proportion of infected tissues among mosquitoes alive at 14 dpi (days post-infection), and ii) the viral load, is the number of virus genome copies per µL of extracted RNA in infected tissues. For a fine characterization of vector competence, we calculated the transmission efficiency (TE: the proportion of mosquitoes with infected saliva among all blood-fed mosquitoes), the dissemination efficiency (DE: the proportion of mosquitoes with infected thoraces among all blood-fed mosquitoes), the infection efficiency (IE: the proportion of mosquitoes with infected midguts among all blood-fed mosquitoes), the dissemination rate (DR: the proportion of mosquitoes with infected thoraces among mosquitoes with infected midguts), and the transmission rate (TR: the proportion of mosquitoes with infected saliva among mosquitoes with infected thoraces). The infection status of dead mosquitoes was determined by the detection of virus in the whole body by RT-qPCR.

Genotyping the vgsc locus, "kdr" L1014F mutation :

PASA (PCR Amplification of Specific Allele) diagnostic test was used to genotype the vgsc L1014F resistance mutation (Martinez-Torres *et al.*, 1998). Rather than a single combined PCR as described by these authors, we chose to perform two separate PCRs in parallel on each mosquito: (i) one for the susceptible S alleles (L1014, primers Cgd1, Cgd2 and Cgd3) amplifying a common fragment for all individuals and a specific fragment only if the mosquito carries at least one S allele and (ii) one for the resistance R allele (F1014, primers Cgd1, Cgd2 and Cgd4) amplifying a common fragment for all individuals and a specific fragment only if the mosquito carries at least one R allele; combining the two PCR thus allows distinguishing homozygotes from heterozygotes. PCR conditions were 1 min at 94 °C, 2 min at 48 °C and 2 min at 72 °C for 40 cycles.

Genotyping the ace-1 locus, G119S mutation :

PCR-RFLP (restriction fragment length polymorphism) diagnostic test was used to genotype the *ace-1* G119S resistance mutation (Weill *et al.*, 2004). An exon 3 174bp fragment encompassing the target site was amplified (primers CpEx3dir and CpEx3rev, PCR conditions: 30 s at 95 °C, 30 s at 52 °C and 1 min at 72 °C, for 30 cycles) and then digested by the restriction enzyme HaeIII, according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). The S allele is not digested, whereas the R allele is cleaved into two fragments, which allows distinguishing homozygotes and heterozygotes.

Genotyping the rdl locus :

A previously described PCR-RFLP test (Tantely *et al.*, 2010) was used to detect the A302S substitution in the *Rdl* gene in *Ae. albopictus* and *Cx. quinquefasciatus* specimens. Briefly, a 232 bp fragment of the *Rdl* gene was amplified by PCR with mqGABAdir (5′-TGTACGTTCGATGGGTTAT-3′) and mqGABArev (5′-CATGACGAAGCATGTGCCTA-3′) primers. A 30 cycle PCR (each composed of 94°C for 30 s, 52°C for 30 s, and 72°C for 1 min) was performed in the thermocycler using 1 µl (0.5 ng) of a genomic DNA solution in a 25 µl final volume reaction contained 9.5 µl of water, 12.5 µl of MasterMix (Applied Biosystems, Foster City) and 1 µl of each primer (10 µM). PCR products were digested for 3 h at 60°C with 1.5 U of BstAPI restriction endonuclease (New England Biolabs, Ipswich), which selectively cleaves the susceptible allele. DNA fragments were run on 2% agarose gel electrophoresis stained with 1X GelRedTM (Biotium Inc.) and visualized under ultraviolet light. On each gel, 3 control PCR-RFLP were included using DNA extracted from lab mosquito lines. Specifically, DNA template of mosquitoes from homozygous susceptible (SS), homozygous resistant (RR), and heterozygous (RS) lines were used.

Detection of the Ester2 Allele at the Ester Locus :

PCR-RFLP diagnostic test was used to genotype the individuals for the *Ester2* resistance allele (Berticat *et al.*, 2000) ; this test discriminates mutations specific to the Ester2 allele on both esterases A and B composing this superlocus. A first PCR amplifies an esterase A fragment (primers EstAdir and EstArev; PCR conditions: 30 s at 95 °C for, 30 s at 52 °C and 1 min at

72 °C, for 30 cycles), which is then digested by the restriction enzyme HaeIII according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). A second PCR amplifies an esterase B fragment (primers EstBdir and EstBrev; PCR conditions: 30 s at 95 °C for, 30 s at 52 °C and 1 min at 72 °C, for 30 cycles), which is then digested by the restriction enzyme HaeIII according to the manufacturer's instructions (New England Biolabs). When profiles from both A and B digested fragments correspond strictly to *Ester2* profiles, the individual is ruled a resistant homozygote; when both A and B digested fragments display *Ester2* profiles, but also other fragment sizes, the individual is ruled a heterozygote, when either A or B digested fragments (or both) do not display the Ester2.

Statistical analysis :

We study the effects of several explanatory variables: "lineage" (categorial variable with two levels: EU2 and EU3), "blood meal titer" (a categorical variable with two levels: low and high), "genotype" (categorical variable with three levels: SS, RS and RR), "multiresistance" (a numerical variable) and the "replicate" variable (a categorical variable with three levels). We computed generalized linear mixed effect models using the glmmTMB package (Brooks *et al.*, 2017) with i) a binomial error structure for analyzing the prevalence and ii) a negative binomial error structure for the viral load. Maximal models included the variables "lineage", "blood meal titer", "genotypes" or "multiresistance" and all their interactions. The "replicate" variable was used as a random variable to account for the nested data structure, i.e., the correlations between individuals from the same feeding experiment, and was either selected or removed based on the lowest AIC. All statistical analyses were conducted using the R software 4.2.0. The significance of variables and selection of the minimal model was assessed using the ANOVA procedure within the package car (An R Companion to Applied Regression, 2023), which performs type III hypothesis likelihood ratio tests (LRT). Mean parameter estimates were computed and post-hoc tests carried out to assess the differences between estimates with corrections for multiple comparisons using the package emmeans (Lenth *et al.*, 2023). Figures were plotted with ggplot2 (Wickham 2016).

Results

We genotyped the 340 individuals from our previous work by conventional PCR on four loci implicated in resistance: *kdr*, *ace-1*, *rdl* and *Est*. Then we investigated any correlation with the infection phenotypes in different mosquito tissues reflecting the evolution of the virus dissemination in the mosquito organism.

Briefly, we compared the vector competence of *Cx. pipiens* mosquitoes experimentally infected with two distinct USUV lineages (EU2 and EU3) and at two viral titers in the bloodmeal and based on three independent assays. The colony used in this study was sampled on September 2021 and blood-feeding assays were conducted on the 6th to the 12th generations. *Cx. pipiens* was equally susceptible to infection, measured as the presence of USUV RNA, by both lineages and whatever the bloodmeal titer but the infection rate was highly variable among blood feeding assays (ranged between from 0 to 0.928 depending on the lineage and the initial viral titer in the bloodmeal). Similar conclusion has been made for the dissemination efficiency however we showed lineage-specific difference in transmission efficiency of USUV by *Cx. pipiens*.

Figure 1 : Frequency of each genotype at each locus and between replicates

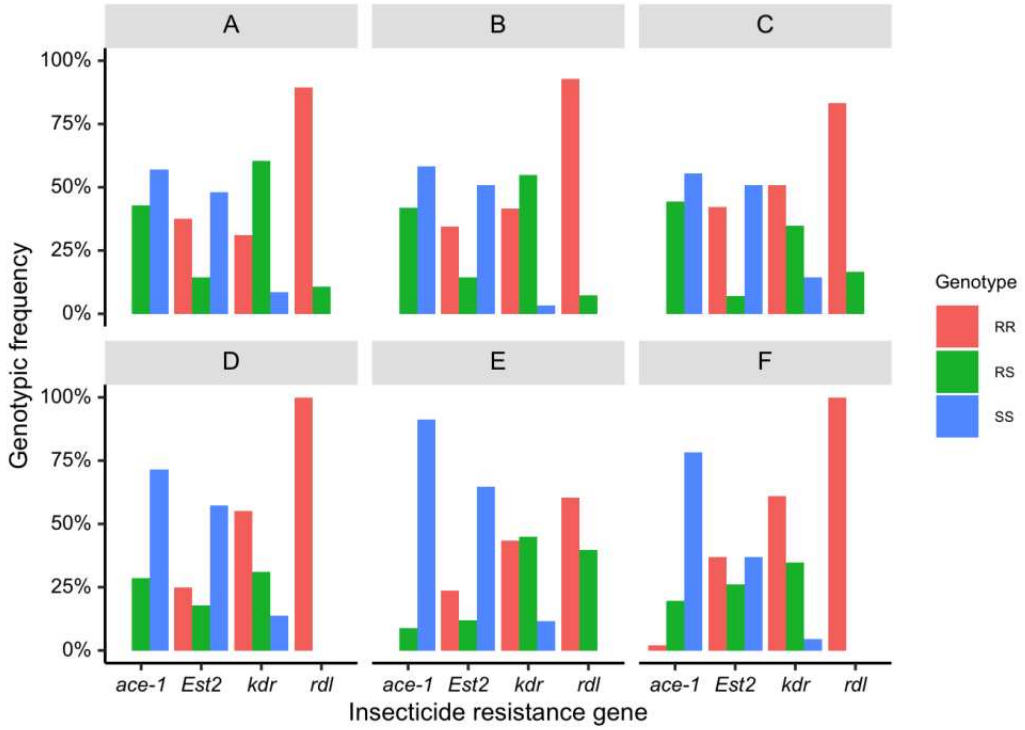


Diagram of genotype frequencies (y-axis) of each genotype across the 4 locus (x-axis) for the 6 replicates (panels A to C for low blood meal titer and D to F for high blood meal titer). Red bars are the homozygous resistant, green bar the heterozygous and blue bar the homozygous susceptible.

Figure 2 : Distribution of multiple resistance genotypes across all samples :

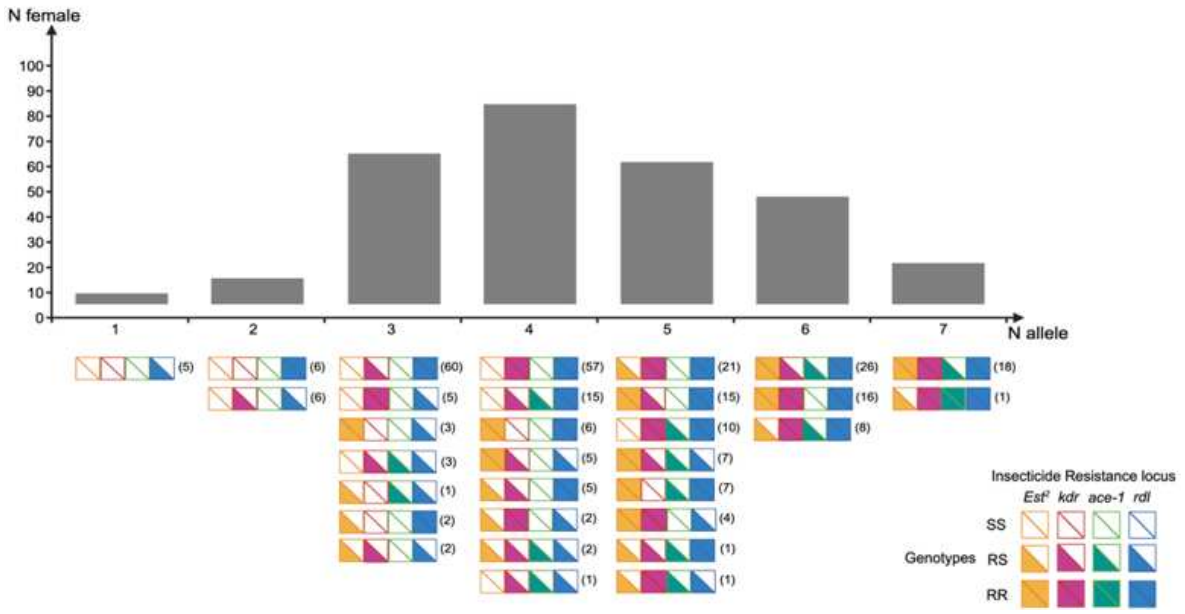


Diagram of multiple resistance genotype, the number of females in each genotype is represented on y-axis with the number of resistant allele across the 4 studied locus on x-axis. Number under brackets represent the number of females in each genotype.

Firstly, **Figure 1** shows the numbers of each genotype (SS, RS and RR) for each locus and for each replicate. The distribution of the number of resistance alleles per individual is shown in **Figure 2.** A number of alleles comprised different possible resistance combinations, these are detailed below the figure with the numbers. Analyses using genotypes are carried out for each insecticide resistance gene separately so as not to reduce the statistical power too much. We then analyzed the correlation of infection phenotypes with resistant genotypes at each locus separately. A significant influence of the “lineage:titer” interaction on the prevalence of infection, whatever the model studied, was observed indicating differences in prevalence depending on the viral titer in the bloodmeal and USUV lineage in the saliva but not in the midgut nor the thorax. The analyses showed a significant influence of the “lineage” variable on the prevalence in the midgut and saliva but not in the thorax. Analyzing the viral load showed a significant influence of the “lineage:titer” interaction in midgut and thorax. These results are consistent with those published previously and are provided as supplemental materials.

Est

Prevalence of infection in the midgut was significantly influenced by the genotypes at the *Est* locus (χ^2 = 7.176; p-value = 0.028), independently of lineage and the viral titer (Table 4). However, this was not the case in the thorax or saliva. Comparison of the mean prevalence in the midgut for each genotype showed a difference between homozygous resistant and homozygous susceptible individuals (RR: 55.8±17.4 %; RS: 40.1±19.4 %; SS: 33.9±15.5 **%;** RR vs. SS: p-value=0.02; RR vs. RS: p-value=0.46; RS vs. SS: p-value=0.86). Prevalence ranged from 0% to 72.3±20% in the thorax and 0% to 38.9% in saliva (p-value>0.05 for all comparisons between genotypes, **Figure S1A, S2D,S3D**).

Statistical analysis of the viral load in the midgut and thorax did not indicate a significant effect of *Est* genotypes alone (**Table 8**). However, the lineage: *Est* interaction had a significant effect on viral load in the saliva (χ^2 = 11.40; p-value = 0.003), with a significant difference between RR and SS individuals at EU3 high bloodmeal titer (p-value= 0.0001). (**Figures S4D, S5D, S6D**)

ace-1

For *ace-1*, no significant effect of the "genotype" variable alone or in interaction with the other variable have been observed in the midgut, thorax and saliva (Table 2). Prevalence in the midgut ranged from 0% to 77.2±20%, in the thorax from 0% to 72.1±20%, and in saliva from 0% to 47.9±20% (p-value>0.05 for all comparisons between genotypes) (**Figures S1B,S2B,S3B)**

Analysis of the viral load suggested that the *ace-1* genotype had a more complex influence. Viral load was correlated with *ace-1* genotypes in interaction with lineage and viral titer in the midgut and in the thorax (triple interaction line:titer:*ace-1* χ^2 = 4.408, p-value = 0.036 and χ^2 = 7.130, p-value = 0.008, respectively) **Table 6**. The analysis also revealed significant interactions of *ace-1* genotypes with the viral titer in the midgut and thorax (titer:*ace-1* χ^2 = 6.581, p-value = 0.010 and χ^2 = 14.88, p-value <0.001, respectively), as well as the interaction of *ace-1* genotype with the lineage in midgut, thorax and saliva (line:*ace-1* χ^2 = 4.535, p-value = 0.033 and χ^2 = 11.01, p-value <0.001 and χ^2 = 8.487, p-value = 0.004, respectively). Finally, *ace-1* genotypes had an effect on viral load independently of lineage and viral titer in midgut

and thorax (*ace-1*: χ^2 = 7.716, p-value = 0.005 and χ^2 =18.29, p-value <0.001, respectively) but not in the saliva (χ^2 =0.957; p-value = 0.328). Comparison of the viral load between genotypes in midgut and thorax indicated a significantly higher viral load in RS than in SS individuals infected with EU2 at high titer (midgut $RS_{EU2\text{-}High}$ = 4.83 $x10^8$±6.74 $x10^8$ copy/ml ; $SS_{EU2\text{-}High}$ = 3.19 $x10^{10}$±1.82 $x10^{10}$ copy/ml ; RS vs. SS : p-value = 0.005 ; thorax $RS_{EU2\text{-}High}$ = 2.67 $x10^7$±4.25 $x10^7$ copy/ml ; $SS_{EU2\text{-}High}$ = 3.54 $x10^{10}$±1.91 $x10^{10}$ copy/ml ; RS vs. SS : p-value < 0.001) (**Figures S4B,S5B,S6B)**

kdr

For *kdr*, no significant effect of the "genotype" variable alone or in interaction with the other variable have been observed in the midgut, thorax and saliva **Table** 1. Infection rate (USUV prevalence in midgut) for each group and genotype ranged from 18.2±17.1% to 66.2±22.7%, in the thorax from 12.2±11% to 55.9±23%, and in the saliva from 0% to 32.3% (p-value>0.05 for all comparisons between genotypes) **Figures S1C, S2A, S3A**

Statistical analysis of the viral load in the midgut and thorax did not indicate a significant effect of *kdr* genotypes alone of in interaction (**Table 5**). However, the lineage: *kdr* interaction had a significant effect on viral load in the saliva (χ^2 = 7.319; *p-value* = 0.026), with a significant different between RR and RS individuals at high bloodmeal titer (*p-value*<0.05). **Figures S4A, S5A, S6A**

rdl

For *rdl*, no significant effect of the "genotype" variable alone or in interaction with the other variable have been observed in the midgut, thorax and saliva **Table 3**. Prevalence in the midgut ranged from 12.5±10% to 73.8±20%, in the thorax from 13.7±10% to 69±20%, and in saliva from 0% to 25.6±20% (p-value>0.05 for all comparisons between genotypes) **Figures S1D, S2C, S3C**

Analyzing the viral load in the midgut and thorax, we observed no significant effect of *rdl* genotypes (χ^2 = 0.479, p-value = 0.489 and χ^2 = 1.562, p-value = 0.211, respectively). However,

the *rdl* genotypes had a significant effect on viral load in the saliva (*rdl* χ^2 = 6.158; p-value = 0.013) **Table 7**, with a significant difference between RR and RS individuals at high bloodmeal titer (EU2 : p-value=0.02 EU3 : p-value = 0.03). **Figures S4C, S5C, S6C**

Multiresistance

We have tested whether infection phenotypes could be correlated with the presence of several resistance mechanisms within the same individual. To do this, we determined the number of resistance alleles for each individual, assuming that for each locus there were only two alleles for simplification (one per chromosome).

Statistical analysis revealed a significant influence of viral lineage and of the lineage:titer interaction on USUV prevalence in saliva (χ^2 = 4.879, p-value = 0.027 and χ^2 = 7.899, p-value = 0.0049, respectively **Table 9**) as shown previously (Prat *et al.* 2024). We also observed a significant effect of the interaction between the number of resistance alleles and the viral lineage on the USUV prevalence in thorax only (lineage: multi χ^2 = 4.436; p-value= 0.035 **Table 9**). shows a positive correlation between the number of resistant alleles and the prevalence for the EU3 lineage at high titer and for both lineages a low titer, in the midgut and the thorax. **(Figures S7, S8, S9)**

Analyzing the effect of the number of resistant alleles on viral load indicated only a significant effect of the lineage: titer interaction in the midgut (χ^2 = 150.8, p-value < 0.001) and the thorax (χ^2 = 89.89, p-value < 0.001) but not in the saliva (χ^2 = 1.477, p-value = 0.224) **Table 10**. However, in saliva, we observed a significant effect of the viral titer (χ^2 = 11.07, p-value < 0.001), the lineage (χ^2 = 14.33, p-value< 0.001) and the number of resistant alleles (χ^2 = 8.209, p-value= 0.0042) independently on viral load (**Table 10**). Viral load was positively correlated with the number of resistance alleles in saliva, irrespective of the lineage and viral titer: an increase in viral load in saliva was associated with a higher number of resistant alleles, ranging from 10^2 copy/ml for 2 resistance alleles to 10^5 copy/ml for 7 resistance alleles **(Figure S12)**. In contrast, no such correlation was observed in the midgut and thorax (p-value >0.05). (**Figures S10, S11).**

Discussion

The aim of this study was to analyze whether insecticide resistance genotypes are linked to variations of the prevalence of infection and viral load in *Cx. pipiens* reported recently (Prat *et al.* 2024). Insecticide resistance has been shown to affect vector competence for distinct types of pathogens and mosquito species, i.e. the filarial parasite *W. bancrofti* (McCarroll and Hemingway, 2002), the malaria parasite *P. falciparum* (Alout et al; 2013, Ndo *et al.* 2019) and the arbovirus West Nile and Zika (Atyame *et al.* 2019; Parker-Crockett *et al.* 2021). No general conclusion can be drawn and this effect appeared to be dependent of the pathogens and the insecticide resistance mechanisms within one mosquito species as well as the experimental design. Here we genotyped *Culex pipiens* mosquitoes from a membrane feeding assays involving Usutu virus on four loci involved in insecticide resistance. The *Cx. pipiens* colony used were established in the insectary from a natural population 6 to 12 generations before performing the USUV infections. During this time period, the frequency of each resistant allele did not vary significantly (supp data) but most of individuals were resistant at least on one locus (*rdl* locus).

Our first attempt was to analyze the association between infection and each resistance mechanism separately. All analyses indicated the previously shown interactions between USUV lineage and bloodmeal titer on the prevalence in saliva, and on viral load in the midgut and thorax (Prat *et al.* 2024). For all target site resistance mechanisms (*ace-1, kdr, rdl*), no significant effect of resistant genotypes was observed on USUV prevalence in either mosquito tissues.

In contrast, resistant homozygotes at the *Est* locus were associated with increased USUV prevalence in midgut but not in thorax and saliva. This result suggests that metabolic resistance may be associated with greater susceptibility to USUV infection and could indicate a common biological function between the processes involving the carboxylesterases and those involved in the response to infection. Consistently, the *Est* gene is preferentially expressed in organs mainly found in the mosquito abdomen (Pasteur *et al.*, 2001). In addition, *Est* homozygous resistant individuals appeared significantly associated with a greater USUV viral load in the saliva, suggesting a greater replication of USUV EU2 in saliva. However, caution should be taken because the number of infected saliva in general is low reducing statistical power.

The analysis of the viral load showed no impact of *kdr, rdl* and *Est* genotypes in midgut and thorax in contrast to *ace-1* genotypes. Only *ace-1* heterozygous individuals have shown a higher viral load for the EU2 lineage in midgut and thorax compared to the susceptible individuals suggesting that resistance at the *ace-1* locus might be associated with a lower permissiveness to USUV replication but there were no resistant homozygous individuals in our sample to robustly test its effect.

Resistance at the ace-1 locus has been demonstrated to impact for the first time the vector competence of *Cx. quinquefasciatus* to West Nile virus and was associated with a greater viral load in the midgut only (Atyame *et al.,* 2019). Comparisons between WNV and USUV are frequently made, as these avian arboviruses have a large number of features in common and are known to co-occur in some geographical areas, particularly in Europe (Zannoli and Sambri, 2019). We would have expected to observe similar results in our experimental conditions, i.e. an increase in the rate of dissemination (thorax) and transmission efficiency (saliva) (Atyame *et al.* 2019). It suggests that the effect of resistance genes on vector competence depends on the specificity of the vector-pathogen interactions (i.e. the species and their environment) and the experimental conditions.

In mosquito saliva, the analysis showed an impact of all resistance mechanisms on USUV viral load. *Rdl* resistant mutation was associated with a higher viral load regardless of the viral lineage while *kdr*, *ace-1* and *Est* mediated-resistance were associated with a higher viral load for the EU3 lineage only. These results suggest a better USUV replication in salivary glands of resistant mosquito. Variations in viral load may not impact directly the vector competence however increasing the number of viral particles in the saliva will increase the probability of viral inoculation and of initiating an infection in the vertebrate host.

We then tested whether multiple resistance within one individual could have impacted its vector competence. We first showed that the number of resistant alleles had no impact on the prevalence of USUV in midgut and saliva, but a positive correlation with the prevalence of USUV EU3 lineage in the thorax only. This suggests that combination of several resistant alleles increased the probability of dissemination of USUV, particularly the EU3 lineage. In addition, we observed a positive association between the number of resistant alleles and the viral load in the saliva only rega*rdl*ess of the lineage. Close observation of the data on saliva indicated an uneven distribution of the number of resistant alleles in infected between USUV lineage. This structured distribution did not allow for robustly compare the impact of resistance

but we hypothesized that it could probably be the result of a differential impact of resistance between lineages. Indeed, **Figure S12** shows that, at low and high titers, EU3 competent individuals have more resistance alleles than those competent for EU2, which would indicate a greater capacity for EU3 to cross the salivary glands epithelium and multiply salivary gland cells of resistant mosquito than the more susceptible ones. Another hypothesis may be an indirect impact on one or more several life history traits depending whether multiple resistance bear a fitness cost or an advantage. For instance, highly resistant individuals may die earlier from EU2 infection and dissemination compared to EU3, consistent with a cost specifically on EU2 infected individuals. Conversely, multiple resistance may provide an advantage in EU3 infected individuals resulting in higher mortality of weakly resistant individuals from EU3 infection before the virus reaches the saliva.

The major limitation of this study was the uneven number of resistant genotypes that reduce the statistical power. The correlation in our experimental conditions between insecticide resistance and USUV infection should thus be taken with caution. Here we have genotyped individuals after the completing the membrane feeding assays. It would be interesting to rather use introgressed colonies, i.e. susceptible and resistant colonies sharing the same genetic background and differing only in the genomic region containing the resistance gene of interest (Vézilier *et al.*, 2010; Alout *et al.*, 2013; Atyame *et al.*, 2019). However, establishing all multi-resistant colonies with similar genetic background to perform a comparative analysis would help increase statistical power and test the causal role of insecticide resistance.

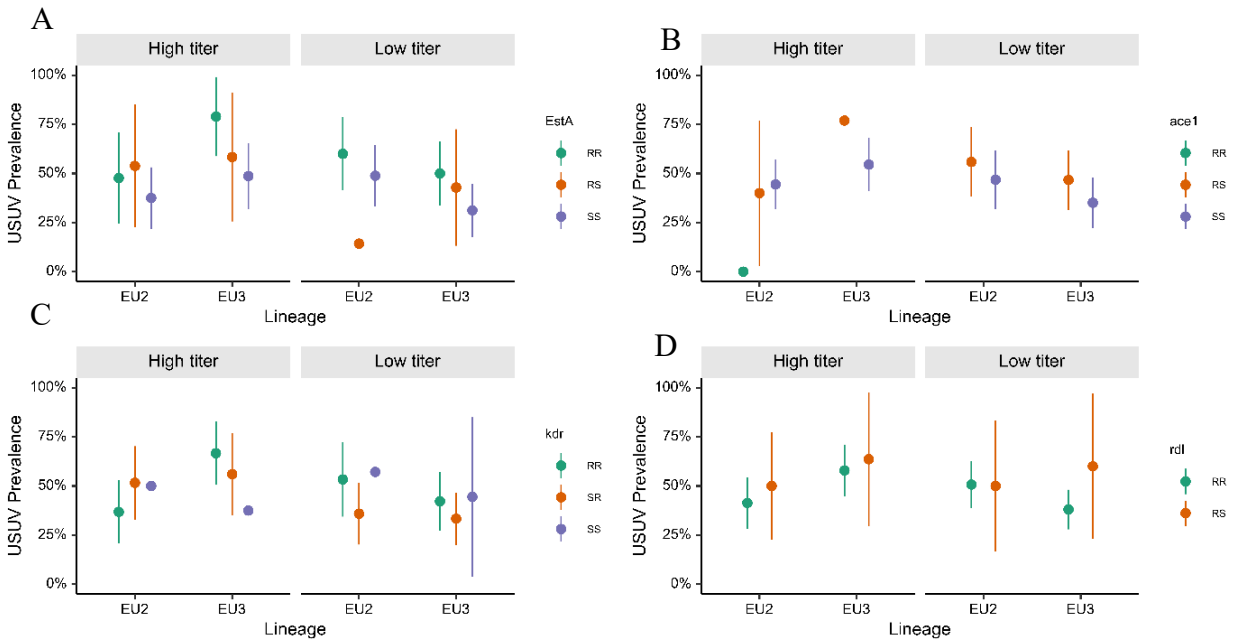
It could also be interesting to use these colonies to reproduce experimental infections using the same lineages and doses to analyse other life history traits involved in vector competence, such as the extrinsic incubation time of the pathogen. In our study, it was set at 14 days, corresponding to the average time required for flaviviruses to multiply and disseminate to the vector saliva. However, a fixed time, leads to an information loose about individuals with longer or shorter times. Studies propose to carry out analyses on individuals at days 7, 10, 14 and 21 post-infections to better understand viral dynamics in mosquitoes.

Conclusion

Insecticide resistance is a threat to vector control programs based on the use of insecticide molecules. Unfortunately, there is an increasing worry on the insecticide resistance to enhance the replication, dissemination and transmission of pathogens in mosquito vectors. This study showed that the *Est* gene implicated in metabolic resistance increased the infection rate of mosquitoes, unlike the *kdr*, *ace-1* and *rdl* genes, all implicated in target-site resistance, for which no effect was observed on prevalence. However, all resistant genes had a lineage-specific impact on viral load. This study also highlighted a cumulative effect of insecticide resistant alleles, showing that resistance mechanisms interplay to influence vector competence. These results stress the need to evaluate in the field the control vector progam, because instead of stopping the spread of arboviroses, resistance to insecticide could have the opposite effect.

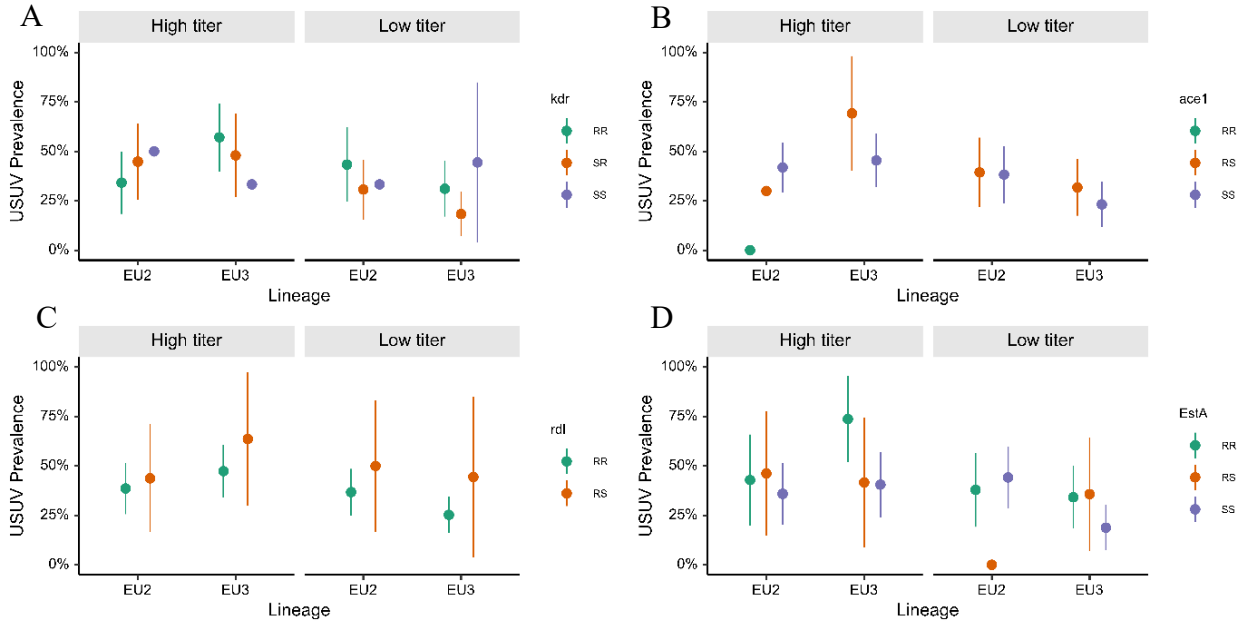
Supplementary figures :

Figure S1 : Prevalence in midguts, fill by infection conditions and resistance genotype :



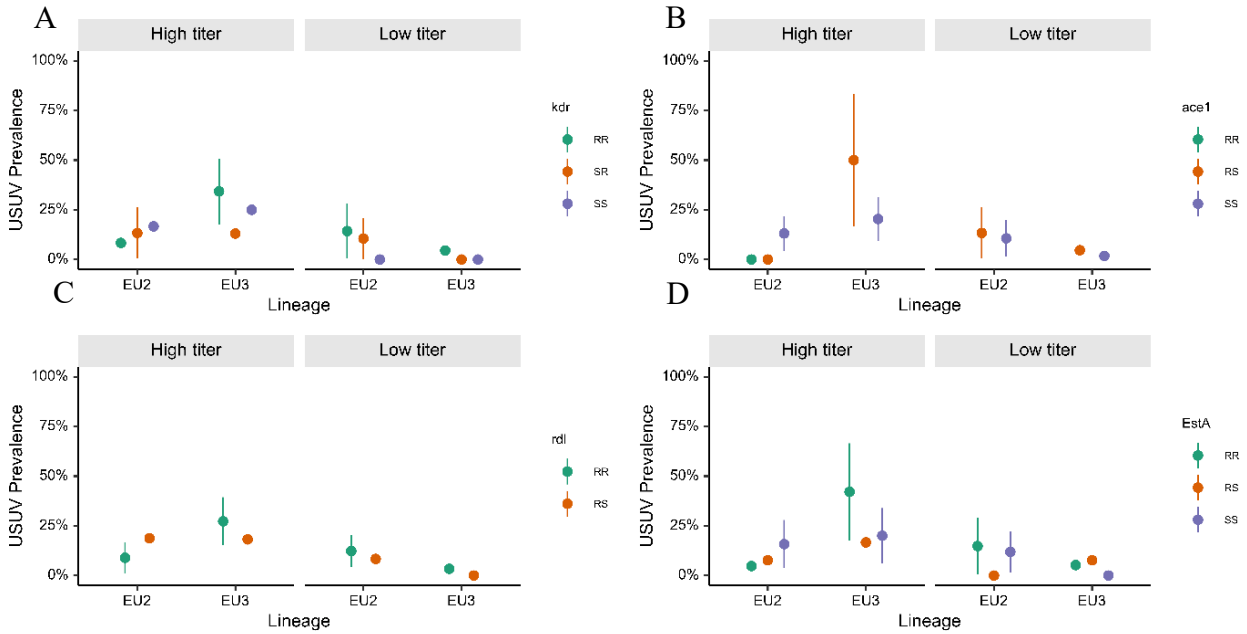
Prevalence of Usutu virus in midguts at different locus. A) *Est*; B) *ace-1*; C) *kdr* and D) *rdl*. With purple dots the SS orange dots the RS and green dots the RR genotypes Bars represent standard error.

Figure S2 : Prevalence in thorax, fill by infection conditions and resistance genotype :



Prevalence of Usutu virus in thorax at different locus. A) *kdr*; B) *ace-1*; C) *rdl* and D) *Est*. With purple dots the SS orange dots the RS and green dots the RR genotypes Bars represent standard error.

425 Figure S3 : Prevalence in saliva, fill by infection conditions and resistance genotype :

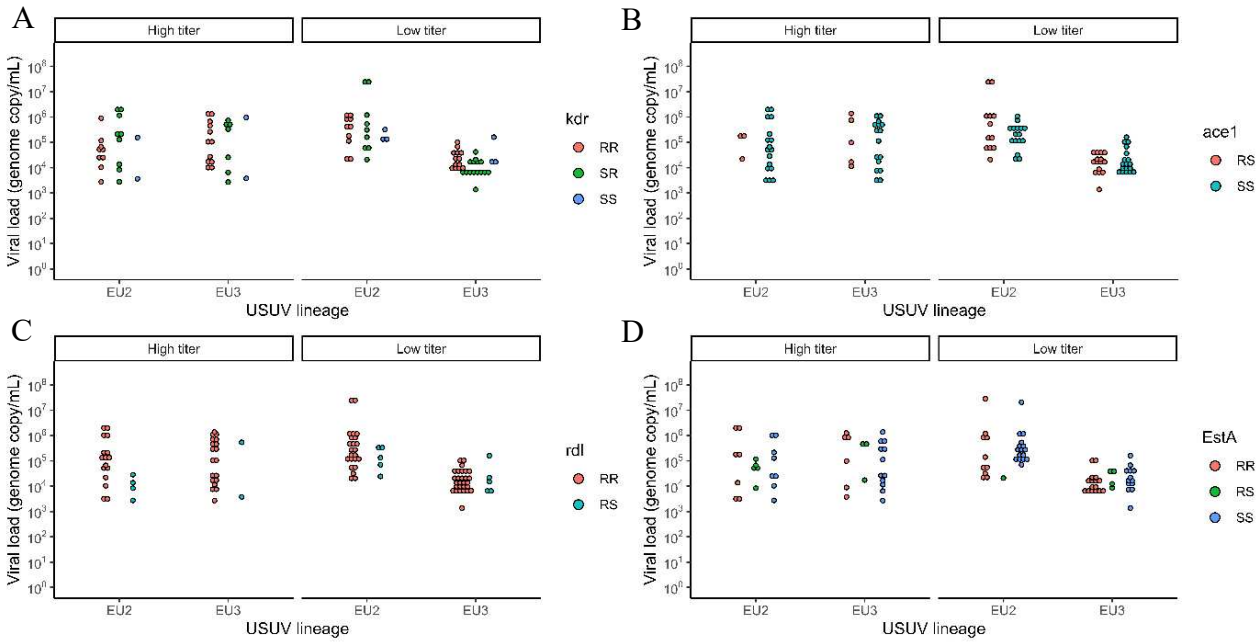


426 Prevalence of Usutu virus in saliva at different locus. A) *kdr*; B) *ace-1*; C) *rdl* and D) *Est*. With purple
427 dots the SS orange dots the RS and green dots the RR genotypes Bars represent standard error.

428

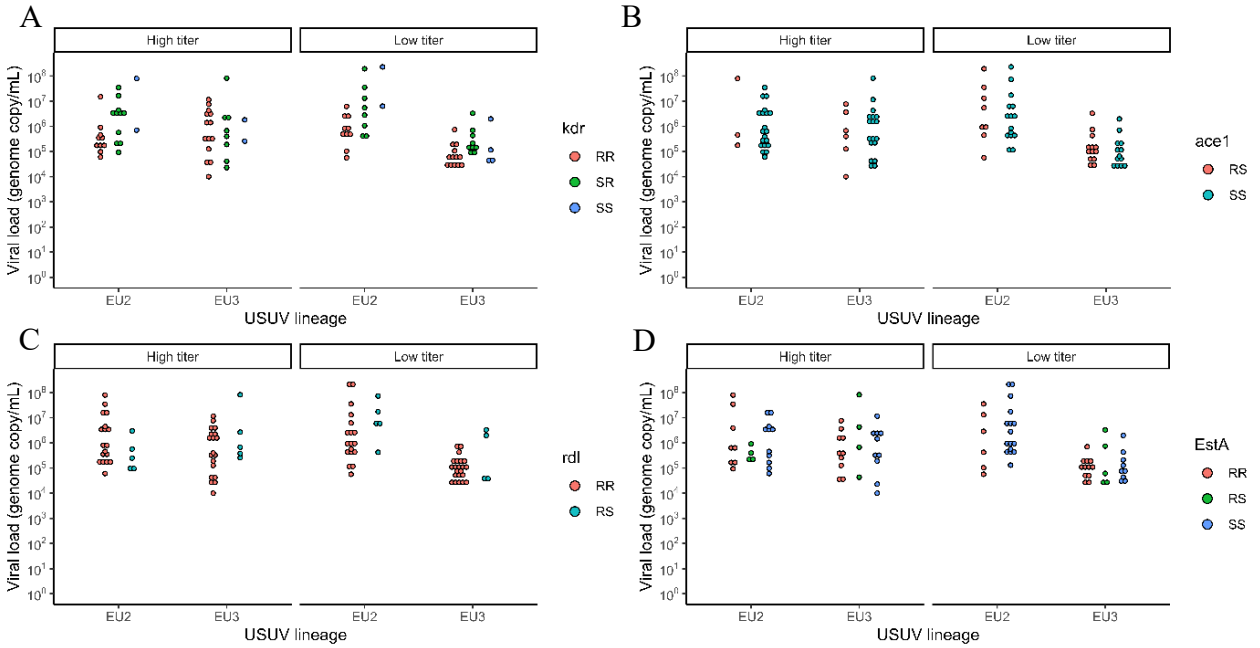
429

Figure S4 : Viral genome load in midguts, fill by infection conditions and resistance genotype :



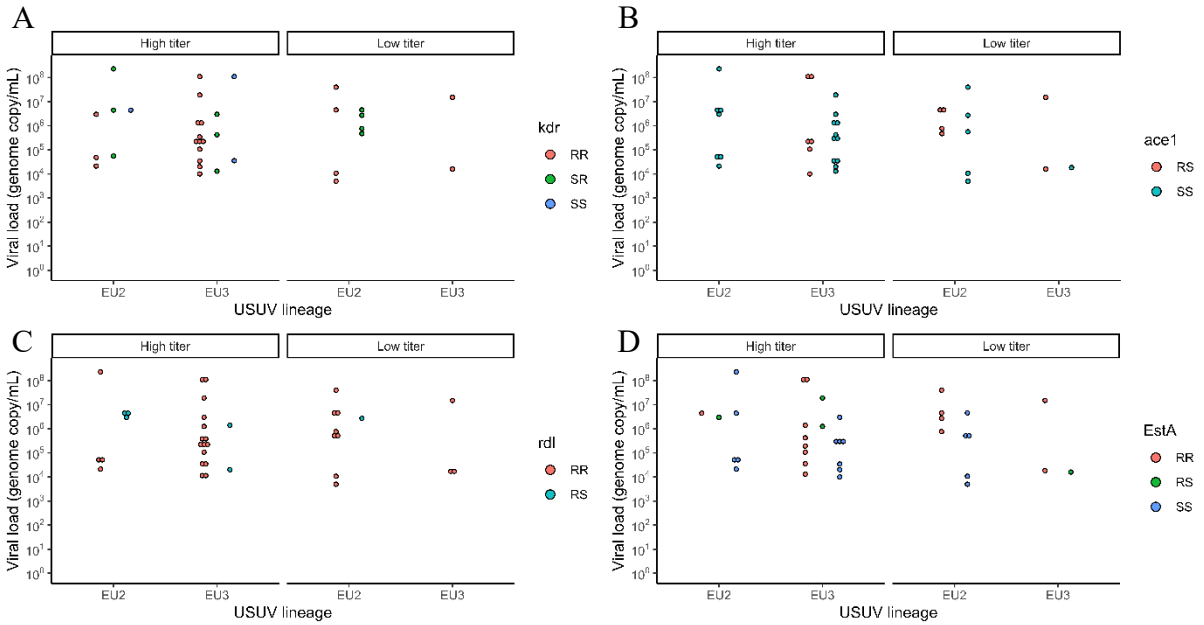
Viral genome load of Usutu virus in midguts at different locus. A) *kdr*; B) *ace-1*; C) *rdl* and D) *Est*. With blue dots the SS, green dots the RS and orange dots the RR genotypes.

Figure S5 : Viral genome load in thorax, fill by infection conditions and resistance genotype :



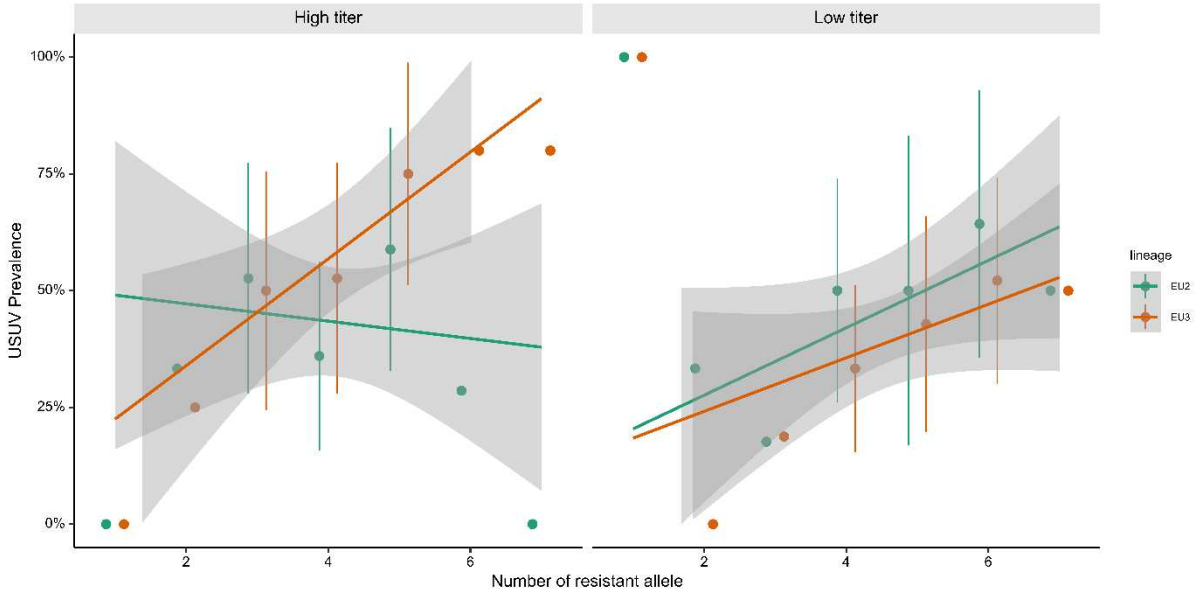
Viral genome load of Usutu virus in midguts at different locus. A) *kdr*; B) *ace-1*; C) *rdl* and D) *Est*. With blue dots the SS, green dots the RS and orange dots the RR genotypes.

Figure S6 : Viral genome load in saliva, fill by infection conditions and resistance genotype :



Viral genome load of Usutu virus in midguts at different locus. A) *kdr*; B) *ace-1*; C) *rdl* and D) *Est*. With blue dots the SS, green dots the RS and orange dots the RR genotypes.

446 Figure S7 : Prevalence USUV in the midguts, for multiple resistance



447

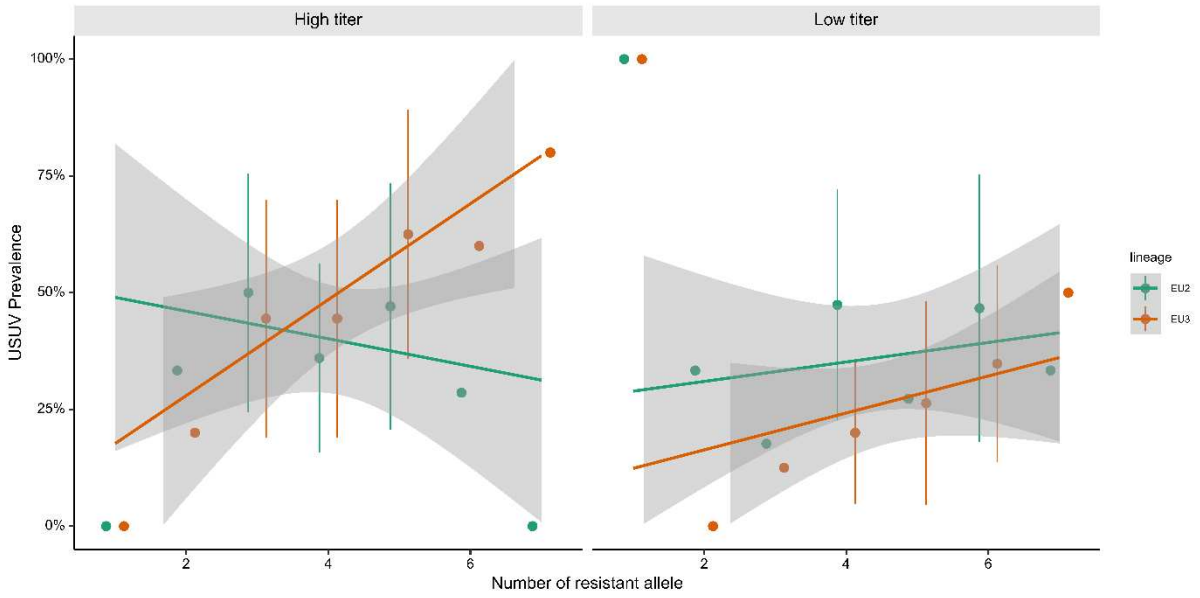
448 Green points corresponding to EU2 and orange points to EU3. Grey area is the 95%CI.

449

450

451

452 Figure S8 : Prevalence USUV in the thorax, for multiple resistance

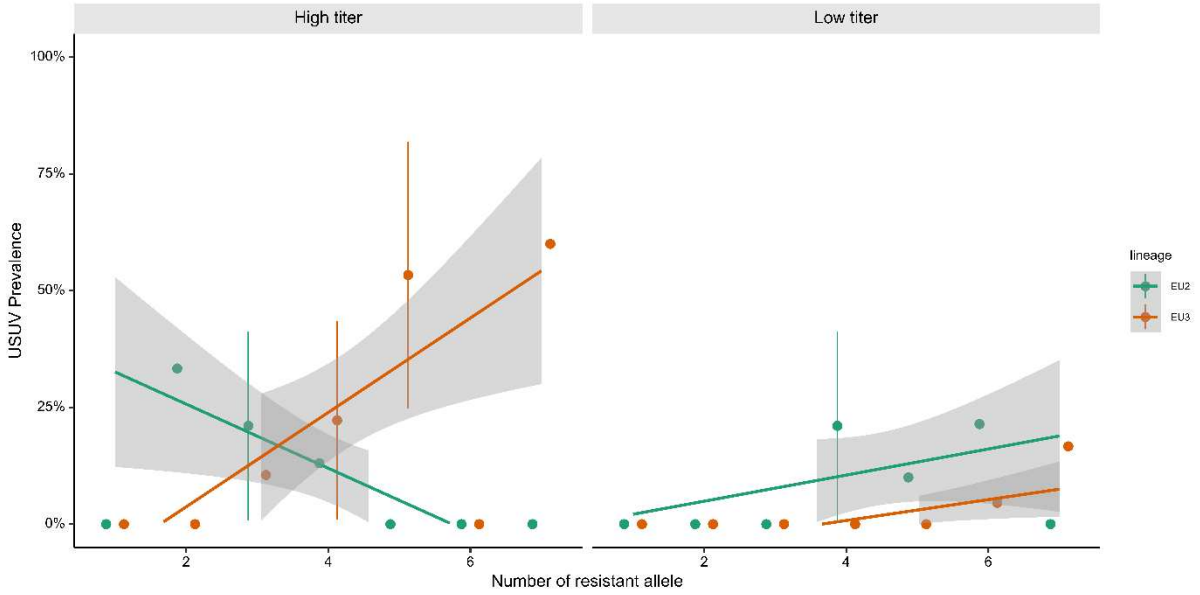


453

454 Green points corresponding to EU2 and orange points to EU3. Grey area is the 95%CI.

455

456 Figure S9 : Prevalence USUV in the saliva, for multiple resistance



457

458

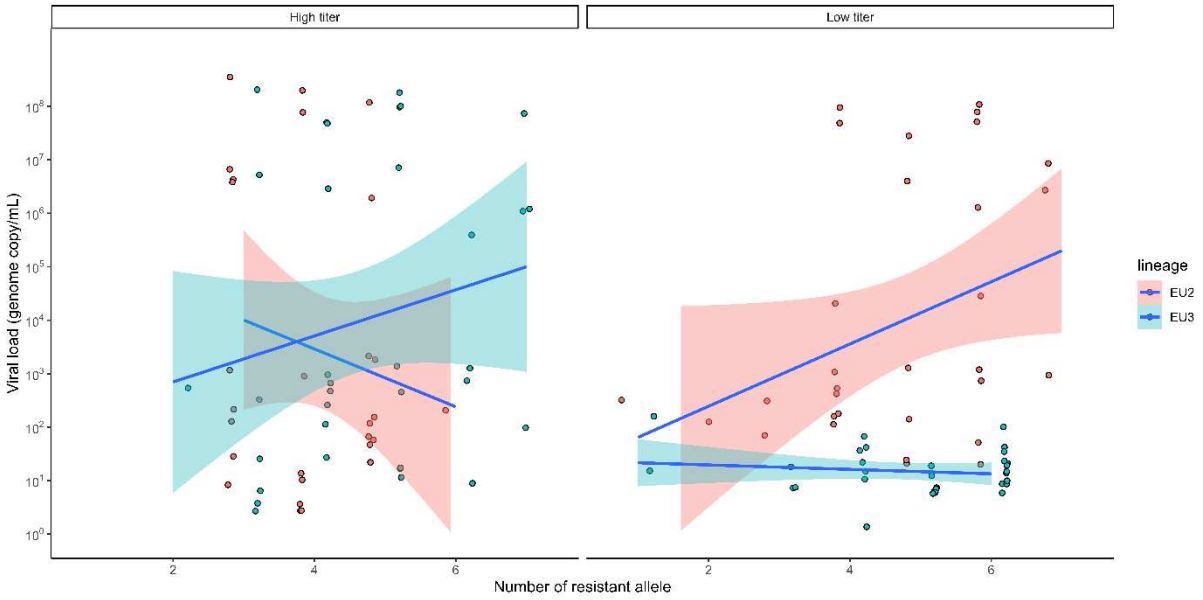
459 Green points corresponding to EU2 and orange points to EU3. Grey area is the 95%CI.

460

461

462

463 Figure S10 : USUV viral genome load in the midguts, for multiple resistance



464

465 Red points corresponding to EU2 and blue points to EU3. Colored areas are the 95%CI.

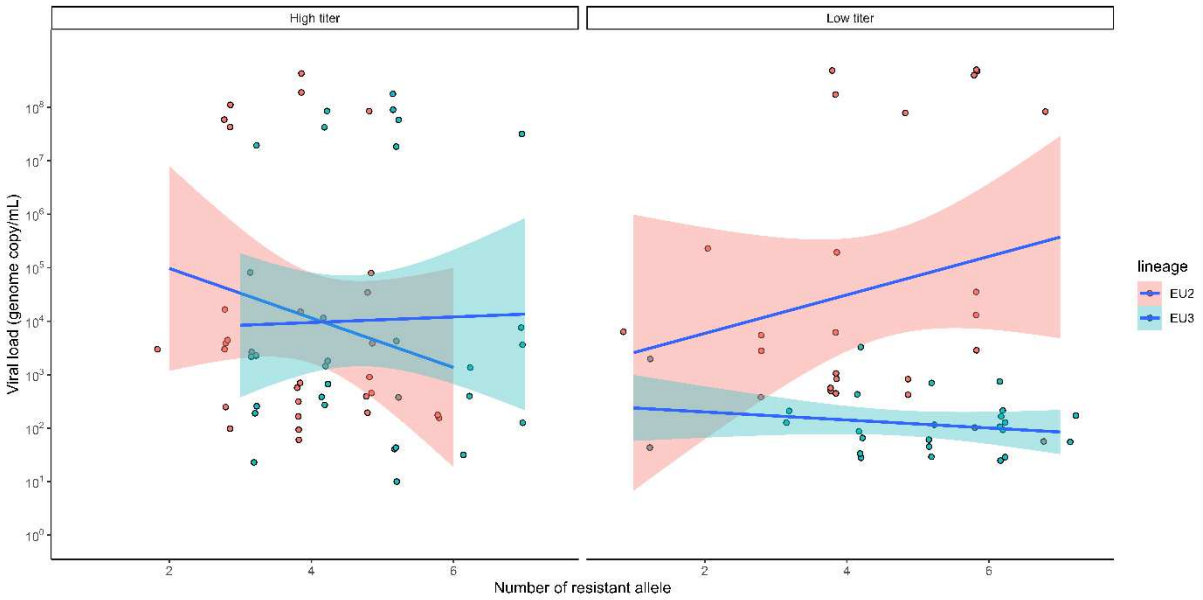
466

467

468

469

470 Figure S11 : USUV viral genome load in the thorax, for multiple resistance

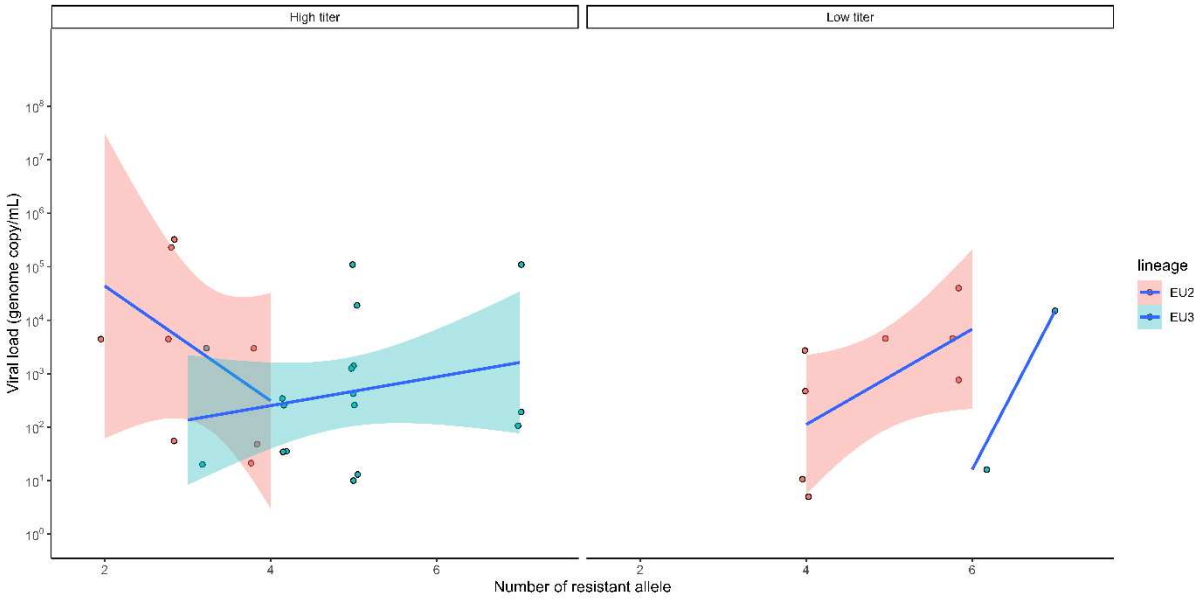


471

472 Red points corresponding to EU2 and blue points to EU3. Colored areas are the 95%CI.

473

474 Figure S12 : USUV viral genome load in the saliva, for multiple resistance



475

476 Red points corresponding to EU2 and blue points to EU3. Colored areas are the 95%CI.

477

Supplementary Tables :

Interactions between genotypes for each resistance gene, and prevalence in each tissue.

For each tissue (midguts, thorax and saliva), an ANOVA was performed between different variables. The continuous variable here is the prevalence in the various tissues, and the explanatory variables are the lineage (EU2/EU3), the titer (high or low), the resistance gene, and their potential interactions (characterised by ":"). The parameters obtained are: the χ^2 , corresponding to the Chi-squared test, the df corresponding to the degrees of freedom and finally the p-value, the critical probability, which at an α risk of 5%.

Table 1
kdr

Explanatory variables	**Midgut** Transmission rate			**Thorax** Dissemination efficiency			**Saliva** Transmission efficiency		
	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	4.092	1	**0.043**	_	_	_	4.819	1	**0.028**
Titer	0.499	1	0.480	1.085	1	0.298	0.097	1	0.756
kdr	1.268	2	0.530	0.095	2	0.954	1.229	2	0.541
Lineage : Titer	0.222	1	0.637	_	_	_	7.607	1	**0.006**

Table 2
ace-1

Explanatory variables	**Midgut** Transmission rate			**Thorax** Dissemination efficiency			**Saliva** Transmission efficiency		
	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	3.540	1	**0.060**	2.211	1	0.137	4.698	1	**0.030**
Titer	0.480	1	0.488	1.062	1	0.303	0.408	1	0.523
ace1	2.999	2	0.223	1.144	2	0.565	1.424	2	0.491
Lineage : Titer	0.129	1	0.719	0.086	1	0.769	6.305	1	**0.012**

Table 3
rdl

Explanatory variables	**Midgut** Transmission rate			**Thorax** Dissemination efficiency			**Saliva** Transmission efficiency		
	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	4.174	1	**0.041**	2.721	1	0.099	5.125	1	**0.024**
Titer	0.319	1	0.572	0.884	1	0.347	0.233	1	0.630
rdl	1.236	1	0.266	2.346	1	0.126	0.047	1	0.829
Lineage : Titer	0.103	1	0.749	0.113	1	0.737	6.327	1	**0.012**

Table 4
Est

Explanatory variables	**Midgut** Transmission rate			**Thorax** Dissemination efficiency			**Saliva** Transmission efficiency		
	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	4.182	1	**0.041**	2.602	1	0.107	4.997	1	**0.025**
Titer	0.361	1	0.548	0.974	1	0.324	0.270	1	0.603
Est²	7.176	2	**0.028**	2.422	2	0.298	1.445	2	0.486
Lineage : Titer	0.054	1	0.816	0.115	1	0.734	6.439	1	**0.011**

487

Interactions between the genotypes for each resistance gene and the viral load in each tissue.

Table 5
kdr

	Midgut			Thorax			Saliva		
Explanatory variables	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	0.013	1	0.911	0.602	1	0.438	0.033	1	0.855
Titer	1.070	1	0.301	1.385	1	0.239	0.482	1	0.487
kdr	0.286	2	0.867	0.004	2	0.998	2.377	2	0.305
Lineage : Titer	167.7	1	**< 2.00E-16**	123.5	1	**< 2.00E-16**	_	_	_
Lineage : kdr	_	_	_	_	_	_	7.319	2	**0.026**

Table 6
ace-1

	Midgut			Thorax			Saliva		
Explanatory variables	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	4.813	1	**0.028**	10.471	1	**0.001**	0.289	1	0.591
Titer	4.644	1	**0.031**	21.20	1	**4.140E-06**	5.853	1	**0.016**
ace-1	7.716	1	**0.005**	18.29	1	**1.898E-05**	0.957	1	0.328
Lineage : Titer	77.72	1	**< 2.00E-16**	71.96	1	**< 2.2E-16**	_	_	_
Lineage : ace -1	4.535	1	**0.033**	11.01	1	**0.0009**	8.487	1	**0.004**
Titer : ace-1	6.581	1	**0.010**	14.88	1	**0.0001**	_	_	_
Lineage : Titer : ace-1	4.408	1	**0.036**	7.130	1	**0.008**	_	_	_

Table 7
rdl

	Midgut			Thorax			Saliva		
Explanatory variables	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	0.055	1	0.815	0.973	1	0.324	3.820	1	0.051
Titer	1.458	1	0.227	1.621	1	0.203	5.013	1	**0.025**
rdl	0.479	1	0.489	1.562	1	0.211	6.158	1	**0.013**
Lineage : Titer	169.2	1	**< 2.00E-16**	127.3	1	**< 2.00E-16**	0.485	1	0.486

Table 8
Est

	Midgut			Thorax			Saliva		
Explanatory variables	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	0.111	1	0.739	1.046	1	0.307	0.016	1	0.899
Titer	1.341	1	0.247	0.904	1	0.342	0.191	1	0.662
Est²	0.313	2	0.855	1.100	2	0.577	3.288	2	0.193
Lineage : Titer	127.6	1	**< 2.00E-16**	91.53	1	**< 2.00E-16**	_	_	_
Lineage : Est²	_	_	_	_	_	_	11.40	2	**0.003**
Titer : Est²	_	_	_	_	_	_	5.299	2	0.071

493 Interactions of multiresistance with the prevalence and viral load in each tissue.
494
495 *Table 9* : Analysis of variance of the prevalence of infection in different tissues as a function of
496 multiple resistance.

497

	Midgut infection rate			**Thorax** dissemination efficiency			**Saliva** transmission efficiency		
Explanatory variables	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	0.618	1	0.432	1.831	1	0.176	4.879	1	**0.027**
Titer	0.445	1	0.505	0.786	1	0.375	0.122	1	0.727
Multiresistance	0.304	1	0.582	0.287	1	0.592	1.805	1	0.179
Lineage : Titer	0.013	1	0.908	0.352	1	0.553	7.899	1	**0.0049**
Lineage : multi	2.702	1	0.100	4.436	1	**0.035**	_	_	_

498
499
500

501 *Table 10* : Analysis of variance of the viral load of infection in different
502 tissues as a function of multiple resistance.

503

	Midgut			**Thorax**			**Saliva**		
Explanatory variables	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value	χ^2	df	p-value
Lineage	0.019	1	0.891	0.739	1	0.390	14.33	1	**0.00015**
Titer	0.448	1	0.503	1.351	1	0.245	11.07	1	**0.00088**
Multiresistance	0.193	1	0.660	0.0008	1	0.978	8.209	1	**0.0042**
Lineage : Titer	150.8	1	< **2.00E-16**	89.89	1	< **2.00E-16**	1.477	1	0.224

504

References :

Alout, H., Ndam, N. T., Sandeu, M. M., Djégbe, I., Chandre, F., Dabiré, R. K., Djogbénou, L. S., Corbel, V. and Cohuet, A. (2013). Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of Anopheles gambiae s.s. for Plasmodium falciparum Field Isolates. *PLOS ONE* **8**, e63849. doi: 10.1371/journal.pone.0063849.

An R Companion to Applied Regression (2023). *SAGE Publications Inc*.

Atyame, C. M., Alout, H., Mousson, L., Vazeille, M., Diallo, M., Weill, M. and Failloux, A.-B. (2019). Insecticide resistance genes affect Culex quinquefasciatus vector competence for West Nile virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**, 20182273. doi: 10.1098/rspb.2018.2273.

Bahnck, C. M. and Fonseca, D. M. (2006). Rapid assay to identify the two genetic forms of Culex (Culex) pipiens L. (Diptera: Culicidae) and hybrid populations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **75**, 251–255.

Berticat, C., Dubois, M.-P., Marquine, M., Chevillon, C. and Raymond, M. (2000). A molecular test to identify resistance alleles at the amplified esterase locus in the mosquito Culex pipiens. *Pest Management Science* **56**, 727–731. doi: 10.1002/1526-4998(200009)56:9<727::AID-PS214>3.0.CO;2-I.

Brooks, M., E., Kristensen, K., Benthem, K., J. ,van, Magnusson, A., Berg, C., W., Nielsen,

A., Skaug, H., J., Mächler, M. and Bolker, B., M. (2017). glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal* **9**, 378. doi: 10.32614/RJ-2017-066.

Cadar, D., Becker, N., Campos, R. de M., Börstler, J., Jöst, H. and Schmidt-Chanasit, J. (2014). Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 1771–1773. doi: 10.3201/eid2010.140909.

Diagne, M. M., Ndione, M. H. D., Di Paola, N., Fall, G., Bedekelabou, A. P., Sembène, P. M., Faye, O., Zanotto, P. M. de A. and Sall, A. A. (2019). Usutu Virus Isolated from Rodents in Senegal. *Viruses* **11**, 181. doi: 10.3390/v11020181.

Durand, B., Haskouri, H., Lowenski, S., Vachiery, N., Beck, C. and Lecollinet, S. (2016). Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiology and Infection* **144**, 1857–1864. doi: 10.1017/S095026881600011X.

Kabula, B., Tungu, P., Rippon, E. J., Steen, K., Kisinza, W., Magesa, S., Mosha, F. and Donnelly, M. J. (2016). A significant association between deltamethrin resistance, Plasmodium falciparum infection and the Vgsc-1014S resistance mutation in Anopheles gambiae highlights

the epidemiological importance of resistance markers. *Malaria Journal* **15**, 289. doi: 10.1186/s12936-016-1331-5.

Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **162**, 480–483. doi: 10.1007/BF01863914.

Lecollinet, S., Blanchard, Y., Manson, C., Lowenski, S., Laloy, E., Quenault, H., Touzain, F., Lucas, P., Eraud, C., Bahuon, C., Zientara, S., Beck, C. and Decors, A. (2016). Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerging Infectious Diseases* **22**, 2225. doi: 10.3201/eid2212.161272.

Lenth, R. V., Bolker, B., Buerkner, P., Giné-Vázquez, I., Herve, M., Jung, M., Love, J., Miguez, F., Riebl, H. and Singmann, H. (2023). emmeans: Estimated Marginal Means, aka Least-Squares Means.

Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Bergé, J. B., Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N. and Pauron, D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s. *Insect Molecular Biology* **7**, 179–184. doi: 10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x.

McCarroll, L. and Hemingway, J. (2002). Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1345–1351. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00097-8.

Nikolay, B. (2015). A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **109**, 609–618. doi: 10.1093/trstmh/trv066.

Nikolay, B., Weidmann, M., Dupressoir, A., Faye, O., Boye, C. S., Diallo, M. and Sall, A. A. (2014). Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *Journal of Virological Methods* **197**, 51–54. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.08.039.

Pasteur, N., Nancé, E. and Bons, N. (2001). Tissue Localization of Overproduced Esterases in the Mosquito Culex pipiens (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **38**, 791–801. doi: 10.1603/0022-2585-38.6.791.

Prat, M., Jeanneau, M., Rakotoarivony, I., Duhayon, M., Simonin, Y., Savini, G., Labbé, P. and Alout, H. (2024). Virulence and transmission vary between Usutu virus lineages in Culex pipiens. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **18**, e0012295. doi: 10.1371/journal.pntd.0012295.

574 **Tantely, M. L., Tortosa, P., Alout, H., Berticat, C., Berthomieu, A., Rutee, A., Dehecq, J.-**
575 **S., Makoundou, P., Labbé, P., Pasteur, N. and Weill, M.** (2010). Insecticide resistance in
576 *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Réunion Island.
577 *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 317–324. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.02.005.

578 **Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S. and Rivero, A.** (2010). Insecticide resistance and malaria
579 transmission: infection rate and oocyst burden in Culex pipiens mosquitoes infected with
580 Plasmodium relictum. *Malaria Journal* **9**, 379. doi: 10.1186/1475-2875-9-379.

581 **Viglietta, M., Bellone, R., Blisnick, A. A. and Failloux, A.-B.** (2021). Vector Specificity of
582 Arbovirus Transmission. *Frontiers in Microbiology* **12**,.

583 **Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M. and**
584 **Raymond, M.** (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily
585 detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* **13**, 1–7. doi: 10.1111/j.1365-
586 2583.2004.00452.x.

587 **Wickham H (2016).** ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer-Verlag New York.*
588 *ISBN 978-3-319-24277-4,*

589 **Zannoli, S. and Sambri, V.** (2019). West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in
590 Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms* **7**, E184. doi:
591 10.3390/microorganisms7070184.

592

B) Influence de la résistance aux insecticides sur la transmission du virus Usutu et du virus du Nil occidental par *Cx. quinquefasciatus* :

Les résultats obtenus sur le système vectoriel *Cx. pipiens*/USUV nous ont montré que des facteurs génétiques des virus comme des vecteurs influencent la compétence vectorielle et la survie des moustiques et donc potentiellement la capacité vectorielle et la transmission. Le génotypage des individus issus de cette étude nous a permis de mettre en avant des corrélations entre les allèles de résistance à certains locus et la compétence vectorielle. Mais cette étude reste corrélative et non causale. En outre, les génotypes observés présentent des effectifs inégaux dans nos échantillons, parfois faibles, ce qui réduit fortement la puissance statistique de nos analyses, et la population analysée est hétérogène génétiquement (échantillons prélevés sur le terrain).

Ainsi, pour pouvoir tester plus directement l'influence des allèles de résistance aux insecticides sur la compétence et la capacité vectorielles, j'ai utilisé des colonies de *Cx. quinquefasciatus* à fond génétique homogène, c'est-à-dire que les individus composant ces colonies présentent un fond génétique commun. Ces colonies ont été obtenues par introgression avec une colonie de référence ne présentant aucun allèle de résistance (Slab), par croisements répétés et sélections par les insecticides (**Tableau 3**).

Dans cette partie, je me focaliserai principalement sur le gène *ace-1* qui possède plusieurs allèles conférant une résistance aux insecticides OP. On trouve en particulier une mutation ponctuelle, la mutation *ace-1* G119S (Weill *et al.*, 2004). Au cours des années de traitements insecticides, cette mutation a vu sa fréquence augmenter au sein des populations naturelles en milieux traités. En revanche, elle entraîne des désavantages sélectifs élevés en absence d'insecticide, attribuables à l'activité modifiée de la protéine codée (Alout *et al.* 2008). La région de Montpellier étant un exemple marquant pour illustrer ces phénomènes (Labbé *et al.*, 2007b). Cette mutation est fixée dans la colonie SR, avec l'allèle R_1, originaire de *Cx. pipiens* de Montpellier. En plus de cette mutation ponctuelle, on trouve d'autres variants présentant des variations du nombre et de la nature des copies associées, i.e. des variants structuraux. Ces variants structuraux se déclinent en deux catégories :

1) D'abord, des duplications homogènes (allèles R^x), qui consistent en de multiples copies de l'allèle *ace-1*^{R}. Un allèle de ce type, l'allèle $R_2{}^3$, est fixé dans la colonie SRQ : il associe trois copies de l'allèle *ace-1*^{R} de Martinique (allèle R_2). Pour ces duplications homogènes,

on observe une relation quantitative entre le nombre de copies R, le niveau de résistance aux insecticides, mais aussi l'intensité des désavantages sélectifs associés (Milesi *et al.*, 2022, voir aussi (Djogbénou *et al.*, 2009; Weetman *et al.*, 2015; Assogba *et al.*, 2016b) chez *An. gambiae s.l.*).

2) On trouve aussi des duplications hétérogènes (allèles D), associant des copies *ace-1*^{R} et *ace-1*^{S} en tandem (Bourguet *et al.*, 1996 Lenormand *et al.*, 1998 Labbé *et al.*, 2007a, Milesi *et al.* 2018, voir aussi Djogbenou et al 2008, Assogba *et al.* 2015, 2016 chez *An. gambiae s.l.*). Nous avons utilisé deux colonies portant de tels allèles : Ducos, fixée pour l'allèle D_1 (2 copies R_2 et 1 copie S) et Biface, fixée pour l'allèle D_3 (1 copie R_1 et 1 copie S). Ces duplications hétérogènes confèrent un phénotype similaire à celui d'un hétérozygote RS, intermédiaire pour la résistance comme pour les désavantages sélectifs associés, mais débarrassé du fardeau de ségrégation associé aux hétérozygotes standards (Labbé *et al.* 2014, Milesi *et al.* 2017).

Chaque allèle du locus *ace-1*, simple-copie, duplication hétérogène ou duplication homogène, est associé à un trade-off résistance/coûts qui lui est propre (Assogba *et al.*, 2016b; Milesi *et al.*, 2018, 2022), et sera donc sélectionné dans des régimes de traitement insecticides différents: les allèles R^{x} sont plutôt associés à une utilisation intensive des insecticides, alors que les allèles D sont plutôt sélectionnés dans des régimes intermédiaires, avec une alternance temporelle et/ou hétérogénéité spatiale des traitements.

Nous nous sommes donc demandé si ces trade-off différents, associés à des structures alléliques différentes, pouvaient avoir un impact sur la transmission des pathogènes. Nous avons ainsi étudié l'effet de ces différents allèles de résistance sur la compétence vectorielle et les traits d'histoire de vie de plusieurs colonies *Cx. quinquefasciatus* à fond génétique homogène exposées aux virus USUV et WNV (voir **Tableau 3** ci-dessous).

Tableau 3 : récapitulatif des différentes colonies *Cx. quinquefasciatus* étudiées et des allèles *ace-1* associés :

Colonies	*Phénotypes*	*Allèles*	*Architectures*	*Origine*	*Références*
Slab	Sensible	S	Homozygote monocopie	*Cx. quinquefasciatus*	(Georghiou *et al.*, 1966)
SR	Résistant	R_1	Homozygote monocopie (mutation G119S)	*Cx. pipiens*	(Berticat *et al.*, 2002)
Ducos	Résistant	D_1 (= $2R_2$ + 1S)	Duplication hétérogène	*Cx. quinquefasciatus*	(Labbé *et al.*, 2007a)
Biface	Résistant	D_3 (= $1R_1$ +1S)	Duplication hétérogène	*Cx. pipiens*	(Labbé *et al.*, 2007a)
SRQ	Résistant	R_2^3 (= $3R_2$)	Duplication homogène	*Cx. quinquefasciatus*	(Milesi *et al.*, 2022)

a- *Cx. quinquefasciatus* vs WNV :

Mes travaux de recherches sur la résistance ont en premier lieu porté sur l'étude de l'impact d'allèles de résistance sur la compétence vectorielle de *Cx. quinquefasciatus* pour le virus du Nil occidental (WNV) lors de mon stage de Master 2 et le début de ma thèse. Pour cette étude nous avons choisis d'infecter expérimentalement trois colonies de *Cx. quinquefasciatus* selon le protocole décrit dans (Prat *et al.*, 2024) : Slab la colonie sensible, SR, homozygote pour l'allèle résistance R_1, et Biface (BF), homozygote pour l'allèle D_3 (**Tableau 3**). Ces colonies partagent un fond génétique commun (celui de Slab), et ne diffèrent essentiellement qu'au locus *ace-1*. L'élevage de ces colonies est réalisé à l'Institut des sciences de l'évolution de Montpellier (ISEM).

Pour les infections expérimentales, nous avons choisi de travailler avec les 2 principales lignées de WNV, lignées 1 et 2 (L1 (IS98 ; AN : AF481864) et L2 (7025 ; AN : MT863561), resp.), qui circulent notamment en Europe (Zannoli and Sambri, 2019). Les colonies *Cx. quinquefasciatus* ont été nourris avec un repas de sang infecté à un titre de 10^4 $TCID_{50}$/mL et maintenues selon le protocole décrit dans (Prat *et al.*, 2024). Dans un premier temps, j'ai étudié la prévalence d'infections dans les thorax et les têtes des individus. La tête est utilisée comme un proxy de la salive dans cette étude. La détection de génomes viraux WNV a été réalisée par RT-qPCR selon les amorces décrites dans (Linke *et al.*, 2007).

Malheureusement, après avoir conduit ces expériences et avoir analysé certains résultats, il a été détecté une contamination de la colonie Slab, antérieure à la réalisation des infections. Des allèles spécifiques de *Cx. pipiens* (et non *Cx. quinquefasciatus,* Weill *et al.*, 2000) ont en effet été retrouvés. Les colonies ont donc dû être repurifiées afin de pouvoir être à nouveau utilisées dans les études présentées dans le chapitre précédent (et je n'ai pas pu non plus l'utiliser pour tester l'impact de la résistance lors des infections à USUV, voir ci-après). Je vous présente néanmoins ici un aperçu rapide du travail qui avait été réalisé avant la détection de la contamination.

Résultats :

Nous avons étudié les moustiques ayant survécu jusqu'à 14 jours après exposition au repas sanguin infectieux (Effectifs d'individus vivants à J_{14}, pour chaque colonie de moustiques, avec la lignée WNW en indice : $Slab_{L1}$ = 209, $Slab_{L2}$ = 91 ; BF_{L1} = 58, BF_{L2} = 125 ; SR_{L1} = 79, SR_{L2} = 91).

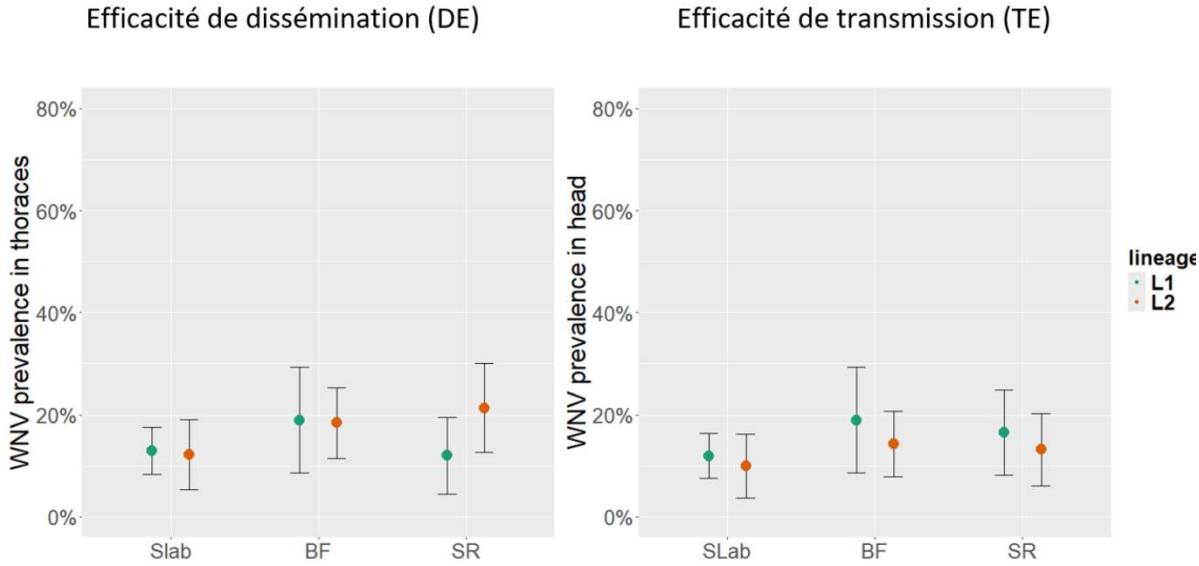


Figure 11 : Efficacité de dissémination et de transmission de deux lignées du WNV chez *Cx. quinquefasciatus* : Paramètres de compétence vectorielle pour les deux lignées WNV étudiée : L1 (points verts) et L2 (points orange). Les barres verticales représentent l'intervalle de confiance 95%.

La prévalence d'infection est basse dans les deux tissus étudiés, et n'est pas significativement différente entre les trois colonies (*p*-value > 0.05**, Figure 11).** Nous n'observons ainsi pas d'effets significatifs des allèles de résistances sur l'efficacité de dissémination et de transmission des deux lignées WNV. Dans un second temps, j'ai étudié la survie des individus exposés au repas sanguin infecté durant les 14 jours de temps d'incubation. La survie est comparée entre les différentes colonies exposées aux lignées L1 et L2 de WNV (**Figures 12**) est significativement impactée par le génotype (Cox : p-value < 0.05). On observe comme attendu une survie plus élevée de la lignée sensible (Slab) par rapport à Biface et SR (résistantes), et ce pour les 2 lignées virales WNV après exposition au virus ; la différence est significative avec les deux colonies résistantes pour la lignée L1, seulement avec Biface pour

la lignée L2 ; il n'y a pas de différence significative entre les 2 lignées résistantes (Tests de comparaison de Cox).

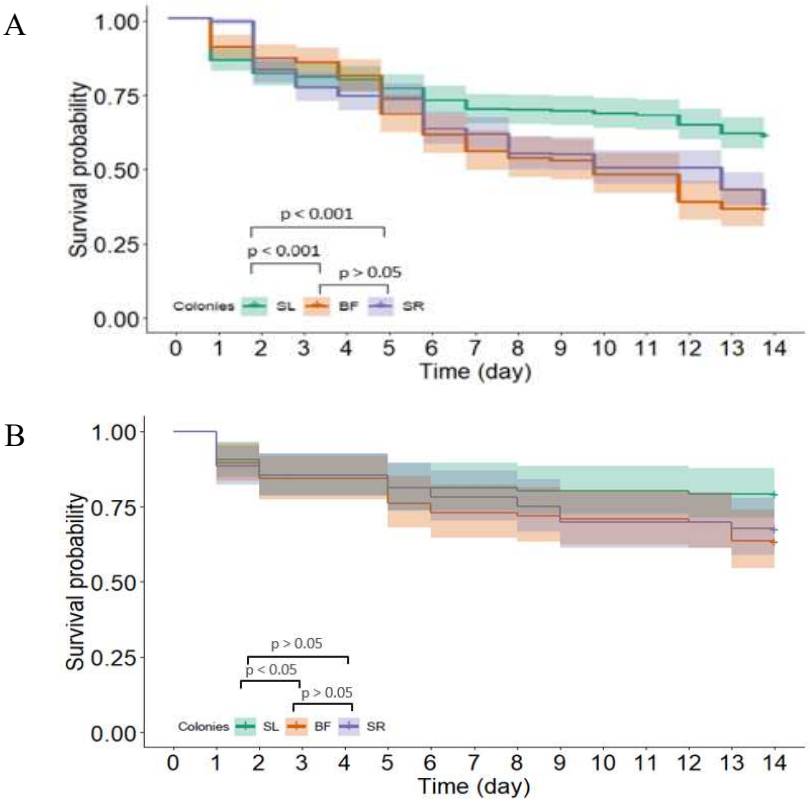


Figure 12 : Courbes de survie au cours du temps des trois colonies Cx. quinquefasciatus exposés à WNV L1 (A) et L2 (B) : La ligne verte représente la colonie Slab (S), la ligne orange la colonie Biface (D_3) et la ligne violette la colonie SR (R_1). Des tests Log-like par paire ont été utilisés pour comparer la survie entre les colonies.

D'après nos résultats, il ne semble donc pas y avoir d'effet des allèles de résistance sur la compétence vectorielle. Cependant la réduction de la survie post-exposition affecte la capacité vectorielle en réduisant cette dernière.

Même si ces travaux sont impubliables en l'état à cause de la contamination de Slab, ils apportent ainsi tout de même des indications sur l'effet des allèles de résistance sur la transmission vectorielle, puisque ces résultats suggèrent une capacité vectorielle réduite des moustiques résistants, essentiellement via un effet sur la survie, dont on a vu le rôle majeur plus tôt.

Box 1 : Etude de cinétique de transmission par utilisation de papiers FTA

Durant mes travaux, je me suis aussi intéressé à la cinétique d'infection de la salive au cours du temps, pour pouvoir étudier le temps d'incubation extrinsèque sans changer les procédures d'infection expérimentale déjà mises en place. Comme une précédente étude avait montré un impact de la résistance aux insecticides sur la compétence vectorielle pour WNV (Atyame *et al.*, 2019), j'ai cherché à tester si la résistance aux insecticides avait un effet sur le temps d'incubation extrinsèque du virus, et par conséquent sur la transmission. J'ai cherché à mesurer cela directement dans la salive excrétée par une femelle, pour me rapprocher au mieux de l'effet réel plutôt que d'utiliser le proxy des glandes salivaires (il est en effet possible que des virus présents dans ces glandes ne soient pas réellement excrétés) ou d'avoir recours à la salivation forcée qui oblige à disséquer le moustique.

Pour ce faire, j'ai placé sur le voile des tubes individuels contenant les femelles, un carré de papier FTA d'environ 1x1cm imbibé de solution sucrée (5% de miel) pendant 24h, avant de le récupérer et de le conserver à -80°C. Ces papiers FTA permettent de conserver les acides nucléiques, et donc potentiellement les ARN viraux, j'espérais ainsi récolter de manière passive la salive excrétée par les femelles infectantes s'alimentant du jus sucré imbibant le papier. De plus, cette approche non invasive ne nécessitant pas la dissection des femelles, il était possible de répéter la procédure plusieurs fois sur les mêmes femelles, à intervalles réguliers (-3, -7, -9, -12 et -14 jours post repas sanguin).

Les acides nucléiques dans les papiers FTA ont ensuite été extraits et analysés par RT-qPCR pour détecter et quantifier les génomes viraux d'USUV ou de WNV avec des couples d'amorces spécifiques. Pour s'assurer que les femelles aient bien salivé sur le papier FTA, j'ai utilisé comme témoin positif un gène de ménage mitochondrial (avec un couple de primers ciblant un fragment situé entre les positions 14,394 and 14,493 du génome de *Culex* GenBank: HQ724617, dans une région conservée, et décrit dans (Grubaugh *et al.*, 2017). Lorsque ce fragment n'était pas amplifié, j'ai considéré que les femelles concernées ne s'étaient pas nourries, excluant ces points de l'analyse.

Ce protocole a été appliqué lors de l'étude de l'impact de la résistance aux insecticides sur la compétence vectorielle de *Cx. quinquefasciatus* pour WNV L2 décrite ci-dessus dans ce manuscrit. Il s'agit donc des mêmes individus et donc des mêmes effectifs.

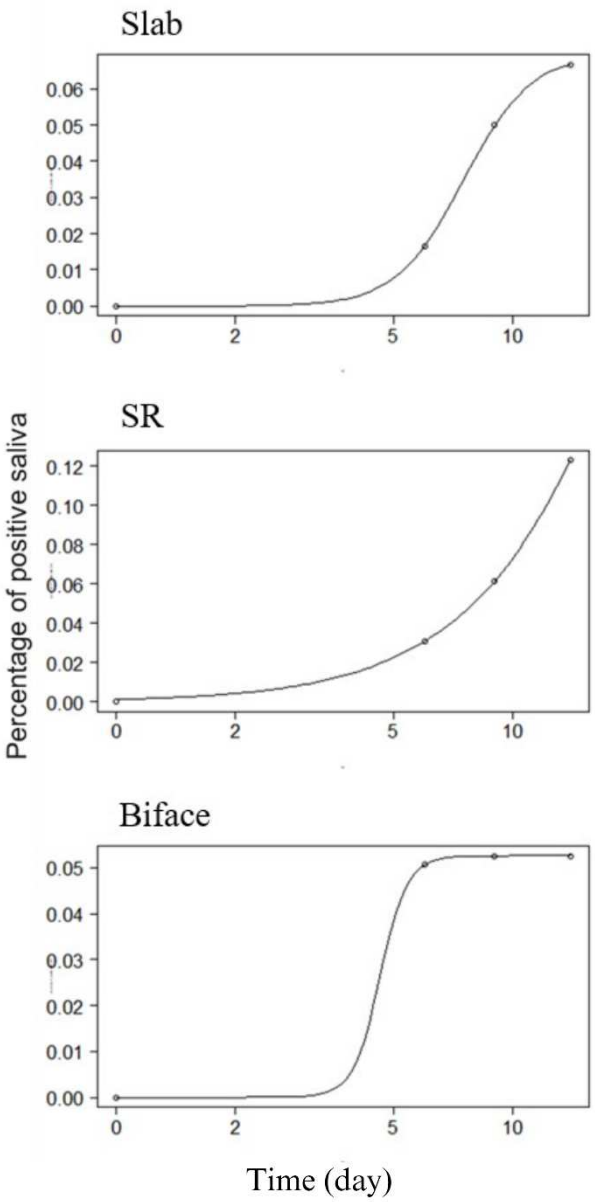


Figure 13 : Cinétique d'infection de la salive de *Cx. quinquefasciatus* par WNV L2 : Cinétique d'infection en fonction du temps exprimé en pourcentage cumulé de salives positives par jour post-infection par WNV L2. Slab est la colonie sensible, SR est homozygote pour l'allèle simple-copie R_1 et Biface pour l'allèle dupliqué hétérogène D_3.

Quantitativement j'observe des prévalences d'infection des salives à J_{14} de 6% pour Slab, 5% pour Biface et 12% pour SR. Ces résultats sont nettement inférieurs aux données générées par analyses de la tête (proxy de la salive) où Slab présentait 15% de prévalence, SR 16% et Biface 17%. Malgré cela, cette méthode a permis de détecter du génome viral sur certaines salives avant le 14^e jours post repas sanguin (J_6, J_9 et J_{12}).

Les colonies Slab et SR décrivent une dynamique similaire avec une présence de salives positives détectées à partir du 6e jour post repas sanguin, les jours d'analyse suivant la prévalence augmente de manière régulière jusqu'au 14e jours post infection (dernier jour de mesure). La différence est alors notable puisque la prévalence de salives positives à la fin de la période d'incubation extrinsèque est de 12% pour SR et de 6% pour Slab (**Figure 13**). La colonie Biface atteint une prévalence de 5% à J14 des salives infectées, proche de la prévalence de Slab, à la différence que ce maximum est atteint de manière précoce dès le J6 post repas sanguin et n'évolue plus dans les jours suivants. Pour cette colonie, l'architecture génomique de l'allèle D_1 (duplication hétérogène) est associée à un raccourcissement du temps d'incubation extrinsèque de WNV L2 mais présente une prévalence d'infection de la salive plus faible que SR (p-value<0.05).

Ces résultats sont néanmoins à considérer avec précautions car réalisé sur un effectif faible et donc dont les analyses sont moins robustes. De même, les cinétiques d'infection de la salive ont été tracées à l'aide du package « drc » et la fonction « drm » sur R (Ritz *et al.*, 2015). Ce package « force » la formation d'une sigmoïde malgré le fait que certaines colonies comme Biface ne présente pas de phase de croissance progressive. Une limite que je vois à cette méthode dans nos conditions expérimentale est qu'elle ne reflète pas la prévalence d'infection décrite par l'analyse des tissus. La méthode FTA ne permet de détecter que les salives les plus fortement chargées en génome viraux, mais qui ne représente pas la majorité des individus (Cf décalage de prévalence entre tissus et FTA). Ce faible nombre de FTA positifs ne permet pas par la suite de réaliser des analyses de dynamique de transmission statistiquement robustes due à un effectif trop limité. Afin d'améliorer cette méthode je projette en premier à affiner la méthode de détection, je pense à des méthodes de digital PCR ou de Nested PCR. Ou alors une seconde option serait d'ajouter une courte période de jeun avant le dépôt du papier FTA afin de maximiser mes chances de contacts prolongés lors du dépôt, et donc de période de salivation plus longue, mais ceci présente le risque d'affaiblir l'individu en le privant régulièrement de source d'alimentation. Malgré les faibles effectifs d'individus détectés lors de ces analyses, nous observons néanmoins des individus présentant du génome viral dans la salive à J_9 et J_{12} post repas sanguin. Il est donc possible que les moustiques soient infectieux bien plus tôt. Dans la continuité de ces résultats j'espère pouvoir explorer de manière plus robuste les possibles effets de la résistance sur la cinétique de transmission au cours du temps.

Avant la découverte de la contamination des colonies, les résultats de cette étude ont été présentés au congrès « Vector Kolymbari Meeting 2022 » (poster)

b- *Cx. quinquefasciatus* vs USUV :

Pour étudier les effets de USUV, j'ai utilisé 4 colonies *Cx. quinquefasciatus* (Slab, Ducos, SR et SRQ, **Tableau 3**) qui partagent un fond génétique commun, celui de Slab. Les colonies résistantes diffèrent cependant dans les architectures génétiques de leurs allèles *ace-1*, allèle muté monocopie (R_1), duplications hétérogènes (D_1) ou homogènes (D_2^3).

En raison des difficultés rencontrées avec la colonie Slab (décrits plus bas), j'ai choisi de présenter les résultats obtenus en deux parties, en présentant l'influence des allèles de résistance aux insecticides dans un premier temps sur la compétence vectorielle pour USUV (**Article 3**), et ensuite sur les traits d'histoire de vie des vecteurs dans un contexte d'exposition à cet arbovirus (**Article 4**). Ces expériences ont également fait l'objet d'analyses transcriptomiques qui seront présentées au chapitre 2.

Matériel et Méthode

J'ai exposé les quatre colonies avec la lignée EU3 de USUV et à la dose forte ($10^6 TCID_{50}$/mL), avec la même procédure que décrite au chapitre I) et dans l'article (Prat *et al.*, 2024). J'ai fait ce choix parce que la lignée EU3 semble la moins adaptée au vecteur, sa réplication dépend de la dose et les impacts sur la survie sont plus marqués, et donc je m'attendais à trouver des effets plus marqués et plus « simples » à mettre en évidence (Prat *et al.*, 2024).

J'ai étudié plusieurs traits phénotypiques : i) la compétence vectorielle, qui permet d'évaluer l'efficacité de dissémination et de transmission de USUV par les différentes colonies ; ii) la survie, suite à l'exposition à USUV lors d'un repas sanguin ; et enfin iii) la fécondité, à partir des mesures au cours du temps de la proportion de femelles ayant pondu et de la proportion des pontes ayant éclos.

Suite à ces mesures phénotypiques, une analyse transcriptomique a été réalisée sur des pools d'ARN issus de 5 individus par colonie afin d'explorer les gènes et la nature des processus biologiques impliqués pouvant être à l'origine des différences observées. Ces résultats seront développés dans le chapitre 2 « Impacts des arbovirus et des gènes de résistance sur l'expression du génome ».

NB : Pour améliorer la pureté des ARNs extraits nécessaires aux études transcriptomiques, les abdomens et thorax de cette étude ont été extraits à l'aide d'un kit d'extraction différents par rapport aux salives et têtes. Ce dernier a réduit le rendement d'extraction, ne permettant pas de détecter de manière robuste le virus dans ces tissus. Nous parlerons donc « d'exposition » et non d'infection dans ces études, car nous sommes dans l'incapacité de connaitre le statut d'infection dans les abdomens et les thorax.

Résultats

La colonie Slab repurifiée a montré lors de ces expériences un comportement très étrange par rapport à ce qui était connu et obtenu dans mes expériences précédentes. En particulier, c'est la colonie qui a montré le taux de mortalité le plus élevé et le taux de fécondité le plus bas, ce qui est l'inverse des attendus d'après les précédentes études issues de la littératures réalisées sur ces colonies, ainsi que les comportements observés sur les expérimentations avec WNV (présentés précédemment). Il nous a donc été impossible de l'utiliser comme témoin sensible dans le cadre de l'étude des traits d'histoire de vie, pour laquelle nous n'avons pu que comparer les performances des différents allèles de résistance entre eux. Nous avons choisi en revanche de conserver les résultats de la colonie Slab pour la compétence vectorielle, en ne nous intéressant qu'aux comparaisons intra-colonies (exposés vs non-exposés) et non entre colonies (entre sensibles et résistants par exemple).

Compétence vectorielle :

Des différences de compétence vectorielle entre colonies sont fortement marquées, notamment entre la colonie sensible et les colonies résistantes. Suite aux infections expérimentales j'ai analysé au total 337 individus (83 Slab ; 108 Ducos ; 83 SR et 70 SRQ).

Dans un premier temps, l'efficacité de dissémination est fortement impactée par le génotype des individus dans nos données ($Chi^2 = 34,1$; p-value < 0,0001). La colonie sensible Slab présente une efficacité de dissémination significativement plus élevé que les trois colonies résistantes (37% vs < 10% pour les colonies résistantes).

Dans un second temps, l'efficacité de transmission est fortement impactée par le génotype des individus dans nos données ($Chi^2 = 27,7$; p-value < 0,0001). Malgré une efficacité de transmission (TE) de Slab relativement faible (22%), celle-ci est bien supérieure à celle de

Ducos et SR (< 10%). Les données obtenues sur trois réplicas montrent que la colonie SRQ quant à elle n'est pas compétente pour la lignée EU3 de USUV dans nos conditions puisqu'aucune salive n'a présenté de génome viral détecté.

Ces résultats ainsi que les analyses transcriptomiques associées sont présentés dans **l'article 3** : « Investigating the interplay between insecticide resistance and Usutu virus transmission in *Cx. quinquefasciatus*. »

Survie :

J'ai donc étudié la survie des femelles issues des colonies résistantes uniquement (SR, Ducos, SRQ), pendant 14 jours suivant un repas de sang avec ou sans USUV. L'analyse de la survie en fonction de l'exposition et de l'allèle de résistance a révélé une interaction non significative entre ces deux facteurs ($Chi^2 = 0,59$; p-value = 0,74). Seul la variable « genotype » a un impact significatif dans le modèle ($Chi^2 = 17.05$; p-value = 0.0002). Nous avons donc choisi d'analyser ensemble les effets des allèles de résistance dans les moustiques exposés et les contrôles non-exposés.

La dynamique de survie entre les trois colonies suit le même pattern en condition contrôle ainsi qu'en condition exposé à USUV, où Ducos survit significativement plus que SRQ et SR, SRQ quand à elle survit significativement plus que SR. La colonie homozygote R_1 est donc celle avec le moins bon taux de survie dans les 14 jours post repas sanguin (infecté ou non par USUV EU3) et Ducos homozygote D_1 la colonie qui survit significativement plus que les deux autres.

Fécondité :

En parallèle j'ai également étudié la dynamique de ponte et d'éclosion des œufs au cours du temps, entre les différentes colonies, et l'exposition ou non à un repas sanguin infecté. Pour ces deux variables, l'analyse a révélé une interaction non-significative entre l'exposition et le génotype (Ponte : mixed-effect Cox model tests, $Chi^2 = 2.39$; p-value = 0.30 et Eclosions : $Chi^2 = 2.06$; p-value = 0.36). Seul la variable « exposition » a un effet significatif sur les résultats (mixed-effect Cox model tests : Pontes : $Chi^2 = 10.09$; p-value = 0.0065 et Eclosions : $Chi^2 = 17.83$; p-value = 0.00013). Nous avons donc choisi d'analyser ensemble les effets des allèles de résistance dans les moustiques exposés et les contrôles non-exposés.

De la même manière que pour la dynamique de ponte, l'éclosion de ces dernières a suivi un pattern similaire où le colonie SR voit ses œufs éclore significativement plus précocement et plus tôt que Ducos et SRQ.

Discussion :

Les résultats décrit dans ces études mettent en avant la très faible compétence des colonies résistantes au locus *ace-1* pour la lignée EU3 du virus Usutu, qui est significativement plus faible que la compétence vectorielle de la colonie sensible Slab. Les données nous montrent aussi la non compétence de la colonie SRQ dans nos conditions d'expérimentations (aucune salive avec du génome viral détectable). De plus malgré le fait que l'effet de la résistance sur une plus faible compétence vectorielle soit généralisable aux trois colonies (SR, Ducos et SRQ) il n'en ressort pas de différences significatives entre les trois colonies résistantes entres elles. L'allèle de résistance *ace-1* G119S a donc un effet sur la compétence vectorielle de *Cx. quinquefasciatus* pour la lignée EU3 du virus USUV, quel que soit l'architecture génétique considérée. Ces résultats sont contraires à ceux décrit sur des parasites comme *W. bancrofti* et *P. falciparum* (McCarroll and Hemingway, 2002; Alout *et al.*, 2013) et les arbovirus comme WNV (Atyame *et al.*, 2019) où là les allèles *ace-1*^{R} augmentait la compétence vectorielle pour le pathogène. Cependant il a également été décrit des effets neutres de la résistance sur la compétence vectorielle pour RVFV (Atyame *et al.*, 2019). Néanmoins, ces comparaisons sont à replacer dans un contexte où le pathogène est différents d'autant plus que de telles études de l'impact de la résistance aux insecticides sur la compétence vectorielle pour USUV n'ont pas encore été décrites.

Dans un second temps j'ai cherché à savoir si les architectures génomiques diversifiées au locus *ace-1* associées à la résistance aux OP, avaient des effets différents sur les traits d'histoire de vie en condition d'exposition à un virus, ici la lignée EU3 du virus Usutu. La mesure des traits d'histoire de vie, comme la survie et la fécondité, a été mesurée en condition contrôle (repas sanguin sain) et sous condition d'exposition à USUV EU3. Sur le premier aspect la colonie Ducos a montré une meilleure survie quelles que soit les conditions du gorgement (contrôle ou exposée à USUV EU3). A contrario de la colonie SR qui elle a montré une survie toujours plus faible que les deux autres dans les deux conditions. Lorsqu'on analyse l'effet des allèles de résistance sur la fécondité, la colonie SR pond significativement plus précocement que les autres colonies qu'il y ait exposition, ou non à USUV. L'éclosion des pontes suit la même dynamique avec les pontes SR qui éclosent plus tôt que les autres colonies étudiées. A l'inverse, l'éclosion des pontes de la colonie Ducos est moins précoce.

Les résultats sur ces deux traits mesurés sont à mettre en parallèle. On peut noter que Ducos survit mieux dans nos conditions, et SR moins par rapport aux autres colonies (peu importe

l'exposition ou non au pathogène). Mais concernant la ponte et leur éclosion les dynamiques sont inverses. Ces deux aspects montrent un compromis entre survie et fécondité. De tels effets ont été rapportés sur des infections *An. gambiae* et *Plasmodium*, où l'infection a réduit la dynamique de ponte et l'énergie interprétée comme réallouée à la survie (Vézilier *et al.* 2015 ; Dao *et al.* 2010). Etonnement ce compromis est visible dans nos données uniquement entre ces deux colonies. Il semble donc y avoir un effet de l'architecture de l'allèle de résistance sur ce trait, visible dans les deux conditions d'exposition ou non au virus USUV EU3, attribuable potentiellement à la présence ou non d'une copie *ace-1* sensible (dont on a vu au chapitre 1 qu'elle suffit à affecter les traits d'histoire de vie des moustiques, sans doute via l'immunité).

Les résultats ainsi que les analyses transcriptomiques associées seront présentés dans un 4e article en annexe de ce manuscrit, intitulé : « Investigating the interplay between insecticide résistance and USUV exposition on *Cx. quinquefasciatus* life history traits and transcriptomic responses. » (in prep.)

Article 3 : Investigating the interplay between insecticide resistance and Usutu virus transmission in *Culex quinquefasciatus* (in prep).

Investigating the interplay between insecticide resistance and Usutu virus transmission in *Culex quinquefasciatus*.

Maxime Prat [1,2], Mélanie Jeanneau [2,3], David Bru [2], Théo Durand [2], Patrick Makoundou [1], Sandra Unal [1], Yannick Simonin [3], Pierrick Labbé [1] and Haoues Alout [2*]

[1]: Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, Univ Montpellier, Montpellier, France.

[2]: UMR ASTRE, F-34398, Univ Montpellier, CIRAD / INRAE, Montpellier, France.

[3]: CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

[4]: Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Université de Montpellier, INSERM, EFS, Montpellier, France.

*: corresponding author: haoues.alout@inrae.fr

Abstract:

Insecticide resistance is a major impediment to vector control programs. Despite several limitations in the use of chemical insecticides, genetic determinant of resistance remains present in natural populations. The *ace-1* G119S mutation confers a resistance to organophosphate insecticides but have been associated to fitness cost on several life traits. This study assessed the impact of resistance genotypes on the vector competence of *Culex quinquefasciatus* to arbovirus and explored its genetic determinants by RNAseq. We focused on Usutu virus (USUV) a zoonotic arbovirus circulating in wild birds mainly and transmitted by ornithophilic mosquitoes, mainly of the genus *Culex*. We compared the vector competence of four colonies (one susceptible and three resistant) sharing a common genetic background. The susceptible colony Slab showed significantly higher vector competence than the three resistant colonies, with most resistant individuals found non-competent, suggesting that *ace-1* resistant alleles alter transmission of USUV EU3. Transcriptomic analysis identified biological processes linked to immune responses in non-competent individuals, that were absent in competent mosquitoes of the susceptible colony Slab. Similar genes were differentially expressed in the non-competent Ducos colony compared to their control conditions. The non-competent SR and SRQ colonies had fewer differentially expressed genes compared to non-competent Slab and Ducos. This low number of differential expression genes, particularly in SR, might indicate an earlier EIP causing earlier competence and efficient responses that eliminate infection quickly. Finally, another hypothesis could be a colony refractory to USUV infection, resulting from non-infection of the tissues.

Abbreviations

AN : Accession Number

BSL3 : BioSecurity Level 3

BP : Biological Processes

CG : Control Group

CYP450 : Cytochrome P450

CX : carbamate

DE : Dissemination efficiency

DEG : Differentially expressed genes

dpi: days post-infection

EC : Enzyme Commission numbers

EIP: Extrinsic incubation period

FBS : Fetal Bovine Serum

GO term : Gene Ontology term

JEV : Japanese encephalitis virus

logFC : log fold change

MEM : Minimum Essential Medium

OP : Organophosphate

RNA-Seq : RNA sequencing

RT-qPCR: Reverse Transcription Quantitative PCR

SMIM4 : Small integral membrane protein 4

$TCID_{50}$: Tissue Culture Infectious Dose 50

TE : Transmission efficiency

USUV : Usutu virus

WNV : West Nile virus

YFV : Yellow Fever virus

Introduction:

Arboviruses (arthropod-borne viruses) account for a significant proportion of the world's infectious diseases with an incidence of approximately 17% (Kading *et al.*, 2020). To prevent epidemic outbreaks caused by these vector-borne pathogens, vector control remains the only method for halting their transmission and propagation, even more so when effective treatments are not available.

Applications of chemical insecticides have been used since several decades to control mosquito populations, either for controlling the spread of epidemics or for preventing the nuisance caused by their bites. The extensive and widespread use of insecticides have led to the selection of several resistance mechanisms in mosquito populations (Labbé *et al.*, 2017). Insecticide resistance is defined as a heritable genome modification that decreases the susceptibility of individuals to a lethal insecticide dose. Insecticide resistance can be classified into four mechanisms: i) Behavioral avoidance (note that no mechanisms have been described to date), ii) cuticular thickening, iii) metabolic detoxification and iv) target site modification (as reviewed in ANSES 2021 Saisine n° « 2020-SA-0029 »).

Among the mechanisms that have been studied most extensively, target site resistance is due to a point mutation that induces a conformational change of the insecticide binding site in the target protein that prevents its action. The A302S and A302G mutations in the *rdl* gene coding for GABA receptors confer resistance to the organochlorine insecticides (Du *et al.*, 2005). The *kdr* gene encodes voltage-dependent sodium channels, and the L1014F and L1014S mutations confer resistance to pyrethroid insecticides (Martinez-Torres *et al.*, 1998). The G119S, F290V and the F331W in the *ace-1* gene coding for a synaptic acetylcholinesterase 1 (AChE1) confer resistance to organophosphate (OP) and carbamate (CX) insecticides (Weill *et al.*, 2004; Alout *et al.*, 2007).

Considering the *ace-1* gene, several distinct alleles involving these mutations have been selected by the OP treatments: a point mutation in the *ace-1* locus associated or not with gene amplification. Two types of gene amplification have been listed (Lenormand 1998; Labbé et al 2007; Alout *et al.* 2009 ; Milesi *et al.* 2022; Claret *et al.* 2024) : an heterogenous duplication associating a mutated resistant and a wild-type susceptible copies in tandem and an homogenous triplication of resistant *ace-1*^{R} copy (Milesi *et al.*, 2022) (**Figure 1**). These *ace-1*

resistant alleles have been selected sequentially in the past by the OP treatments and are still present in natural populations (Bourguet *et al.*, 2004; Labbé *et al.*, 2007b).

Initially, resistant alleles appear as homozygous single-copy *ace-1R*. But the genomic architectures linked to resistance alleles have turned out to be more diverse. In particular, with the discovery of structures such as duplications. Firstly, we have the heterogeneous duplicated alleles, combining an *ace-1*^{R} copy and ace-1S in tandem. These duplicated alleles were discovered in *Culex pipiens* following the fixation of the heterozygous phenotype after repeated selection of a Martinique strain by exposure to CX. This result is theoretically impossible in the presence of monocopy alleles due to segregation load. Duplication was therefore proposed as an explanation for these results (Bourguet *et al.*, 1996). These results were subsequently transposed to the Montpellier region, still based on the observation of this strong excess of heterozygotes (Lenormand *et al.*, 1998), and then confirmed by (Labbé *et al.*, 2007a). These duplications are now fixed in laboratory strains (here Ducos and Biface). These heterogeneous duplications make it possible to limit the associated costs in terms of selective value (Labbé *et al.* 2014). Finally, a study colony (SRQ) was presented with a homogeneous duplication (R_2^3) associating three *ace-1*^{R} copies. These homogeneous duplications were initially described in *An. gambiae s.l.* (Djogbénou *et al.*, 2015; Weetman *et al.*, 2015; Assogba *et al.*, 2016). For study alleles (R_2^3), there is a quantitative relationship between the number of R copies and resistance capacity, the cumulative effect of R copy restores the global enzyme's activity to higher levels by addition of mutated allele, individually less efficient (Bourguet *et al.*, 1996; Alout *et al.*, 2008), but also the intensity of the associated deleterious costs on selective value (Milesi *et al.*, 2022).

All these genomic architecture, with heterogeneous and homogeneous duplications were widely shared by many species of *Culex pipiens* complex (Milesi *et al.*, 2018) which makes it an important study element to consider. The dynamics of resistance alleles also depend on the use of insecticides. Heterogeneous use of the same class of insecticides or the same insecticide molecule, but varying in the intensity and frequency of treatments, can select different resistance alleles (Milesi *et al.*, 2016). R^X alleles offer advantages in heavily treated environments, due to the accumulation of these resistant copies, whereas D_1 alleles will be advantageous in moderately treated environments, or more sporadic over time, where the

125 presence of the S allele will restore a better enzymatic activity than homozygous R to reduce
126 the cost of selective value (Labbé *et al.*, 2007a).

127 As mentioned above, these mutations and specific architectures are often associated with
128 negative pleiotropic effects that result in fitness disadvantage and reduce the frequency of
129 resistant alleles in the absence of insecticide treatment (Raymond *et al.* 2001). Among the life
130 history traits affected in *Cx. quinquefasciatus* we found larval development (Raymond *et al.*,
131 2001; Bourguet *et al.*, 2004) and survival (Gazave *et al.*, 2001). In addition, several mutations
132 responsible for insecticide resistance have reported impact on pathogen transmission as they
133 have been shown to influence the vector competence. In *Anopheles gambiae*, *kdr* mutation
134 (Alout *et al.*, 2013, 2014) *ace-1* mutation (Alout *et al.*, 2013) and *Vgsc* gene mutations (Kabula
135 *et al.*, 2016) have shown effect on *Plasmodium falciparum* transmission. Other parasites
136 transmission like *W. bancrofti* have been impacted by Esterase-based insecticide resistant in
137 *Culex* mosquitoes (McCarroll and Hemingway, 2002). Finally, arboviruses like West Nile virus
138 and Rift valley fever virus transmission may be impacted by *ace-1* mutations in
139 *Cx. quinquefasciatus* (Atyame *et al.*, 2019).

140 In this study we focused on a specific arbovirus, the Usutu virus (USUV). USUV is a mosquito-
141 borne flavivirus (family; *Flaviviridae,* genus: *flavivirus*) and is part of the Japanese encephalitis
142 serocomplex with other phylogenetically related virus like Yellow Fever virus (YFV), Japanese
143 encephalitis virus (JEV) and West Nile virus (WNV) (Williams *et al.*, 1964). Like WNV, USUV is
144 maintained in a transmission cycle involving wild birds and ornithophilic mosquitoes, mainly
145 of the genus *Culex* (Nikolay *et al.*, 2011) with a few instances of spill over into humans and
146 other mammals (Clé *et al.*, 2019) (Cadar and Simonin, 2022).

147 This study aims to investigate the impact of several *ace-1* resistant alleles, who's differ in their
148 genomic architecture, on vector competence to USUV. We also performed a transcriptomic
149 analysis to explore the differential expressed genes associated with vector competence and
150 to identify the genetic components involved in the differential response to arbovirus in
151 competent or non-competent mosquitoes. In the long term, these approaches will enable us
152 to see whether the costs associated with these architectures on the selective values of
153 individuals also have an impact on the transmission of arboviruses and could therefore
154 present differential health risks in treated or untreated areas, depending on the treatment
155 strategy applied.

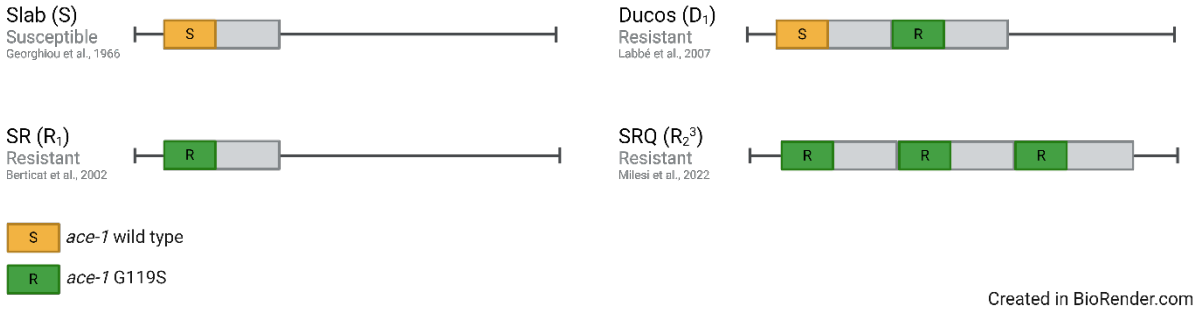
Material and methods

Mosquitoes colonies

Four *Cx. quinquefasciatus* colonies were used (**Figure 1**): i) SLAB, the reference susceptible colony, homozygous for *ace-1* susceptible allele (Georghiou *et al.*, 1966), ii) SR, an OP resistant colony homozygous for the single *ace-1*^{R} allele containing the G119S mutation (Berticat *et al.*, 2002), iii) Ducos, an OP resistant colony homozygous for an heterogenous duplication of the *ace-1* gene associating a susceptible and a resistant *ace-1*^{R} copy (Duron *et al.*, 2005) and iv) SRQ, an OP resistant colony homozygous for an homogeneous triplication with three copies of the same *ace-1*^{R} copy (Milesi *et al.*, 2022). All these resistant colonies have been introgressed by successive backcrosses with Slab colony and OP selection at each generation.

Cx. quinquefasciatus colonies were maintained separately in a secured insectarium (at ISEM, Univ. Montpellier) at 27±1°C, 65±8% relative humidity, and a 14h light/10h dark photoperiod. After egg-hatching, approximately 500 larvae per tray were randomly dispatched into three to five plastic trays containing 1 liter of tap water and fed with Tetramin® fish granules. At emergence, adults were fed *ad libitum* with a 5% honey solution and maintained in 30x30x30 cm cages. One day before blood feeding, mosquitoes were starved by removing the honey solution.

Figure 1 : Schematic representations of *ace-1* alleles on chromosome 3, and linked genomic architecture in the 4 *Cx. quinquefasciatus* colonies.



Viral strains

Usutu virus belonging to the EU3 lineage (AN: KX601690, Lecollinet *et al.*, 2016) was used in our experiments. Virus stock in MEM media were titrated at $10^{6.8}$ $TCID_{50}$/ml (Tissue Culture Infectious Dose 50), using the SpearmanKärber method (Kärber 1931) and stored at -80°C until experimental infections.

Infection by membrane feeding assay

Infectious blood feedings were carried out with 5- to 8-days-old females who had not previously taken a blood meal. The day before the infectious blood meal, small cages (15x15x15 cm) containing approximately 200 females were placed in climatic chambers in the BSL3 laboratory (BioSecurity Level 3) with the same constant environmental conditions as the insectarium but with no access to the honey solution. On the day of infection, 2 ml of infectious blood was prepared by mixing 1.5 ml of heparinized turkey blood, 0.5 mM ATP as a phagostimulant (Galun *et al.*, 1963), and 500 µl of MEM containing virus at a final titer of 10^6 $TCID_{50}$/ml. Mosquitoes were allowed to feed on infectious blood using an Hemotek® system at 37°C for 3 hours in darkness. Control groups were treated in the same manner but fed with blood containing ATP and MEM but lacking virus. After blood feeding, 500µl of infectious blood was stored at -80°C, and mosquitoes were anesthetized using CO_2 to sort out the fully engorged females. This was to limit any bias due to the amount of blood ingested which could influence infection phenotypes and other life history traits such as survival and egg production. They were kept individually for 14 days in Drosophila tubes filled with 5 mL of tap water and topped with a veil and a cotton ball soaked in a 5% honey solution that was renewed every 2- days. 14 days post infection (dpi), mosquitoes were first anesthetized to remove their

wings and legs and saliva was collected by inserting their proboscis into 20 µL tips filled with 10 µL of MEM + 10 % Fetal Bovine Serum (FBS) (as describe in (Dubrulle *et al.*, 2009)). Saliva was collected in 1.5ml tube after 30 minutes and stored at -80°C. Experimental infections were carried with the 4 colonies at the same time and repeated three times, resulting in 3 independent experimental infections.

Vector competence analysis

Total RNA was extracted using the KingFisher™ Flex automat and the NucleoMag RNA isolation kit (Macherey-Nagel) according to the manufacturer protocols and stored at -80°C.

To improve the quality of the extracted nucleic acids, thoraces and midguts tissues were extracted using a second extraction kit (EZNA OMEGA Total RNA I) but the resulting RNA quantity was lower, prevented us from detecting viral genomes in these tissues. We will therefore not speak of "infection" but of "exposure" to the infectious blood meal.

The detection and quantification of USUV viral genome was carried out by RT-qPCR as described by Prat *et al.* (Prat *et al.* 2024) using the NEB Luna® Universal One-step RT-qPCR kit and the primer set designed by Nikolay *et al.* (Nikolay *et al.*, 2014): USUV-Forward (5'-AAAAATGTACGCGGATGACACA-3') and USUV-Reverse (5'-TTTGGCCTCGTTGTCAAGATC-3'). For USUV quantification, RT-qPCR was run on a serial dilution of a plasmid containing the 103 pb insert as standard (Prat *et al.* 2024). The samples were analysed in duplicate concomitantly with a negative control and standard. Vector competence was assessed based on several parameters: the efficiency of infection is the proportion of infected tissues among mosquitoes alive at 14 dpi (days post-infection). For a fine characterization of vector competence, we calculated the transmission efficiency (TE: the proportion of mosquitoes with infected saliva among all blood-fed mosquitoes), the dissemination efficiency (DE: the proportion of mosquitoes with infected heads among all blood-fed mosquitoes.

Statistical analysis

We analysed the outcome of USUV infections in *Cx. quinquefasciatus* using infection prevalence parameters as response variables. We examined the effects of diverse explanatory variables: “genotype” (categorial variable with 4 levels: Slab, SR, SRQ and Ducos), “true blood

meal titer" (viral titer in blood after blood-feeding, numerical variable) and "Replicate" (categorical variable with three levels: A, B and C).

All statistical analyses were conducted using the R software 4.2.0. We computed generalized linear mixed effect models using the *glmmTMB* package (Brooks *et al.*, 2017) with a binomial error structure for analyzing the prevalence or a negative binomial structure for analyzing the viral load. Maximal models included the variables "genotype", "true blood meal titer", and all their interactions. The "Replicate'' variable was used as a random variable to account for the nested data structure, i.e., the correlations between individuals from the same feeding experiment, and was either selected or removed based on the lowest AIC. The significance of variables and selection of the minimal model was assessed using the ANOVA procedure within the package *car* (An R Companion to Applied Regression, 2023), which performs type III hypothesis likelihood ratio tests (LRT). Mean parameter estimates were computed and *post-hoc* tests carried out to assess the differences between estimates with corrections for multiple comparisons using the package *emmeans* (Lenth *et al.*, 2023).

RNAseq analysis

To explore the genes involved in vector competence, total RNA from individual thorax and midgut was extracted to obtain sufficient quantity for quality control. After Usutu detection by RT-qPCR in the corresponding saliva, pools of five individuals of the same colony were prepared with different vector competence phenotypes: mosquito with i) competent (USUV positive saliva), ii) non-competent (USUV negative saliva) and iii) control group mosquito (fed on non-infectious blood). Because of the very few or absence of competent individuals for SR (n = 3), Ducos (n = 2) and SRQ (n = 0) colonies the sample sizes were too low for the design of our transcriptomic analysis (i.e. pools of 5 individuals in each of the three replicates).

Preparation and sequencing of RNA libraries was carried out on competent (individuals with USUV positive saliva), non-competent (individuals with USUV negative saliva) and control for the Slab colony but only on non-competent and control individuals for the three resistant colonies. A total of 27 libraries over three biological replicates were sequenced to analyse 6 contrasts summarised in **Table 1** and **Table 2**.

Table 1 : Summary of conditions tested by RNA-Seq analysis :

Sample name	*Description*	*Condition*	*Number of replicates*	*Contrasts tested*
SL_CG	Slab control groups	Control	3	a, b
D_CG	Ducos control groups	Control	3	d
SR_CG	SR control groups	Control	3	e
SRQ_CG	SRQ control groups	Control	3	f
SL_NEG	Slab non competent	Infected	3	a, c
SL_POS	Slab competent	Infected	3	b, c
D	Ducos non competent	Infected	3	d
SR	SR non competent	Infected	3	e
SRQ	SRQ non competent	Infected	3	f

Summary of different conditions included in the analysis with their descriptions, the number of replicates and the contrasts tested (two identical letters shared by two lines of the table means that the comparison have been tested).

Table 2 : Distributions of DEGs for tested conditions.

Contrasts	*Number of DEGs*	*Number of over-expressed genes*	*Number of under-expressed genes*
SL_NEG vs SL_CG	675	637	38
SL_POS vs SL_CG	334	332	2
SL_POS vs SL_NEG	4	4	0
D vs D_CG	549	542	7
SR vs SR_CG	8	8	0
SRQ vs SRQ_CG	142	134	8

Filtered with p-adj=0.01 and log2FC +/- 1. DEG: differentially expressed genes.

RNA-seq libraries were prepared by MGX platform (Montpellier GenomiX) using Stranded mRNA Prep Ligation from Illumina and sequenced on a Novaseq6000. Adapter sequences were trimmed with Cutadapt (Martin, 2011), and the raw sequencing data were quality-controlled with FastQC (Andrews, S. 2010). The annotation of the *Culex quinquefasciatus* JHB 2020 genome (GCA_015732745.1) was used for mapping RNAseq reads to the transcriptome using STAR (Dobin *et al.*, 2013).

Differentially Expressed Genes (DEG) analysis and gene ontology enrichment analysis were carried out using the AskoR package (Alves-Carvalho *et al.*, 2021), an automated pipeline performing a complete transcriptomic analysis with the EdgeR (Yunshun Chen, 2017), UpSetR (Gehlenborg, 2015), topGO (Adrian Alexa, 2017) and Coseq R packages (Andrea Rau, 2017). Significant changes were filtered by logfold changes (logFC) +/- 1 and adjusted p-value ≤ 0.01. Identification of transcript was performed using Blast with the Uniprot database (https://gannet.fish.washington.edu/seashell/snaps/uniprot_table_r2023_01.tab). Gene ontology terms were assigned for differentially expressed genes using Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005). The topGO package was used with Fisher's exact tests and weight01 algorithms. Enrichment score was calculated as the ratio of the number of differentially expressed genes in the pathway compared to its expected number by chance. Contrasts containing less than 100 DEGs cannot be subjected to robust GO term enrichment analysis and will be discussed at the scale of highly DE genes. We focus our analysis on the GO term that represents an enrichment from at least 10 genes. A less stringent analysis considering two genes for each GO term is available in supplementary data.

Results:

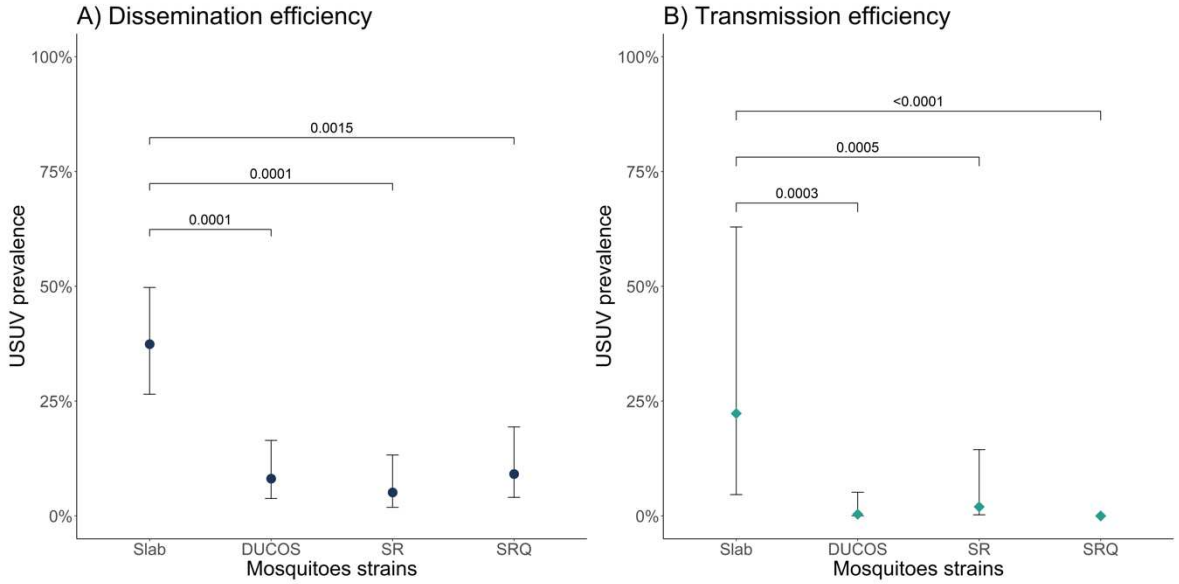
Impact of resistance genotype on USUV transmission:

First, we investigated the prevalence of USUV in heads and saliva to investigate the dissemination and transmission efficiency (DE and TE respectively; see *Vector competence analysis* in *Material and Method).* We analysed a total of 337 mosquitoes (n = 83 Slab ; n = 108 Ducos ; n = 83 SR and n = 70 SRQ). For the two infection phenotypes, the variable "Genotype" had a significant effect DE : (Chi^2 = 34.1 ; p-value < 0.0001) TE : (Chi^2 = 27.7 ; p-value < 0.0001)

Slab colony showed a significantly higher dissemination efficiency (DE_{slab} = 0.37 95% confidence interval [0.26; 0.49]) than the three resistant colonies (DE_{Ducos} = 0.08 [0.04 ; 0.16] p-value = 0.001; DE_{SR} = 0.05 [0.02 ; 0.13] p-value = 0.0001 and DE_{SRQ} = 0.09 [0.04; 0.19] p-value = 0.0001; **Figure 2A**). There were no significant difference in DE between resistant colony (p-value > 0.05)

The same pattern was observed for the transmission efficiency where Slab showed a significantly higher TE than the three other colonies (TE_{slab} = 0.22 [0.04 ; 0.62]) compared to TE_{Ducos} = 0.003 [0 ; 0.05] p-value = 0.0003 ; TE_{SR} = 0.01 [0 ; 0.14] p-value = 0.0005 and TE_{SRQ} = 0 p-value < 0.0001 ; **Figure 2B**). Resistant colonies presented a significant lower TE or no detection of USUV RNA in saliva. For instance, no saliva was found in SRQ positive for USUV among the 30 individuals tested in triplicate. There were no significant difference in TE between resistant colony (p-value > 0.05). For downstream analysis, we considered these colonies (Ducos, SR and SRQ) as "non competent" considering the main transmission phenotype.

Figure 2 : Dissemination and transmission efficiency of USUV by *Cx. quinquefasciatus* colonies.

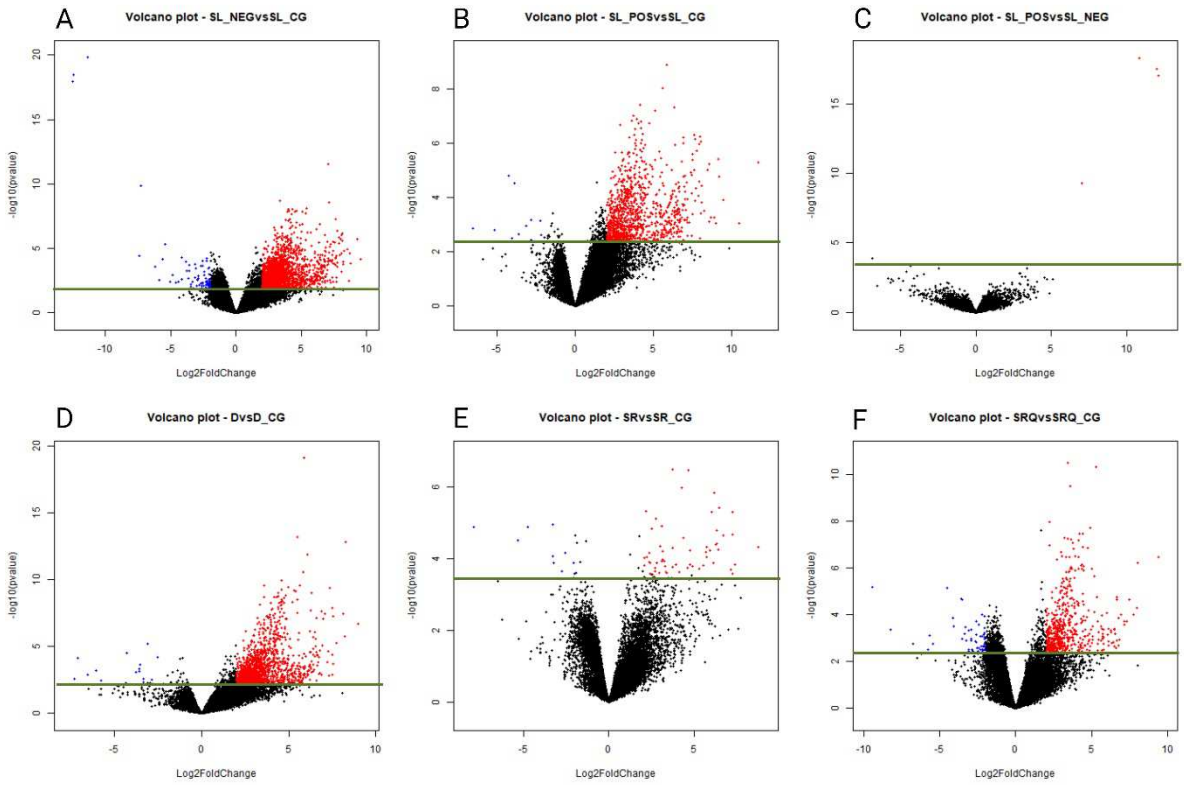


The proportions of mosquitoes heads (circles) and salivas (square) infected 14 dpi with EU3 strain are indicated for the fours mosquitoes colonies. Points represents the average percentage define by general linear mixed model, with error bars (95% CI). Only the significant differences are represented with values.

RNA-Seq analysis of Cx. quinquefasciatus vector competence

The total number of reads per sample varied between 19,699,626 and 30,536,374 among the 27 sequenced RNA samples. The reads were aligned to the *Culex quinquefasciatus* genome (GeneBank ID : JHB 2020 (GCA_015732745.1)). After normalization and Differential Expression (DE) analysis, the volcano plots (**Figure 3**) revealed that most of DEGs are overexpressed in exposed individuals compared to the control groups for each contrasts tested (**see details Table 3**). We identified 4 to 675 differentially expressed genes (DEGs) from each contrasts tested (**Table 3**) illustrating the large differences in DEGs numbers following exposure to an infected blood meal.

Figure 3 : Volcano plots of DEGs for each tested comparison.



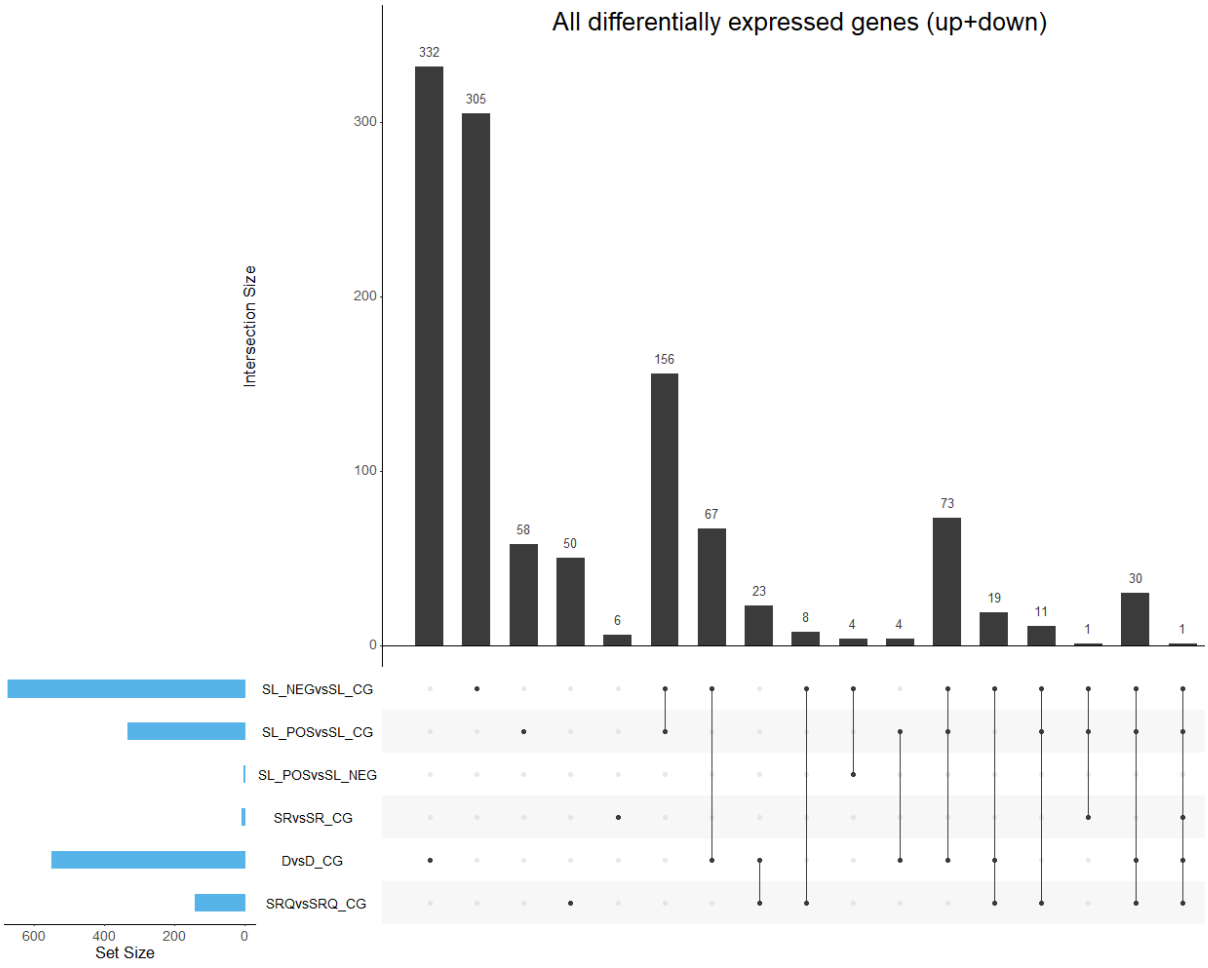
Volcano plot analysis of differentially expressed genes (DEGs) between : A) Slab negative and SLab CG ; B) Slab positive and CG ; C) Slab positive and Slab negative ; D) Ducos negative and CG ; E) SR negative and CG and F) SRQ negative and CG. Red circles indicate DEGs with FDR p-value of < 0.01 (green line) and log2 fold changes > 1 and blue circles indicate DEGs with FDR p-value of < 0.01 and log2 fold changes < 1.

The Upset plot (**Figure 4**) allowed to compare the DEGs shared/unique between contrasts of non-competent vs control for all colonies. Contrasts for Ducos and Slab have the highest number of unique DEGs (332 and 305 genes, respectively) between non-competent vs control, while the number of DEGs unique to non-competent vs control contrast is lower for the other colonies: 58 in Slab competent vs Slab CG, 6 in SR vs SR CG and 50 in SRQ vs SRQ CG. In contrast, the largest number of shared DEGs was observed between non-competent vs control and competent vs control for the Slab colony, where 156 shared DEGs. Lower number of shared DEG were observed between Slab competent vs Slab CG , Slab non-competent vs Slab CG and Ducos vs Ducos CG contrast (73 shared DEGs **Figure 4**) and between Slab non-competent vs Slab CG with Ducos non-competent vs Ducos CG (67 shared DEGs **Figure 4**).

Due to high number of DEG in some contrasts, we will focus on the 4 most DE in case of Slab non-competent vs Slab CG, Slab competent vs Slab CG, Ducos vs Ducos CG and SRQ vs SRQ CG.

The high number of DEGs allowed to perform a GO enrichment analysis to determine the biological processes significantly affected by USUV exposure and vector competence, focusing on the most significantly enriched GO term per contrast. All the results concerning significant GO term and gene involved in it are available in supplementary data.

Figure 4 : Upsetplots of contrasts tested between each colony and their respective control groups



Upsetplot showing overlap size of sets of differentially expressed genes for diverse genotypes vs CG associated or two conditions. The top vertical bar plot shows the number of genes (y axis) contained in each intersection (x axis). The horizontal bar plot at the bottom shows the number of differentially expressed genes for each comparison.

Slab competent vs Slab non-competent:

In this contrast only 4 genes were differentially expressed, with only two described in *Drosophila*. The first one is a highly overexpressed gene (logFC = 12) encoding a protein involved in ribosome biogenesis (U3 small nucleolar RNA-associated protein, AN: XP_017960640.1) (Wehner *et al.*, 2002). The second gene (logFC = 7) codes for a Small integral membrane protein 4 (SMIM4, AN: XP_001354917) (Bosch *et al.*, 2023). Derived from mammalian annotations, the other two genes code for a protein involved in cell regulatory functions (Transducin Beta Like 3, logFC = 10.8) and for a protein involved in DNA replication and repair (logFC = 12.09, (Kohzaki *et al.*, 2018)).

Slab competent vs Slab control:

The competent vs control contrast for Slab presented 334 DEGs with 332 genes up-regulated and 2 downregulated (see **Figure 3B** and **Table 3**). The most up-regulated code for the Beta-1,3-glucan-binding protein (GBP) (logFC = 11.7), the Transmembrane protein 177 (logFC = 9.4) and two other transcripts with no annotation related to shorts sequences codind for uncharacterised protein. The two downregulated genes code for the Uroporphyrinogen-III synthase (UROIIIS) (logFC = -4.2) and for the kin IRRE-like protein 1 ; logFC = -3.8.

Among the up-regulated genes, 157 were annotated allowing GO enrichment analysis. Up-regulated genes were associated with only two Biological Processes (BP): “Proteolysis” (GO:0006508) and “innate immune response” (GO:0045087) (**Figure 5A**). Most of the genes included in 'Proteolysis' code for serine endopeptidases (EC 3.4.21, N_{gene}= 17) with an average logFC = 3.4 and for enzymes of the Metalloendopeptidase class (n = 2) (EC 3.4.24) with an average logFC = 5.3. Among the 15 genes associated with the 'innate immune response' biological process, six code also for serine endopeptidases (EC 3.4.21).

Slab non-competent vs Slab control:

The Slab non-competent group presented 675 DEGs compared to the control group, among them 637 were up-regulated and 38 down-regulated (see **Figure 3A** and **Table 3**).

The most up-regulated genes code for: Beta-1,3-glucan-binding protein (GBP) (logFC = 9.5), Luciferin 4-monooxygenase (Luciferase) (logFC = 9.3), and the Alpha-amylase A (1,4-alpha-D-glucan glucanohydrolase) logFC = 8.7. The most down-regulated genes code for: Transducin

beta-like protein 3 (logFC = -11.3), U3 small nucleolar RNA-associated protein 18 homolog (logFC = -12.4), Replication factor C subunit 3 (Activator 1 38 kDa subunit) (logFC = -12.5) and Small integral membrane protein 4 (logFC = -7.2).

Among all DEGs, 364 genes were annotated with GO term (**Figure 5B**). Among the most significantly enriched BP, 11 genes belong to the "sodium ion transport" (GO:0006814). The second most significantly enriched GO term is the "Toll receptor ligand protein activation cascade" (GO:0160032) with 11 genes (**See table supplementary data**). The third most significantly enriched GO term is 'Proteolysis' (GO: 0006508) with 63 genes. The zymogen activation process (GO:0031638) brings together 10 genes that are involved in digestive and immune proteolysis pathways. The GO term "innate immune response" (GO:0045087) is also significantly enriched with 25 genes. Lastly, other GO terms linked to energy metabolism processes (lipids, sterols, fatty acids) were found enriched.

Ducos non-competent vs Ducos control:

The contrast of Ducos non-competent vs controls group showed a high number DEGs with 549 genes: 542 were up-regulated and 7 down-regulated (see **Figure 3D** and **Table 3**).

The most up-regulated genes code for four proteins respectively: a zinc finger protein 575-like (logFC = 8.9), a cytokine receptor (logFC = 8.26), quinque_mtp_023320 coding for an uncharacterized protein in *Cx. quinquefasciatus* (AN : XM_001861395) (logFC = 8.23) and a protein describe in *Aspergillus aculeatus* (logFC = 8.1). The 4 most down-regulated genes code for: DDB1- and CUL4-associated factor (logFC = -7.1), the glial cells missing transcription factor (logFC = -4.3) and two non-annotated genes (AN: XM_039594812, logFC = -3.5, AN: XM_039593293, logFC = -3).

Among the 549 DEGs, 313 were annotated and used for GO enrichment analysis (**Figure 5C**). The three GO terms with the most significant enrichment are: “Proteolysis” (GO:0006508) (N_{gene}= 63 genes), “innate immune response” (GO:0045087) (n = 34 genes) and “Toll receptor ligand protein activation cascade “(GO:0160032) (n = 14 genes). The 4 others enriched GO terms (GO:0006811 ; GO:0016042 ; GO:0072376 ; GO:0005975) are linked to energy metabolism processes (lipids, proteins and sugars).

SR vs SR control:

For SR, only 8 genes were DE, all up-regulated and only two of these genes were annotated (see **Figure 3E** and **Table 3**). This low number of genes did not allow for performing a robust GO term analysis. The most up-regulated (logFC = 7.2) gene encodes an Aminopeptidase N (EC 3.4.11.2). The other up-regulated annotated gene codes for a trehalose transporter involved in energy metabolism.

SRQ vs SRQ control :

Concerning the SRQ vs control contrast, 142 genes were DE with 134 up-regulated and 8 down-regulated (see **Figure 3F** and **Table 3**). Among the DEG, 72 were annotated but GO enrichment analysis was not possible because GO terms failed to pass the analysis filters.

The 2 most up-regulated genes in this contrast code for uncharacterized proteins AN: XM_038261188.1, logFC = 9.3 and AN: XM_039578294.1, logFC = 7.9). The following two up-regulated genes were involved in the energy metabolism and fatty acid elongation (very long chain fatty acids protein 7, logFC = 7.7), and one gene coding for Serine hydrolase (logFC = 7.4). Interestingly one gene code for the cytochrome P450 6d3 (logFC = 5.1). Lastly, the *ace-1* gene encoding the acetylcholinesterase-1 was found up-regulated (logFC = 3.8), but were not DE in any of the other contrasts studied.

Shared DEG between contrasts

The upset plot revealed one significant DEG shared between the non-competent vs control contrasts from all mosquito colonies (Slab competent vs Slab control; Slab non-competent vs Slab control; Ducos non-competent vs Ducos control; SR non-competent vs SR control and SRQ non-competent vs SRQ control) with a mean up-regulation of logFC = 4.1 +/- 0.19. This gene encodes a *Culex quinquefasciatus* uncharacterized protein (AN: XM_038266653).

Figure 5 : Dotplot of Biological process GO term

Dotplot of significantly (adjusted p-value<0.05) enriched GO biological process for differentially expressed genes (up and down-regulated) at 14 dpi. We did not find enriched GO terms for down-regulated genes for SRQ non competent vs. controls.

Discussion:

Multiple factors can modulate mosquito-arbovirus interactions and mosquito life history traits, which ultimately would impact arbovirus transmission. Here, our main objective was to study the impact of insecticide resistant alleles on the vector competence of *Culex quinquefasciatus* for USUV. To this end, we experimentally infected four colonies of *Culex quinquefasciatus* sharing a common genetic background and presenting three distinct alleles at the *ace-1* locus.

Vector competence differed between susceptible and resistant colonies:

Despite the lack of data related to midgut infection, our results highlight the difference in vector competence between colonies from the dissemination of the virus (i.e. infection outside of midguts). The susceptible colony Slab had a greater prevalence of USUV infection in mosquito heads than the resistant colonies (**Figure 2)** indicating a higher dissemination efficiency and/or probably a higher infection in the Slab colony. This difference in USUV prevalence between resistant and susceptible colonies was also observed in the saliva where the susceptible colony had a higher transmission efficiency (or TE) than the resistant ones. Indeed, the TE of the resistant colonies were very low (1.9% for SR, 0.3% for Ducos and 0% for SRQ). Thus, the resistant alleles at the *ace-1* locus are associated with a reduction of the vector competence for USUV. This was evidenced only for EU3 lineage of USUV and more investigation is needed to test whether this reduction is lineage specific or independent as in *Cx. pipiens* (Prat *et al.* 2024).

Furthermore, comparing our results with previous studies highlights the complexity of the interactions between resistant alleles and vector competence, which can vary depending on the pathogen and mosquito species studied. Unlike our study, previous work using experimental infections have shown an increased vector competence associated with the resistant allele *ace-1*^{R} (SR colony). Indeed, *Cx. quinquefasciatus* homozygous for the *ace-1*^{R} showed an increased vector competence for WNV compared to their susceptible counterpart (Atyame *et al.*, 2019). However, in other models, the *ace-1*^{R} allele had no effect on the vector competence of *An. gambiae* for *P. falciparum* (Alout *et al.*, 2013) and on the vector competence of *Cx. quinquefasciatus* for Rift Valley fever virus (Atyame *et al.*, 2019). The

observed reduction in transmission efficiency in resistant colonies suggests a pleiotropic effect of the *ace-1*^{R} associated alleles, suggesting that these genetic adaptations to toxic environments may impact their adaptation to some arbovirus species such as USUV.

The effects of insecticide resistance in reducing parameters influencing vector competence for a pathogen have been demonstrated for *An. gambiae*, for which the *kdr* mutation reduced the parasite load of homozygous individuals (Alout *et al.*, 2013).

However, given that these results are limited to the EU3 lineage of the virus, further research is essential to determine whether this reduction in vector competence is specific to the lineage or not. Based on these variations of vector competence, we carried out a transcriptomic analysis aiming to identify the genes that may be involved in vector competence.

Exploring the genetics factors implicated in vector competence.

The distribution and number of DEGs between the contrasts studied have shown some relevant information. On the one hand, the Upsetplot in **Figure 4** shows that a large proportion of DEGs (751/1712 over all contrasts) are unique to each condition relative to their respective control. On the other hand, a single gene was shared between the 5 contrasts (condition vs control group) and codes for an uncharacterized protein (*Culex quinquefasciatus* uncharacterized protein LOC6044957 by mean logFC = 4.08 +/- 1.2). This protein may be probably linked to viral infection but its functional characterization is needed to help understand its potential role in the observed phenotypes.

Vector competence of the Slab colony

Analysis of the DEGs and associated GO terms showed different patterns in contrasts involving Slab versus control (either Slab competent vs Slab CG or Slab non-competent vs Slab CG), we have found: (i) genes shared between the two contrasts were related to proteolysis and innate immunity, including serine proteases, clip-domain serine proteases as well as trypsins and chymotrypsins involved in both metabolism and immune defenses (Verma 2018) and we also noted that the Slab non-competent vs control contrast showed greater expression (higher fold-change) of genes involved in metabolic pathways than in the Slab competent vs control contrast; (ii) genes specific to the Slab non-competent vs. control contrast with a high number of DEGs that are part of the immune pathway in arthropods (Toll pathway). In USUV non-

competent Slab, immune and energetic metabolism processes appeared much more triggered than in competent Slab that could lead to a more effective virus clearance.
This might be consistent with transcriptomic profiles of Ducos which is non competent for USUV EU3 as well and explain the lack of viral genome prevalence in saliva. But we will see, gene expression profiles among resistant colony aren't equal.

The direct comparison of competent (USUV-positive) relative to the non-competent (USUV-negative) individuals of the Slab colony revealed only four genes up-regulated in competent individuals with a logFC ranging from 7 to 12. These four genes could potentially be implicated in vector competence of Slab individuals but these results are based solely on statistically tested differences under our experimental conditions, and the involvement of other genes cannot be ruled out. Among the four genes, one codes for the replication factor C subunit 3 is involved in DNA replication processes (Krause *et al.* 2001), one for a small RNA-associated protein involved in pre-RNA processing and ribosome biogenesis (Fichelson *et al.* 2009), one for the transducin beta like 3, involved in signal transduction, RNA processing, gene regulation and vesicular trafficking (He *et al.*, 2018); and one for the small integral membrane protein 4, involved in the transport of molecules across membranes (Bosch *et al.*, 2023). These genes are involved in processing of nucleic acids, and particularly RNA, and cellular membranes which may foster replication of viral RNA and formation of viral particles. In the future, it will be interesting to validate the differential expression of these genes in *Cx. quinquefasciatus* mosquitoes infected by other arboviruses.

Response to USUV exposure

Due to the very low number of competent mosquitoes in resistant colonies, we explored the genes potentially involved in the response to virus exposure through the analysis of non-competent *vs.* control contrasts. In the resistant colonies, differential expression analysis showed heterogeneous expression patterns: contrasts involving the SR or SRQ colony showed a lower number of differentially expressed genes than for Ducos.
Focusing on the SR colony (non-competent vs control), only eight DEG were recorded. Among them, the most up-regulated gene codes for an Aminopeptidase N involved in blood digestive process, as described in *An. stephensi* (Billingsley and Hecker, 1991). In *Aedes* mosquitoes, this protein secreted by the midgut bacteria *Chromobacterium sp.* has been demonstrated to interfere with DENV attachment and degradation of viral E protein by protease excretion,

including Aminopeptidases (Ramirez *et al.*, 2014; Saraiva *et al.*, 2018). This might be involved in the non-competence phenotype by blocking infection at the midguts level. The second most up-regulated gene codes for a trehalose transporter which is the major sugar transporter present in the haemolymph and is involved in energy metabolism. Overexpression of trehalose transporter may be associated with stresses induced by an abiotic external factor such as heat stress, as described in *Helicoverpa armigera* (Tellis *et al.*, 2023) and *Anopheles gambiae* (Liu *et al.*, 2013). In our data, the viral infection may induce a stress to mosquito that trigger the up-regulation of the trehalose transporter gene.

Analysis on the Ducos (D_1 allele) colony, the non-competent vs control contrast showed several DEGs involved in proteolysis, innate immunity and Toll pathways that are important for the mosquito immune response to viruses, as well as for energy metabolism. Among these genes, the serine-endopeptidase genes codes for proteins involved in the Spätzle activation cascades within the Toll pathway that leads to the synthesis of antimicrobial peptides (Gorman and Paskewitz, 2001).

In the non-competent SRQ vs control contrast, the immune response appeared implicated to a lesser extent than in Slab non-competent as only fewer common genes were DE. These include serine hydrolase and clip-domain serine proteases (**supplementary data**) which have been implicated in the Toll pathway. We also observed the up-regulation of cytochromes P450 which code for enzymes that metabolize endogenous and exogenous compounds, like insecticides (David *et al.*, 2013) but might be also implicated in pathogen-vector interactions, particularly to control the associated oxidative stress (Hernandez *et al.*, 2022).

The transcriptomic responses associated with USUV exposure or infection show a heterogeneous pattern in the number of DEG between mosquito colonies against their respective control group. While the responses to USUV exposure in Slab and Ducos showed that metabolic and immune pathways were involved, the number of DEGs in SR and SRQ was smaller. One common feature is that Slab and Ducos possess a susceptible *ace-1* copy contrary to SR and SRQ which have only mutated *ace-1* copies. However, by which mean the mutated synaptic AChE1 could reduce the transcriptomic response to USUV exposure remains an open question.

Our study is based on the exploration of the effects of OP resistance and the genomic architecture of the resistance alleles on the transmission of the Usutu virus EU3 lineage.

Among the resistant colonies studied, various architectures at the *ace-1* locus were investigated: homozygous monocopies (R_1), heterogeneous duplications (D_1) of the *ace-1* allele and homogeneous duplications (R_2^3).

The heterogeneous duplication architecture (D_1) reduces the cost of the selective value of individuals by combining a susceptible and a resistant copy at the locus in question (Labbé *et al.*, 2007a). In addition, in our case, it reduces the vector competence of individuals when they take an infected blood meal. Conversely, the other two alleles, R and R_2^3, were associated with colonies that were very weakly (R_1) or not at all competent (R_2^3) for this viral line. In addition, the low number of differentially expressed genes compared with the other conditions tested indicates that vector-pathogen interactions had no major effect on these genotypes. The pleiotropic effects on vector physiology linked to the *ace-1*^{R} copy and its multiple presence in the R_2^3 allele could be different in the absence of the susceptible copy, in which case the effects on infection are all the more marked with colonies that are either i) infectious earlier or ii) refractory to infection, as proposed in discussion hypothesis. One question that will be studied in the future is whether these effects are not detrimental to the fitness of R and R_2^3 individuals in the context of exposure to an infected blood meal.

While Ducos colony had a very low transmission efficiency compared to Slab, RNA-seq data showed similar outcome between non-competent Slab and Ducos. This could be due to a greater extrinsic incubation period for USUV in Ducos where this colony might be more competent but later in mosquito lifetime. Studies on vector competence for the USUV virus in *Culex* and *Aedes* mosquitoes have shown that transmission can occur from 7 to 10 days after blood feeding (Martinet *et al.*, 2023; Krambrich *et al.*, 2024), which highlights that the EIP vary according to species and populations within one species.

The SR and SRQ colonies had the lowest numbers of differentially expressed genes, suggesting that the overall gene expression profile was close to that of the control. This might be consistent with SR and SRQ colonies being refractory to infection raises questions about the interaction between pathogen and vector over time. Is the challenge posed by USUV less costly or is it expressed early after the infectious bloodmeal? Under our conditions, USUV

would be eliminated early from the mosquito body without initiating infection in the midgut. 14 days after the infectious bloodmeal, it would then result in gene expression profiles similar to the control individuals. To our knowledge, the temporal dynamic of gene expression during the extrinsic incubation period has not yet been explored and stresses the importance considering EIP should in future studies.

Conclusion and perspectives

In conclusion, our experimental data showed that *Cx. quinquefasciatus* is competent for the EU3 lineage of USUV. *ace-1* resistant alleles are associated with a reduction of the vector competence for USUV, irrespective of the genomic architecture of the resistant allele. This suggests that the diverse genomic architecture of the *ace-1* allele does not affect vector competence. Surprisingly, however, transcriptomic analyses showed that the Ducos colony with the heterogenous *ace-1* duplication had similar transcriptomic responses to the susceptible Slab colony. The transcriptomic showed that genes related to energy metabolism and immunity were up-regulated in less competent colonies. This may indicate an effective response against USUV in these colonies but the number of DEGs are heterogeneous between similar phenotypes. The heterogeneity of responses of *Cx. quinquefasciatus* colonies to USUV demonstrated the complexity of vector-pathogen interactions due to the many factors that can have an influence. Previous research indicates that the various genomic architectures of the *ace-1* locus confer variable advantages in response to different insecticidal pressures. Homogeneous and heterogeneous duplications are preferentially selected according to treatment intensity and are conserved over time may therefore influence USUV transmission in area treated with OP insecticides.

Supplementary data :

https://github.com/maxprat/Thesis-Culex-mosquitoes

Author's contribution :

Conceptualization: Haoues Alout. Data curation: Maxime Prat, Haoues Alout, Théo Durand. Formal analysis: Maxime Prat, Haoues Alout. Funding acquisition: Pierrick Labbé, Haoues Alout. Investigation: Maxime Prat, Haoues Alout. Methodology: Maxime Prat, Théo Durand,

Mélanie Jeanneau, David Bru, Haoues Alout. Project administration: Pierrick Labbé. Resources: Maxime Prat, Patrick Makoundou, Sandra Unal, Théo Durand, Mélanie Jeanneau, David Bru, Yannick Simonin. Supervision: Haoues Alout. Visualization: Maxime Prat. Writing – original draft: Maxime Prat, Haoues Alout. Writing –review & editing: Maxime Prat, Pierrick Labbé, Haoues Alout.

Bibliographie :

Adrian Alexa, J. R. (2017). topGO. doi: 10.18129/B9.BIOC.TOPGO.

Alout, H., Berthomieu, A., Hadjivassilis, A. and Weill, M. (2007). A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to Culex pipiens mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**, 41–47. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.10.001.

Alout, H., Djogbénou, L., Berticat, C., Chandre, F. and Weill, M. (2008). Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetycholinesterase 1 biochemical properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **150**, 271–277. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.03.008.

Alout, H., Ndam, N. T., Sandeu, M. M., Djégbe, I., Chandre, F., Dabiré, R. K., Djogbénou, L. S., Corbel, V. and Cohuet, A. (2013). Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of Anopheles gambiae s.s. for Plasmodium falciparum Field Isolates. *PLoS ONE* **8**, e63849. doi: 10.1371/journal.pone.0063849.

Alout, H., Yameogo, B., Djogbenou, L. S., Chandre, F., Dabire, R. K., Corbel, V. and Cohuet, A. (2014). Interplay Between Plasmodium Infection and Resistance to Insecticides in Vector Mosquitoes. *Journal of Infectious Diseases* **210**, 1464–1470. doi: 10.1093/infdis/jiu276.

Alves-Carvalho, S., Gazengel, K., Bretaudeau, A., Robin, S., Daval, S. and Legeai, F. (2021). AskoR, A R Package for Easy RNASeq Data Analysis. In *Proceedings of The 1st International Electronic Conference on Entomology*, p. 10646. MDPI, Sciforum.net doi: 10.3390/IECE-10646.

An R Companion to Applied Regression (2023). *SAGE Publications Inc*.

Andrea Rau, C. M.-R. (2017). coseq. doi: 10.18129/B9.BIOC.COSEQ.

Atyame, C. M., Alout, H., Mousson, L., Vazeille, M., Diallo, M., Weill, M. and Failloux, A.-B. (2019). Insecticide resistance genes affect Culex quinquefasciatus vector competence for West Nile virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**, 20182273. doi: 10.1098/rspb.2018.2273.

Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M. and Chevillon, C. (2002). Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* **79**, 41–47. doi: 10.1017/S001667230100547X.

Billingsley, P. F. and Hecker, H. (1991). Blood Digestion in the Mosquito, Anopheles stephensi Liston (Diptera: Culicidae): Activity and Distribution of Trypsin, Aminopeptidase, and α-Glucosidase in the Midgut. *Journal of Medical Entomology* **28**, 865–871. doi: 10.1093/jmedent/28.6.865.

Bosch, J. A., Keith, N., Escobedo, F., Fisher, W. W., LaGraff, J. T., Rabasco, J., Wan, K. H., Weiszmann, R., Hu, Y., Kondo, S., Brown, J. B., Perrimon, N. and Celniker, S. E.

(2023). Molecular and functional characterization of the Drosophila melanogaster conserved smORFome. *Cell reports* **42**, 113311. doi: 10.1016/j.celrep.2023.113311.

Bourguet, D., Raymond, M., Bisset, J., Pasteur, N. and Arpagaus, M. (1996). Duplication of the Ace.1 locus in Culex pipiens mosquitoes from the Caribbean. *Biochemical Genetics* **34**, 351–362. doi: 10.1007/BF00554410.

Bourguet, D., Guillemaud, T., Chevillon, C. and Raymond, M. (2004). FITNESS COSTS OF INSECTICIDE RESISTANCE IN NATURAL BREEDING SITES OF THE MOSQUITO CULEX PIPIENS. *Evolution* **58**, 128–135. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01579.x.

Brooks, M., E., Kristensen, K., Benthem, K., J. ,van, Magnusson, A., Berg, C., W., Nielsen, A., Skaug, H., J., Mächler, M. and Bolker, B., M. (2017). glmmTMB Balances Speed and Flexibility Among Packages for Zero-inflated Generalized Linear Mixed Modeling. *The R Journal* **9**, 378. doi: 10.32614/RJ-2017-066.

Cadar, D. and Simonin, Y. (2022). Human Usutu Virus Infections in Europe: A New Risk on Horizon? *Viruses* **15**, 77. doi: 10.3390/v15010077.

Claret, J.-L., Di-Liegro, M., Namias, A., Assogba, B., Makoundou, P., Koffi, A., Pennetier, C., Weill, M., Milesi, P. and Labbé, P. (2024). Despite structural identity, ace-1 heterogenous duplication resistance alleles are quite diverse in Anopheles mosquitoes. *Heredity* **132**, 179–191. doi: 10.1038/s41437-024-00670-9.

Clé, M., Beck, C., Salinas, S., Lecollinet, S., Gutierrez, S., Van de Perre, P., Baldet, T., Foulongne, V. and Simonin, Y. (2019). Usutu virus: A new threat? *Epidemiology and Infection* **147**, e232. doi: 10.1017/S0950268819001213.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674–3676. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610.

David, J.-P., Ismail, H. M., Chandor-Proust, A. and Paine, M. J. I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**, 20120429. doi: 10.1098/rstb.2012.0429.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. and Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.

Du, W., Awolola, T. S., Howell, P., Koekemoer, L. L., Brooke, B. D., Benedict, M. Q., Coetzee, M. and Zheng, L. (2005). Independent mutations in the *Rdl* locus confer dieldrin resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Molecular Biology* **14**, 179–183. doi: 10.1111/j.1365-2583.2005.00544.x.

Dubrulle, M., Mousson, L., Moutailler, S., Vazeille, M. and Failloux, A.-B. (2009). Chikungunya Virus and Aedes Mosquitoes: Saliva Is Infectious as soon as Two Days after Oral Infection. *PLOS ONE* **4**, e5895. doi: 10.1371/journal.pone.0005895.

Duron, O., Lagnel, J., Raymond, M., Bourtzis, K., Fort, P. and Weill, M. (2005). Transposable element polymorphism of Wolbachia in the mosquito Culex pipiens: evidence of genetic diversity, superinfection and recombination. *Molecular Ecology* **14**, 1561–1573. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02495.x.

Galun, R., Avi-Dor, Y. and Bar-Zeev, M. (1963). Feeding Response in Aedes aegypti: Stimulation by Adenosine Triphosphate. *Science* **142**, 1674–1675. doi: 10.1126/science.142.3600.1674.

Gazave, É., Chevillon, C., Lenormand, T., Marquine, M. and Raymond, M. (2001). Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito Culex pipiens. *Heredity* **87**, 441–448. doi: 10.1046/j.1365-2540.2001.00926.x.

Gehlenborg, N. (2015). UpSetR: A More Scalable Alternative to Venn and Euler Diagrams for Visualizing Intersecting Sets. 1.4.0. doi: 10.32614/CRAN.package.UpSetR.

Georghiou, G. P., Metcalf, R. L. and Gidden, F. E. (1966). Carbamate-resistance in mosquitos. Selection of Culex pipiens fatigans Wiedemann (=C. quinquefasciatus Say) for resistance to Baygon. *Bulletin of the World Health Organization* **35**, 691–708.

Gorman, M. J. and Paskewitz, S. M. (2001). Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 257–262. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00145-4.

He, S., Tong, X., Han, M., Hu, H. and Dai, F. (2018). Genome-Wide Identification and Characterization of WD40 Protein Genes in the Silkworm, Bombyx mori. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 527. doi: 10.3390/ijms19020527.

Hernandez, E. P., Anisuzzaman, Alim, M. A., Kawada, H., Kwofie, K. D., Ladzekpo, D., Koike, Y., Inoue, T., Sasaki, S., Mikami, F., Matsubayashi, M., Tanaka, T., Tsuji, N. and Hatta, T. (2022). Ambivalent Roles of Oxidative Stress in Triangular Relationships among Arthropod Vectors, Pathogens and Hosts. *Antioxidants* **11**,. doi: 10.3390/antiox11071254.

Kabula, B., Tungu, P., Rippon, E. J., Steen, K., Kisinza, W., Magesa, S., Mosha, F. and Donnelly, M. J. (2016). A significant association between deltamethrin resistance, Plasmodium falciparum infection and the Vgsc-1014S resistance mutation in Anopheles gambiae highlights the epidemiological importance of resistance markers. *Malaria Journal* **15**, 289. doi: 10.1186/s12936-016-1331-5.

Kading, R. C., Brault, A. C. and Beckham, J. D. (2020). Global Perspectives on Arbovirus Outbreaks: A 2020 Snapshot. *Tropical Medicine and Infectious Disease* **5**, 142. doi: 10.3390/tropicalmed5030142.

Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **162**, 480–483. doi: 10.1007/BF01863914.

Kohzaki, H., Asano, M. and Murakami, Y. (2018). DNA replication machinery is required for development in Drosophila. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)* **23**, 493–505. doi: 10.2741/4601.

742 **Krambrich, J., Bole-Feysot, E., Höller, P., Lundkvist, Å. and Hesson, J. C.** (2024). Vector
743 competence of Swedish *Culex pipiens* mosquitoes for Usutu virus. *One Health* **18**, 100707.
744 doi: 10.1016/j.onehlt.2024.100707.

745 **Labbé, P., Berthomieu, A., Berticat, C., Alout, H., Raymond, M., Lenormand, T. and**
746 **Weill, M.** (2007a). Independent Duplications of the Acetylcholinesterase Gene Conferring
747 Insecticide Resistance in the Mosquito Culex pipiens. *Molecular Biology and Evolution* **24**,
748 1056–1067. doi: 10.1093/molbev/msm025.

749 **Labbé, P., Berticat, C., Berthomieu, A., Unal, S., Bernard, C., Weill, M. and**
750 **Lenormand, T.** (2007b). Forty Years of Erratic Insecticide Resistance Evolution in the
751 Mosquito Culex pipiens. *PLOS Genetics* **3**, e205. doi: 10.1371/journal.pgen.0030205.

752 **Labbé, P., David, J.-P., Alout, H., Milesi, P., Djogbénou, L., Pasteur, N. and Weill, M.**
753 (2017). Evolution of Resistance to Insecticide in Disease Vectors. In *Genetics and Evolution*
754 *of Infectious Diseases (Second Edition)* (ed. Tibayrenc, M.), pp. 313–339. Elsevier, London
755 doi: 10.1016/B978-0-12-799942-5.00014-7.

756 **Lenormand, T., Guillemaud, T., Bourguet, D. and Raymond, M.** (1998). APPEARANCE
757 AND SWEEP OF A GENE DUPLICATION: ADAPTIVE RESPONSE AND POTENTIAL
758 FOR NEW FUNCTIONS IN THE MOSQUITO CULEX PIPIENS. *Evolution; International*
759 *Journal of Organic Evolution* **52**, 1705–1712. doi: 10.1111/j.1558-5646.1998.tb02250.x.

760 **Lenth, R. V., Bolker, B., Buerkner, P., Giné-Vázquez, I., Herve, M., Jung, M., Love, J.,**
761 **Miguez, F., Riebl, H. and Singmann, H.** (2023). emmeans: Estimated Marginal Means, aka
762 Least-Squares Means.

763 **Liu, K., Dong, Y., Huang, Y., Rasgon, J. L. and Agre, P.** (2013). Impact of trehalose
764 transporter knockdown on Anopheles gambiae stress adaptation and susceptibility to
765 Plasmodium falciparum infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**,
766 17504–17509. doi: 10.1073/pnas.1316709110.

767 **Martin, M.** (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing
768 reads. *EMBnet.journal* **17**, 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200.

769 **Martinet, J.-P., Bohers, C., Vazeille, M., Ferté, H., Mousson, L., Mathieu, B., Depaquit,**
770 **J. and Failloux, A.-B.** (2023). Assessing vector competence of mosquitoes from northeastern
771 France to West Nile virus and Usutu virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **17**, e0011144.
772 doi: 10.1371/journal.pntd.0011144.

773 **Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Bergé, J. B.,**
774 **Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N. and Pauron, D.** (1998). Molecular
775 characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector
776 Anopheles gambiae s.s. *Insect Molecular Biology* **7**, 179–184. doi: 10.1046/j.1365-
777 2583.1998.72062.x.

778 **McCarroll, L. and Hemingway, J.** (2002). Can insecticide resistance status affect parasite
779 transmission in mosquitoes? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1345–1351. doi:
780 10.1016/S0965-1748(02)00097-8.

Milesi, P., Lenormand, T., Lagneau, C., Weill, M. and Labbé, P. (2016). Relating fitness to long-term environmental variations in natura. *Molecular Ecology* **25**, 5483–5499. doi: 10.1111/mec.13855.

Milesi, P., Assogba, B. S., Atyame, C. M., Pocquet, N., Berthomieu, A., Unal, S., Makoundou, P., Weill, M. and Labbé, P. (2018). The evolutionary fate of heterogeneous gene duplications: A precarious overdominant equilibrium between environment, sublethality and complementation. *Molecular Ecology* **27**, 493–507. doi: 10.1111/mec.14463.

Milesi, P., Claret, J.-L., Unal, S., Weill, M. and Labbé, P. (2022). Evolutionary trade-offs associated with copy number variations in resistance alleles in Culex pipiens mosquitoes. *Parasites & Vectors* **15**, 484. doi: 10.1186/s13071-022-05599-8.

Nauen, R. (2007). Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science* **63**, 628–633. doi: 10.1002/ps.1406.

Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S. B. and Sall, A. A. (2011). Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**, 1417–1423. doi: 10.1089/vbz.2011.0631.

Nikolay, B., Weidmann, M., Dupressoir, A., Faye, O., Boye, C. S., Diallo, M. and Sall, A. A. (2014). Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *Journal of Virological Methods* **197**, 51–54. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.08.039.

Ramirez, J. L., Short, S. M., Bahia, A. C., Saraiva, R. G., Dong, Y., Kang, S., Tripathi, A., Mlambo, G. and Dimopoulos, G. (2014). Chromobacterium Csp_P Reduces Malaria and Dengue Infection in Vector Mosquitoes and Has Entomopathogenic and In Vitro Anti-pathogen Activities. *PLOS Pathogens* **10**, e1004398. doi: 10.1371/journal.ppat.1004398.

Saraiva, R. G., Fang, J., Kang, S., Angleró-Rodríguez, Y. I., Dong, Y. and Dimopoulos, G. (2018). Aminopeptidase secreted by Chromobacterium sp. Panama inhibits dengue virus infection by degrading the E protein. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **12**, e0006443. doi: 10.1371/journal.pntd.0006443.

Tellis, M. B., Chaudhari, B. Y., Deshpande, S. V., Nikam, S. V., Barvkar, V. T., Kotkar, H. M. and Joshi, R. S. (2023). Trehalose transporter-like gene diversity and dynamics enhances stress response and recovery in *Helicoverpa armigera*. *Gene* **862**, 147259. doi: 10.1016/j.gene.2023.147259.

Wehner, K. A., Gallagher, J. E. G. and Baserga, S. J. (2002). Components of an Interdependent Unit within the SSU Processome Regulate and Mediate Its Activity. *Molecular and Cellular Biology* **22**, 7258–7267. doi: 10.1128/MCB.22.20.7258-7267.2002.

Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M. and Raymond, M. (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* **13**, 1–7. doi: 10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x.

Williams, M. C., Simpson, D. I. H., Haddow, A. J. and Knight, E. M. (1964). The Isolation of West Nile Virus from Man and of Usutu Virus from the Bird-Biting Mosquito Mansonia Aurites (Theobald) in the Entebbe Area of Uganda. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **58**, 367–374. doi: 10.1080/00034983.1964.11686258.

822 **Yunshun Chen, A. L.** (2017). edgeR. doi: 10.18129/B9.BIOC.EDGER.

Article 4 : Investigating the interplay between insecticide resistance and *Culex quinquefasciatus* life history traits under USUV expositions (in prep).

Investigating the interplay between insecticide resistance and *Culex quinquefasciatus* life history traits under USUV expositions

Maxime Prat [1,2], Mélanie Jeanneau [2,3], David Bru [2], Théo Durand [2], Patrick Makoundou [1], Sandra Unal [1], Yannick Simonin [3], Pierrick Labbé [1] and Haoues Alout [2*]

[1]: Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, Univ Montpellier, Montpellier, France.

[2]: UMR ASTRE, F-34398, Univ Montpellier, CIRAD / INRAE, Montpellier, France.

[3]: CIRAD, UMR ASTRE, F-34398 Montpellier, France

[4]: Pathogenesis and Control of Chronic Infections, Université de Montpellier, INSERM, EFS, Montpellier, France.

*: corresponding author:

Abstract:

The selection of insecticide resistance represents a significant challenge for vector control programmes. Notwithstanding the numerous constraints associated with the use of chemical insecticides, the genetic determinant of resistance persists within natural populations. The *ace-1* G119S mutation confers resistance to organophosphates and several alleles with various genetic architectures containing this mutation have been selected by different treatment strategies. Depending on their architecture, these alleles may be associated with fitness costs. In this study we investigated the impact of these different alleles on the survival and fecundity of *Culex quinquefasciatus* under control conditions and after exposure to a Flavivirus, the Usutu virus. Results showed that mosquitoes with a single *ace-1*^{R} copy had a lower survival compared to those with *ace-1* amplification (*ace-1*^{D} *and ace-1*^{R3}) but a higher fecundity, revealing trade-offs between survival and fecundity associated with distinct *ace-1* allele. However, a trade-off was also observed between survival and oviposition in homozygous *ace-1*^{R} and *ace-1*^{D} individuals. To investigate the underlying biological processes, we explored the transcriptomic responses in each colony and each infection condition. The results suggested that the *ace-1*^{D} allele is associated with reduced energy metabolism and immune response compared to *ace-1*^{R} allele and to the *ace-1*^{R3} allele (triplicated of *ace-1*^{R}). This suggests that the allele containing the wild-type copy of *ace-1* (heterogeneous duplicated *ace-1*^{D}*)* promotes more efficient physiological function compared to the other alleles, potentially through reduced energy expenditure. This enhanced efficiency potentially reduces energy costs for immune responses, contributing to higher survival rates. These findings demonstrate the diverse impacts of *ace-1* resistance alleles on mosquito fitness, with implications for pathogen transmission in natural populations.

Abbreviations

CG: Control Group

CX: carbamate

DE: Differentially Expressed

dpi: days post-infection

EIP: Extrinsic incubation period

GO term: Gene Ontology term

OP: organophosphate

RNA-Seq: RNA sequencing

RT-qPCR: Reverse Transcription Quantitative PCR

RT-qPCR: Reverse Transcription Quantitative PCR

$TCID_{50}$: Tissue Culture Infectious Dose 50

USUV: Usutu virus

Introduction

Arboviruses (arthropod-borne viruses) account for a significant proportion of the world's infectious diseases with an incidence of approximately 17% (Kading *et al.*, 2020). To prevent epidemic outbreaks caused by these vector-borne pathogens, vector control remains the main method to limit their spread, especially in the absence of effective drug treatments or vaccines. Among the existing vector control methods, application of chemical insecticides has been and are still used to control mosquito populations, either for controlling the spread of epidemics or for preventing the nuisance caused by their bites. The extensive and widespread use of insecticides have led to the selection of several resistance mechanisms in mosquito populations (Labbé *et al.*, 2017). Insecticide resistance can be classified into four main mechanisms: i) Behavioural avoidance (note that no heritable mechanisms have been described to date), ii) cuticular thickening, iii) metabolic detoxification and iv) target site modification (Labbé *et al.*, 2017; ANSES 2021). Among the mechanisms that have been studied most extensively, target site resistance is due to a point mutation that induces a conformational change in the target protein that prevents of the insecticide binding and action. For example, the A302S and A302G mutations in the *rdl* gene, coding for GABA receptors, confer resistance to the organochlorine insecticides (Du *et al.*, 2005). The para gene encodes voltage-dependent sodium channels, and the L1014F and L1014S mutations confer resistance to pyrethroid insecticides, named *kdr* (Martinez-Torres *et al.*, 1998). The G119S, F290V and the F331W in the *ace-1* gene coding for the acetylcholinesterase 1 (AChE1) is responsible for resistance to organophosphate (OP) and carbamate (CX) insecticides (Weill *et al.*, 2004; Alout *et al.*, 2007). These several different alleles on the *ace-1* locus with distinct genomic architectures have been sequentially selected by OP treatments and are still present in natural populations despite the ban of OP treatments against mosquitoes in some European countries like France (Ecophyto 2008 ; Potier 2014). Several heterogenous duplications associating a susceptible and a resistant copy, named *ace-1^{Dx}* and an homogenous triplication, named *ace-1^{R3}* are found worldwide in the *Culex pipiens* complex and *Anopheles gambiae* (Milesi *et al.*, 2018, Assogba *et al.* 2016).

Insecticide resistance alleles are often associated with negative pleiotropic effects that lead to fitness disadvantage in the absence of insecticide treatment (Raymond *et al.*, 2001). Resistant mutations on the *ace-1* gene have been shown to affect several life traits of *Cx. quinquefasciatus* such as larval development (Raymond *et al.*, 2001; Bourguet *et al.*, 2004) and survival (Gazave

et al., 2001; Berticat *et al.*, 2002a), mating behaviour (Berticat *et al.*, 2002a) and microbiotic interactions (Duron *et al.* 2006). In addition, the *ace-1* mutation has been reported to impact pathogen transmission: the vector competence of *Anopheles gambiae* for *Plasmodium falciparum* (Alout *et al.* 2013) and of *Cx. quinquefasciatus* for West Nile virus but not for Rift valley fever virus (Atyame *et al.*, 2019). However, the various gene amplifications may be associated with a reduction of the fitness cost depending on their genomic architecture. Heterogeneous duplicated alleles, combining an *ace-1*^{R} copy and *ace-1*^{S} in tandem. These heterogeneous duplications make it possible to limit the associated costs in terms of selective value (Labbé *et al.*, 2014). Finally, there are homogeneous duplications were initially described in *An. gambiae s.l.* (Weetman *et al.*, 2015; Assogba *et al.*, 2016). There is a quantitative relationship between the number of R copies and resistance capacity, the cumulative effect of R copy restores the global enzyme's activity to higher levels by addition of mutated allele, individually less efficient (Bourguet *et al.*, 1996; Alout *et al.*, 2008), but also the intensity of the associated deleterious costs on selective value (Milesi *et al.*, 2022).

For this study we chose to focus on Usutu virus (USUV), a mosquito-borne flavivirus (family; *Flaviviridae,* genus: *flavivirus*) part of the Japanese encephalitis serocomplex with other phylogenetically related virus like Yellow Fever virus (YFV), Japanese encephalitis virus (JEV) and West Nile virus (WNV) (Williams *et al.*, 1964). Like WNV, USUV is maintained in a transmission cycle involving wild birds and ornithophilic mosquitoes of the genus *Culex* (Nikolay *et al.*, 2011) with a few instances of spill over into humans and other mammals (Clé *et al.*, 2019; Cadar and Simonin, 2022).

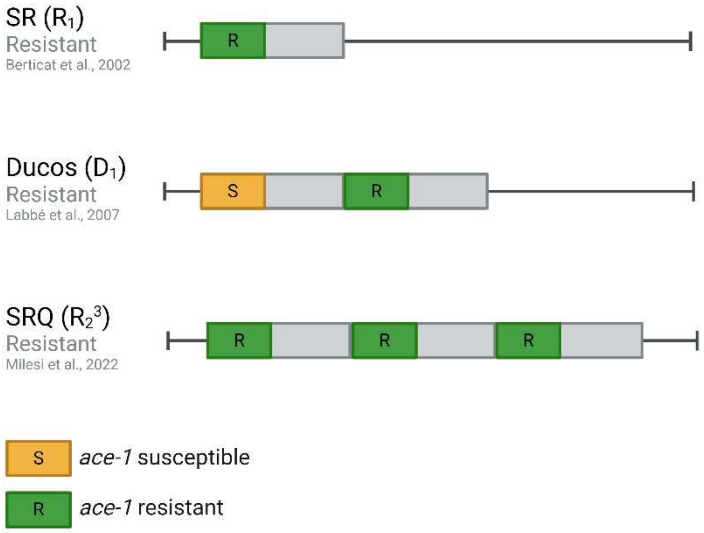
These resistant alleles persist in natural populations despite the ban of OP treatment against mosquito. Thus, it is important to study a range of life traits associated with these alleles to understand their dynamic in natural populations and infer their impact on pathogen transmission. Previously, we evaluated the influence of three distinct *ace-1* alleles on vector competence for USUV (Prat *et al.* in prep). Vector competence is the ability of an arthropod to acquire, allow the multiplication and transmit a pathogen (Reeves, 1990; Tabachnick, 1994) and is key to assess the transmission risk. To this aim, survival of infected/infectious individuals is a key element as small variations in survival will have a strong impact on the transmission (Macdonald, 1952). We also measured the impact of the resistant alleles on traits linked the fecundity: egg-laying and egg-hatching rates. The objective of this study was to investigate the interaction between several genomic architectures around the *ace-1* locus, selected by

differential insecticide selective pressure, on the survival and fecundity of *Cx. quinquefasciatus*. We also investigated these interactions in the absence or presence of infection by USUV. In addition to phenotypic analyses, we also carried out a transcriptomic analysis to explore differentially expressed genes and determine the genetic components or functional processes involved in the phenotypic observations.

Material and methods

Three *Cx. quinquefasciatus* colonies were used (**Figure 1**) : i) SR, an OP resistant colony homozygous for the single *ace-1*^{R} allele containing the G119S mutation (here R_1) (Berticat *et al.*, 2002b), ii) Ducos, an OP resistant colony homozygous for an heterogenous duplication of the *ace-1* gene associating a susceptible and a resistant copy that has been selected in Martinique in 2003 (here D_1) (Duron *et al.*, 2005) and iii) SRQ, an OP resistant colony homozygous for an homogeneous triplication with three copies of the same *ace-1*^{R} allele (here R_2^3) (Milesi *et al.*, 2022) (see **Figure 1**).

Figure 1 : Schematic representations of the different *ace-1* alleles and their genomic architecture in the 3 *Cx. quinquefasciatus* colonies (localized in chromosome 3).



Cx. quinquefasciatus colonies were maintained separately in a secured insectarium (at ISEM, Univ. Montpellier, France) at 27±1°C, 65±8% relative humidity, and a 14h light/10h dark photoperiod. After egg-hatching, approximately 500 larvae per tray were randomly dispatched

into three to five plastic trays containing 1 liter of tap water and fed with Tetramin® fish granules. At emergence, adults were fed *ad libitum* with a 5% honey solution and maintained in 30x30x30 cm cages. One day before blood feeding, mosquitoes were starved by removing the honey solution.

Viral strains

Usutu virus belonging to the EU3 lineage (AN: KX601690) was used in our experiments (Lecollinet *et al.*, 2016). Virus stock in MEM media were titrated to $10^{6.8}$ $TCID_{50}$/ml (Tissue Culture Infectious Dose 50), using the SpearmanKärber method (Kärber 1931) and stored at -80°C until experimental infections.

Infection by membrane feeding assay

Infectious blood feedings were carried out with 5- to 8-days-old females who had not previously taken a blood meal. The day before the infectious blood meal, small cages (15x15x15 cm) containing approximately 200 females were placed in climatic chambers in the BSL3 laboratory (BioSecurity Level 3) with the same constant environmental conditions as the insectarium but no access to the honey solution. On the day of infection, 2 ml of infectious blood was prepared by mixing 1.5 ml of heparinized turkey blood, 0.5 mM ATP as a phagostimulant (Galun *et al.*, 1963), and 500 µl of MEM containing virus at a final titer of 10^6 $TCID_{50}$/ml. Mosquitoes were allowed to feed on infectious blood using a Hemotek® system at 37°C for 3 hours in darkness. Control groups were treated in the same manner but fed with blood containing ATP and MEM but lacking virus. After blood feeding, 500µl of infectious blood was stored at -80°C to evaluate the real viral titer digested by mosquitoes. After blood feeding, mosquitoes were anesthetized using CO_2 to sort out the fully engorged females, thus limiting any bias due to the variation of blood ingested which could influence infection phenotypes and other life history traits such as survival and egg production. They were kept individually for 14 days in Drosophila tubes filled with 5 mL of tap water and topped with a veil and a cotton ball soaked in a 5% honey solution that was renewed every 2- days. 14 days post infection (dpi). Experimental infections were carried with the 3 colonies at the same time and repeated three times, resulting in 3 independent experimental infections.

Measure of survival and fecundity

During the 14 days of follow-up, dead mosquito females were recorded and stored at -80°C. The event of egg laying and egg hatching were monitored but the number of eggs and larvae

were not counted. Constraints linked to conducting experiments in the BSL3 laboratory led us to limit our observations to 5 time points: 5-, 7-, 9-, 12- and 14-days post infection.

Statistical analysis

We study the effects of several explanatory variables: “condition” (a categorical variable with two levels: Exposed to USUV and Control), “genotype” (categorical variable with three levels: SR, Ducos and SRQ) and the “replicate” variable (a categorical variable with three levels).

Maximal models included the variables “condition”, “replicate” and all their interactions. The “replicate” variable was used as a random variable to account for the nested data structure, i.e., the correlations between individuals from the same feeding experiment, and was either selected or removed based on the lowest AIC. Failed virus quantification in one tissue was specified as NA (Non Available) and was not included in the analysis. The significance of variables and selection of the minimal model was assessed using the ANOVA procedure within the package car (An R Companion to Applied Regression, 2023).

Kaplan Meier survival analyses were carried out and the differences between survival distributions were estimated using the asymptotic Log-Rank Test (Cox, 1972) from the “Coxme” package (Therneau, 2024).

Fecundity parameters were analyzed using ggsurplot function from the “survminer” package (Kassambara *et al.*, 2021) with transformation by “event” as argument of “survminer” package to plot positive cumulative event in time. The differences between distributions were estimated using the asymptotic Log-Rank Test (Cox, 1972) from “Coxme” package (Therneau, 2024).

RNAseq analysis

To explore the genes involved in difference between life traits of resistant mosquitoes, total RNA from individual thorax and midguts was extracted to obtain sufficient quantity for quality control. After Usutu detection by RT-qPCR in the corresponding saliva, pools of five individuals of the same colony were prepared with different exposure condition: mosquito exposed to blood meal containing USUV EU3 and control mosquito (fed on non-infectious blood). RNA-seq libraries were prepared by MGX platform (Montpellier GenomiX) using Stranded mRNA Prep Ligation from Illumina and sequenced on a Novaseq6000.

Adapter sequences were trimmed with Cutadapt (Martin, 2011), and the raw sequencing data were quality-controlled with FastQC (Andrews, S. 2010). The annotation of the *Culex*

quinquefasciatus JHB 2020 genome (GCA_015732745.1) was used for mapping RNAseq reads to the transcriptome -using STAR (Dobin *et al.*, 2013).

The total number of reads per sample varied between 19,699,626 and 30,536,374 among the 27 sequenced RNA samples. The reads were aligned to the *Culex quinquefasciatus* genome (GeneBank ID : JHB 2020 (GCA_015732745.1)). After normalization and Differential Expression (DE) analysis, the volcano plots revealed the global expressions of each gene the in contrasts tested.

Differentially Expressed Genes (DEG) analysis and gene ontology enrichment analysis were carried out using the AskoR package (Alves-Carvalho *et al.*, 2021), an automated pipeline performing a complete transcriptomic analysis with the EdgeR (Yunshun Chen, 2017), UpSetR (Gehlenborg, 2015), topGO (Adrian Alexa, 2017) and Coseq R packages (Andrea Rau, 2017). Significant changes were filtered by log2 fold changes (log2FC) +/- 1 and adjusted p-value ≤ 0.01. Identification of transcript was performed using Blast with the Uniprot database (https://gannet.fish.washington.edu/seashell/snaps/uniprot_table_r2023_01.tab). Gene ontology terms were assigned for differentially expressed genes using Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005). The topGO package was used with Fisher's exact tests and weight01 algorithms. Enrichment score was calculated as the ratio of the number of differentially expressed genes in the pathway compared to its expected number by chance. We focus our analysis on the GO term that represents an enrichment from at least 10 genes. A less stringent analysis considering two genes for each GO term is available in supplementary data.

Results:

Effect of ace-1 allele on mosquito survival

We first compared the impact of the various resistant alleles on survival after blood feeding either on USUV-infectious or control blood. Minimum model, containing only "Genotype" show and a significant influence this variable ($Chi^2 = 17.05$; p-value = 0.0002).

Pairwise comparison tests showed a significant difference between the three colonies, whatever the condition (**Figure 2**). The Ducos colony showed the lowest hazard ratio (HR=0.572) indicating a **42.8% increase** in survival probability compared to the SR colony. Similarly, SRQ exhibited an increased survival probability compared to SR, with an HR of 0.774 corresponding to a **22.6% higher** survival. Additionally, Ducos had a significantly higher

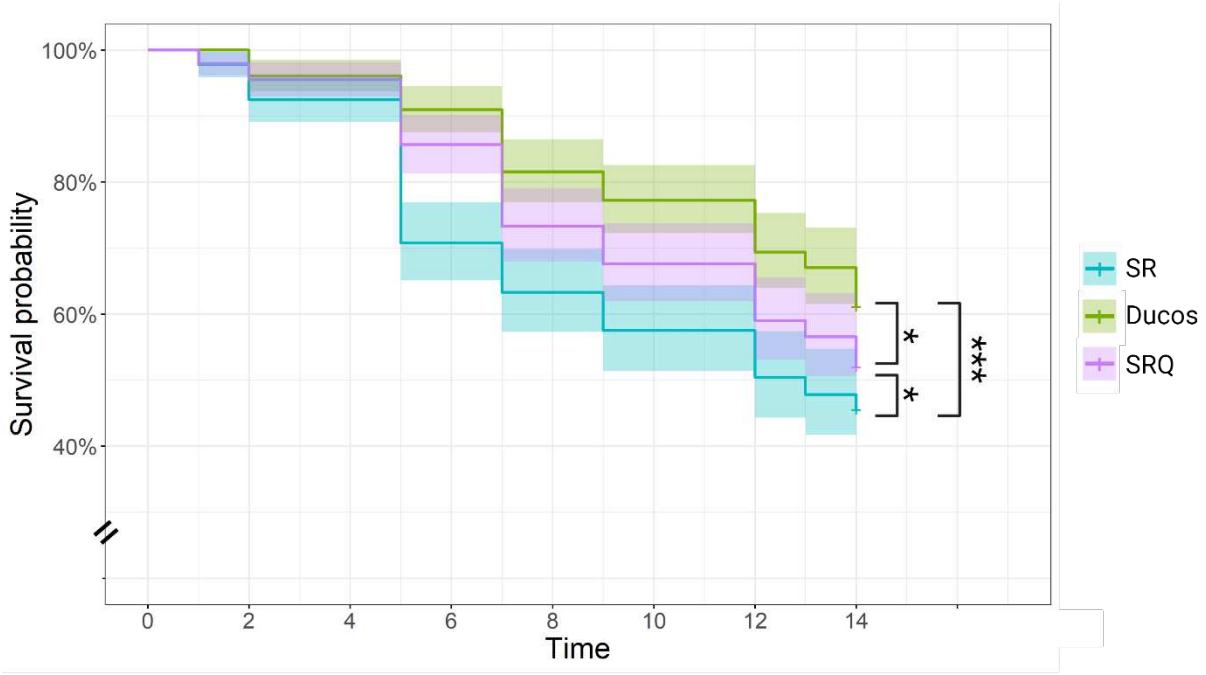
survival probability compared to SRQ, with an HR of 0.739, reflecting a **26.1% greater** probability of survival.

Table 1 : Results of the mixed-effect Cox model tests (*coxme* package in R) for survival studies :

	coef	*exp(coef) : HR*
Ducos vs SR	**-0.5579**	**0.5724**
SRQ vs SR	**-0.2562**	**0.7740**
Ducos vs SRQ	**-0.3018**	**0.7395**

Results of reduced Cox mixed effects model were reported for each comparison with exp(coef) corresponding to the Hazard ratio (HR), z the Wald statistic value and the p-value. Significant comparisons were in bold.

Figure 2 : Kaplan Meier survival curves (all conditions included) .



Survival curves between colonies : SR blue line, Ducos green line and SRQ purple line, with areas representing the IC95, Significance were tested with log likelihood test. (: p-value < 0.05 ; ** : p-value < 0.01). Survival assay were performed in triplicate for each condition and each colony. Y axis was truncated (//) to improve visibility between curves.*

Effect of ace-1 resistance alleles on fecundity

Egg-laying rate

Analysis of egg-laying rate showed significant differences between genotypes (**Figure 3A, Table 2**). Minimum model, containing only "Genotype" show and a significant influence this variable ($Chi^2 = 10.087$; p-value = 0.006). This shows that feeding on blood containing USUV EU3 have only a limited impact on the cumulative egg-laying rate, but "Genotype" has a significant impact, mean that in our condition resistance architecture show significant impact on oviposition.

The log likelihood test between SR and SRQ with the smallest difference in coefficient (**Table 2**) was not significant ($Chi^2 = 0.28$ d.f =1 p-value = 0.59), so we know that "Genotype" have a significant impact on egg laying which means that difference between Ducos and the two other colonies is significant.

Ducos had a lower probability of laying eggs compared to SR (**Figure 3A**, HR = 0.72). When comparing to SRQ, Ducos exhibited a significantly lower probability of laying eggs (HR = 0.76) corresponding to a **24% reduction** compared to SRQ.

Table 2 : Results of the mixed-effect Cox model tests (*coxme* package in R) for cumulative egg laying studies :

	coef	*exp(coef) : HR*
Ducos vs SR	**-0.33**	**0.72**
SRQ vs SR	-0.06	0.94
Ducos vs SRQ	**-0.27**	**0.76**

Results of reduced Cox mixed effects model were reported for each comparison with exp(coef) corresponding to the Hazard ratio (HR), z the Wald statistic value and the p-value. Significant comparisons were in bold.

Egg-hatching rate

In the reduced model "Genotype" is significant ($Chi^2 = 17.83$; p-value = 0.00013).

The log likelihood test between SR and SRQ with the smallest difference in coefficient (**Table 3)** was not significant ($Chi^2 = 3.21$ d.f =1 p-value = 0.07), so we know that "Genotype" have a significant impact on egg hatching which means that difference between Ducos and the two other colonies is significant.

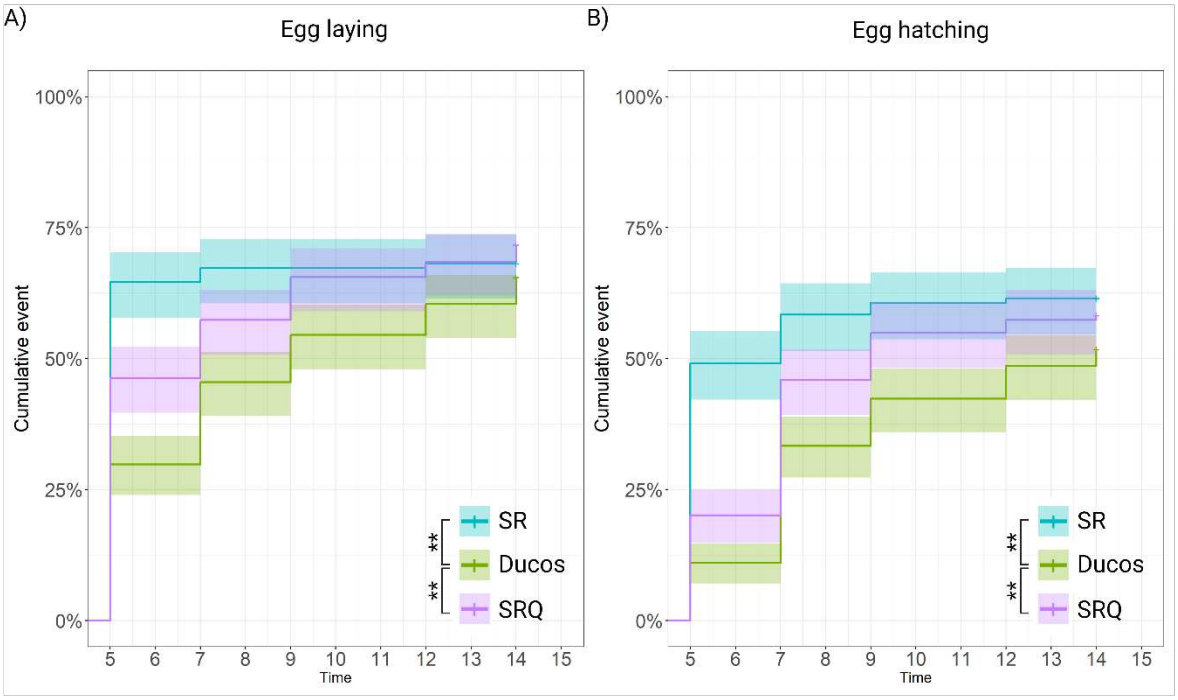
Ducos colony showed a **35% higher** egg-hatching rate compared to the SR colony (**Figure 3B,** HR=0.65), the same trend was observed compared to the SRQ colony where the Ducos colony showed a **20% reduction** in egg-hatching rate (HR = 0.8).

Table 3: Results of the mixed-effect Cox model tests (*coxme* package in R) for cumulative egg hatching studies:

	coef	*exp(coef) : HR*
Ducos vs SR	**-0.43**	**0.65**
SRQ vs SR	-0.21	0.81
Ducos vs SRQ	**-0.22**	**0.80**

Results of reduced Cox mixed effects model were reported for each comparison with exp(coef) corresponding to the Hazard ratio (HR). Significant comparisons were in bold.

277 **Figure 3 : Comparisons of the cumulative percentage of A) eggs laying and B) egg**
278 **hatching between the 3 *Cx. quinquefasciatus* colonies.**



279

280 *Oviposition dynamics curves between colonies : SR blue line, Ducos green line and SRQ purple line, with areas representing*
281 *the IC95. Panel A) represent the egg laying rate in time and B) panel the egg hatching rate intime post blood feeding.*
282 *Significance was tested with log likelihood test. (* : p-value < 0.05 ; ** : p-value < 0.01). Survival assay were performed in*
283 *triplicate for each condition and each colony. Y axis was truncated (//) to improve visibility between curves.*

284

RNA-Seq analysis of *Cx. quinquefasciatus* resistant colonies

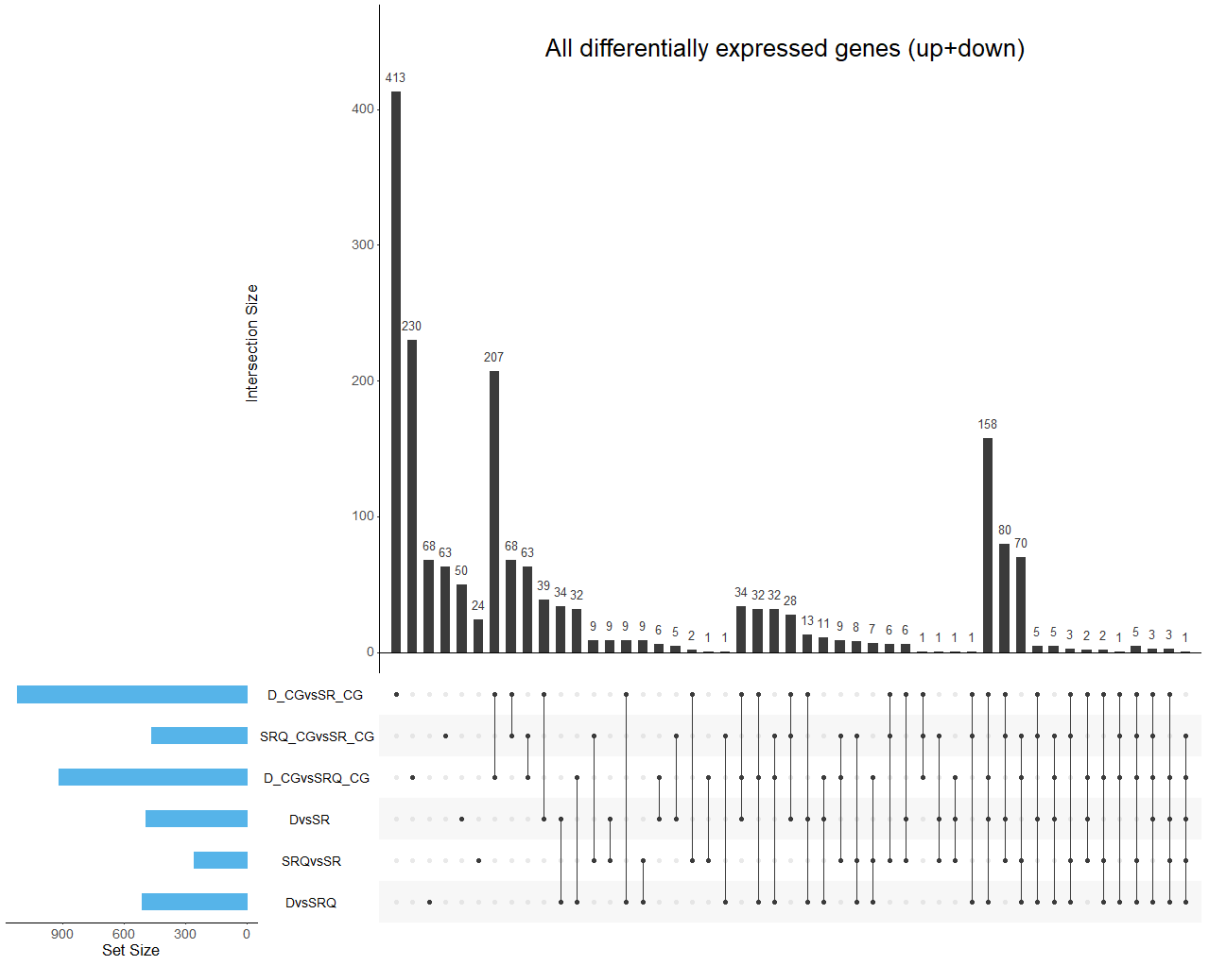
We identified 258 to 1121 differentially expressed genes (DEGs) from each contrast tested (**Table 5**) illustrating the large differences in numbers of DEGs following exposure to an infected blood meal. The Upset plot (**Figure 4**) allowed to compare the DEGs unique or shared between contrasts and revealed a higher number of unique than shared DEG, especially in control condition. In the control condition, 413 DEGs were unique in the Ducos vs SR contrast, 63 DEGs in SRQ vs SR and 230 DEGs in Ducos vs SRQ; while in the USUV exposed condition, 50 DEGs were unique in the Ducos vs SR contrast, 24 DEGs in SRQ vs SR and 68 DEGs in Ducos vs SRQ. In control condition, one DEG is shared by all "control" contrasts, and in exposed conditions, no DEG were shared by all "exposed to USUV" contrasts.

Table 5 : Distributions of numbers of differentially expressed genes for each contrasts tested

	down-regulated	*up-regulated*	*total DEG*
"Control" conditions			
D_CG vs SR_CG	925	196	1121
SRQ_CG vs SR_CG	218	250	468
D_CG vs SRQ_CG	746	170	916
"Exposed to USUV" conditions			
D vs SR	372	122	494
SRQ vs SR	136	122	258
D vs SRQ	381	132	513

Counts of differentially expressed genes (DEG) who were selected by filtering with p-adj=0.01 and log2FC +/- 1 among contrasts tested.

Figure 4 : UpSetplot showing overlap size of sets of differentially expressed genes for each contrasts tested.

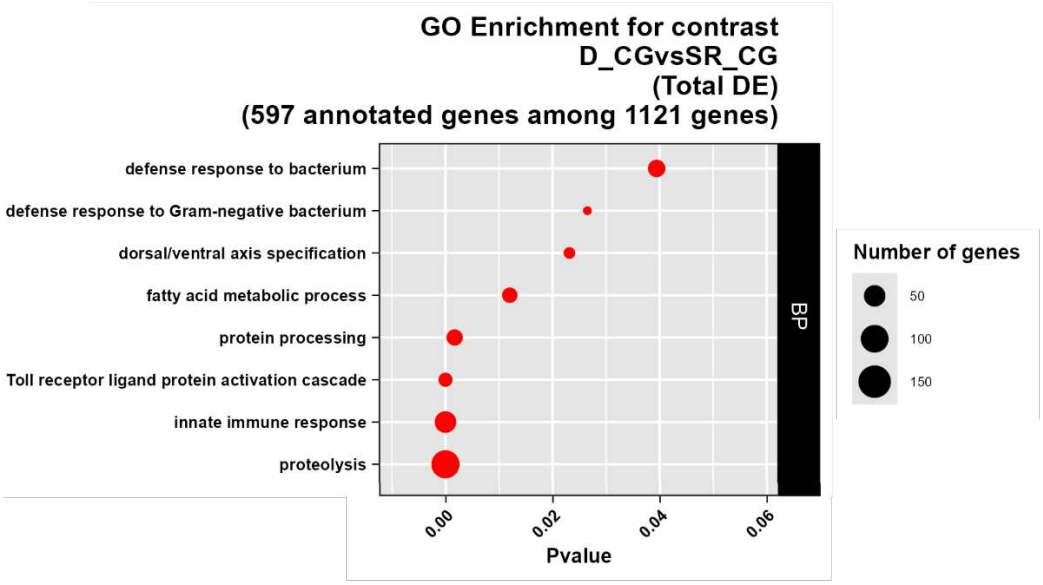


The top vertical black bar plot shows the number of genes (y-axis) contained in each intersection (x-axis). The horizontal blue bar plot at the bottom shows the number of differentially expressed genes for each comparison.

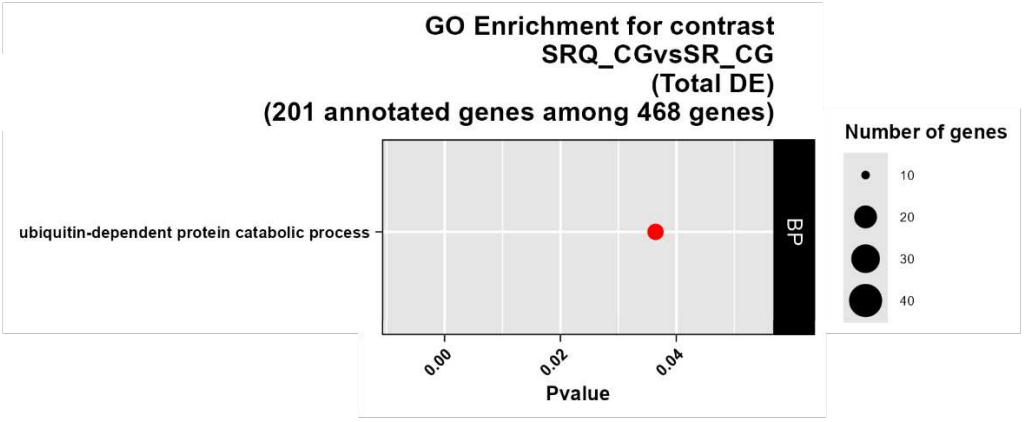
Detailed of the 3 most up- and down-regulated genes were available in supplementary data (**Table S3 and S4**). The number of DEGs in most contrasts allowed to perform a GO enrichment analysis to determine the biological processes significantly affected by the *ace-1* resistant alleles (**Figures 5 and Figure 6**).

Figure 5 : Dotplot of Biological process GO term in control conditions :

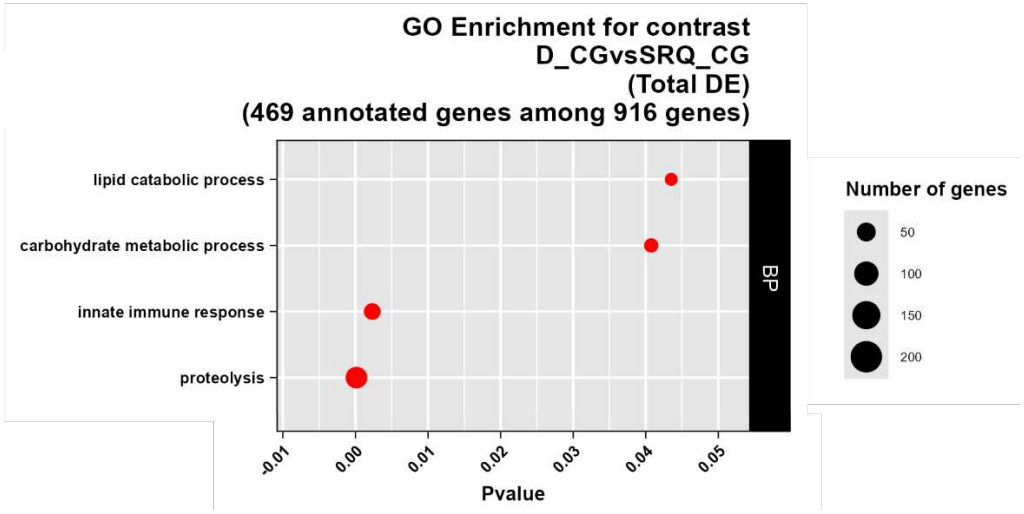
A)



B)

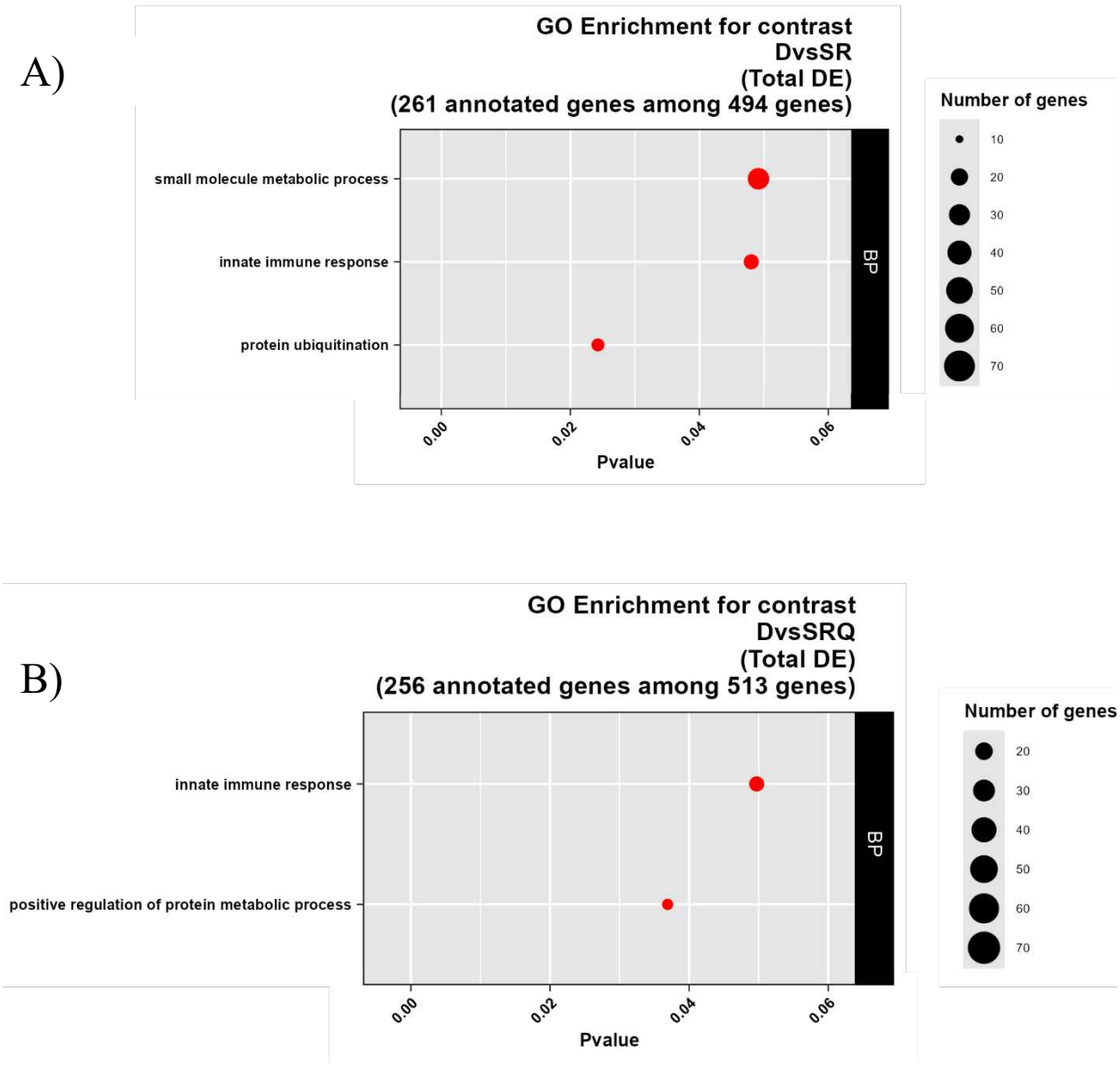


C)



Dotplot of significantly (adjusted p-value<0.05) enriched GO biological process for differentially expressed genes (up and down-regulated) at 14 dpi. We did not find enriched GO terms for down-regulated genes for SRQ non competent vs. controls.

Figure 6 : Dotplot of Biological process GO term in exposed to USUV condition :



Dotplot of significantly (adjusted p-value<0.05) enriched GO biological process for differentially expressed genes (up and down-regulated) at 14 dpi. We did not find enriched GO terms for down-regulated genes for SRQ non competent vs. controls.

GO term analysis in the control conditions

Ducos CG vs SR CG:

In the control Ducos vs SR contrast (**Figure 5A**), the most enriched GO term is "proteolysis" (GO:0006508) with n = 104 DEG, mostly down-regulated (86/104). The second most enriched GO term is "innate immune response" (GO: 0045087) with n= 51 DEG) mostly down-regulated (45/51). Then, 3 GO terms associated with the "immune response" biological process were significantly enrich as well: "defense response to bacterium" (GO: 0042742, n=29 DEG); "Toll receptor ligand protein activation cascade" (GO: 0160032, n=17 DEG) and "defense response to Gram negative bacterium" (GO: 0050829, n=10 DEG). Three other Biological processes, involved in metabolism were significantly enriched: "fatty acid metabolic process" (GO:0006631, n= 21 DEG all down-regulated), "protein processing" (GO:0016485, n= 24 DEG) mostly down-regulated and "dorsal/ventral axis specification" (GO:0009950, n= 12 DEG all down-regulated). Under USUV exposed conditions, the innate immune response *was also enriched and* down-regulated *and* two other biological processes were significantly enriched. The first is *the* "small molecule metabolic process" (GO:0044281*,* n=31 DEG*)* mostly down-regulated (21/31) and the second *is the* "protein ubiquitination" (GO:0016567*,* n = 13 DEG*)* mostly down-regulated (8/13).

SRQ CG vs SR CG:

In this contrast, the only GO term significantly enriched is "ubiquitin-dependant protein catabolic process" (GO: 0006511) with 13 genes (**Figure 5B**), both up- and down-regulated.

Ducos CG vs SRQ CG:

In this contrast (**Figure 5C**), four GO terms were significantly enriched: the "proteolysis" (GO:0006508 n= 73 DEG) mostly down-regulated ((58/73); the "innate immune response" (GO: 0045087, n= 36 DEG all down-regulated); the "carbohydrate metabolic process" (GO: 0005975, n = 24 DEG all down-regulated); and the "lipid catabolic process" (GO: 0016042, n = 19) genes mostly down-regulated (17/19).

Go term analysis of female exposed to USUV

Ducos vs SR:

In this contrast (**Figure 6A**), only three GO terms were significantly enriched: the « small molecule metabolic process » (GO: 0044281, n=31 DEGs) mostly down-regulated (24/31) ; the

354 "innate immune response" (GO: 0045087, n=16 DEG), mostly down-regulated (12/16); and the
355 "protein ubiquitination" (GO: 0016567, n=13 DEG), mostly down-regulated (9/13).

356 SRQ vs SR:

357 No GO term had passed our analysis filter in this contrast due to the lower number of DEG.

358 Ducos vs SRQ:

359 In this contrast, only two GO terms were significantly enriched: the "innate immune response
360 (GO: 0045087, n=16 DEG) mostly down-regulated (14/16) ; the "positive regulation of protein
361 metabolic process" (GO: 0051247, n=12 DEG) mostly down-regulated (8/12) (**Figure 6B**).

362 Details of each gene per GO term from this transcriptomic analysis are in **Supplementary data.**

363 Discussion:

364 Multiple life history traits might be modulated by mosquito-arbovirus interactions, which may
365 impact on individual fitness and ultimately impact the transmission of arboviruses. Our main
366 objective was to study the impact of the various insecticide resistant allele on mosquito life
367 traits, directly or in interaction with USUV infection and the associated transcriptomic changes.
368 To this aim, we used three colonies of *Culex quinquefasciatus* mosquitoes sharing a common
369 genetic background and presenting three distinct architectures around the *ace-1* locus that were
370 sequentially selected by OP treatments over several decades. Our analyses did not show a
371 significant impact of exposition to USUV EU3 on survival and on the fecundity traits tested,
372 therefore we analysed the overall impact of genotypes whatever the infection condition.

373 The results presented in this study demonstrated significant differences in survival between
374 *Culex quinquefasciatus* colonies differing by their *ace-1* resistant allele. Indeed, Ducos colony
375 showed a pronounced survival advantage over the SR and SRQ colonies revealing that the *ace-*
376 *1* allele D_1 confers an advantage over the R_1 and R_2[3] alleles. This suggests that *ace-1* alleles
377 with a susceptible copy may provide a fitness advantage compared to alleles with only mutated
378 copies, consistent with the literature describing the advantages of heterogeneous duplication
379 compared to homozygous single-copy G119S mutated *ace-1* (Labbé *et al.,* 2014). The SRQ
380 colony also showed a higher survival than the SR colony suggesting that multiple copies of the
381 mutated *ace-1* allele would reduce the fitness cost of the G119S mutated *ace-1*, in contrast to
382 what was reported (Milesi *et al.,* 2022). These results could be of i) mechanistic origin, with the
383 overproduction of mutated enzyme, restoring an enzymatic activity close to the sensitive allele

(Labbé *et al.*, 2014) or ii) structural origin, where the duplicated zone in the R_2^3 allele and the multiple genes embedded in the duplication would have some pleiotropic effects leading to a higher survival.

The Ducos colony showed significantly delayed egg-laying compared to the SR and SRQ colonies, by respectively **28**% and **24**% suggesting that the heterogenous duplication allele D_1 may impose a reproductive cost through a longer time to mature and lay their eggs. Although the SRQ colony showed a tendency to delay oviposition compared to SR, this result was not significant and needs to be repeated. This suggests that the different *ace-1* duplications are associated with lower fecundity compared to the single copy allele. The analysis of egg-hatching reveals additional insights into the reproductive dynamics of the colonies. As seen for egg-laying, Ducos colony showed a lower egg-hatching rate compared to SR and SRQ colonies, highlighting again the benefit of single-copy allele compared the duplicated ones. Results of ovipositions detailed by condition were presented in supplementary data (**Figure S3 and S4**) showing the low impact of exposure to USUV on ovipositions, mostly drive by *ace-1* alleles.

Overall, these results highlight the impact of resistant *ace-1* alleles with different genomic architecture on some reproductive traits such as egg laying and hatching, however it is not possible distinguish the effect of the number and nature of the *ace-1* copies and the effect of the varying genomic architecture. Indeed, as mentioned previously, the duplicated zones carry several other genes (Claret *et al.* unp. data) which could be at the origin of the pleiotropic effects observed on survival and fecundity. The complex interplay between the evolution of insecticide resistance, reproductive timing, and egg viability underscores the need for further research into the evolutionary and ecological implications of resistance alleles in vector populations.

Interestingly, the Ducos colony showed a higher survival than the other colonies, but weaker fecundity. While the SR colony laid their eggs earlier (but not more) than the other colonies and its survival is lower than the others, consistent with a trade-off between these two traits according to the life history traits theory. The main hypothesis is that the energy allocated to survival is no longer available for egg production and laying. Therefore, Ducos may allocate more energy resources to survival at the expense of fecundity, and SR the opposite. The D_1 allele may lower the deleterious effects of the resistant copy due to the presence of a susceptible copy as described in (Labbé *et al.*, 2014), but at the expense of the dynamics of oviposition and hatching over time. Similar trade-off have been explored in *An. gambiae* (DAO *et al.*, 2010; Vézilier *et al.*, 2015).

In an epidemic context, OP insecticide resistance had only a limited impact on the life history traits of individuals after being exposed to infectious blood or not control. Nevertheless, these trade-offs may have significant effects on the vectorial capacity of these genotypes in a context of viral circulation because their survival can be modulated.

Exploring the genetics factors associated to phenotypes

We then assessed the gene expression patterns that could explain the phenotypic differences observed on life history traits. In the Ducos vs SR contrast (**Figure 6A**), the enriched biological process are mostly associated with down-regulated genes involved suggesting that these biological processes are less expressed in females with an heterogenous duplication (D_1 allele) than females with a single mutated copy (R_1 allele) of *ace-1*. Among these DEG, Serine proteases play a role in numerous physiological processes such as digestion (Dana *et al.*, 2005), haemolymph coagulation, antimicrobial peptide synthesis (Hoffmann *et al.*, 1999; Levashina *et al.*, 1999) and the activation of immune pathways in response to pathogen detection (Gorman and Paskewitz, 2001). Under control conditions, females of the Ducos colony may have a lower energy and immune related metabolism (i.e. down-regulated genes) than the SR colony. When exposed to USUV (**Figure 7A**), the analysis showed enrichment of "innate immune response" and "protein ubiquitination" related genes in Ducos compared to SR. Ubiquitin has been described in numerous arthropod vectors ranging from mosquitoes to ticks (Severo *et al.*, 2013; Choy *et al.*, 2013). Ubiquitin has a wide range of functions, from metabolic regulation and DNA repair to immunity (Collins and Brown, 2010). These results further reinforce the fact that the Ducos colony had a lower energy and immune related metabolism than SR, even after exposition to USUV EU3.

In the SRQ vs SR contrast (**Figure 6A**), genes involved in the "ubiquitin-dependent protein catabolic process" are significantly enriched and are involved in the metabolic pathways of protein production. In our results, most of the genes codes for the E3 ubiquitin-protein ligase (supplementary data).

In the Ducos vs SRQ contrast, the control condition (**Figure 6C**) indicated two biological processes enriched linked to energy, namely the "lipid catabolic process" and the "carbohydrate metabolic process". The genes contained in these GO terms are predominantly down-regulated, indicating that the energy metabolism of Ducos females is lower compared to SRQ females. The next two significantly enriched GO terms concern proteolysis and innate immunity processes. Most of the genes related to proteolysis and innate immunity include genes encoding

serine-endopeptidases, including serine proteases, clip-domain serine proteases as well as trypsins and chymotrypsins. These genes are involved in various biological processes including immune defenses (Verma, 2018). In the USUV exposed condition (**Figure 7B**), the innate immune response was also found to be significantly enriched, showing probably its initial high-level expression in both conditions (exposed and control) for SRQ. The "positive regulation of protein metabolic process" was also enriched and comprises genes of various types involved in protein metabolic pathways. Overall, the Ducos colony, homozygous for D_1, showed significant down-regulation of metabolic and immune processes compared to SR and SRQ, and a survival advantage under both control and USUV-exposed conditions. This suggests that Ducos genetic architecture and/or *ace-1* allele promote more efficient physiological function compared to SR, potentially through reduced energy expenditure on immune and metabolic processes, which in turn enhances its overall survival. SRQ, despite its triplicated *ace-1*^{R} copy, showed higher metabolic and immune activity which does not translate into a survival benefit. These findings highlight how different resistance mechanisms at the *ace-1* locus can shape distinct survival strategies in mosquitoes, with Ducos demonstrating the most robust survival phenotype.

Conclusions and perspectives

In conclusion, the study enabled us to characterize the effect of *ace-1* resistant alleles differing in their genetic architecture on the life history traits of *Culex quinquefasciatus* under two immune conditions. In the control and virus-exposed conditions, the effects of the different architectures at the *ace-1* locus had different effects on the traits measured. In particular, we found a trade-off between survival and fecundity between the two colonies SR (homozygous single copy) and Ducos (heterogeneous *ace-1* duplication). The SRQ colony with a triplicated mutated *ace-1* copy showed life history traits with intermediate values for survival and fecundity compared to SR and Ducos. These results contrast with those previously described by where SRQ was associated with deleterious effects on fitness compared with SR and Ducos. These observations require further investigations, particularly at the level of the genes involved within the duplicated zone, which could explain this median restoration of survival and fecundity, without energetic trade-off. Our results highlighted the effects of resistance alleles on these measured life history traits, but which did not differ between control and USUV-exposed conditions. We highlighted the fact that these genetic architectures at the *ace-1* locus are not neutral, and may affect individual fitness. In the future, repeating this type of experiments on individuals from natural populations would enable us to estimate the vectorial risks associated with these resistant individuals on a larger scale.

References :

Adrian Alexa, J. R. (2017). topGO. doi: 10.18129/B9.BIOC.TOPGO.

Alout, H., Berthomieu, A., Hadjivassilis, A. and Weill, M. (2007). A new amino-acid substitution in acetylcholinesterase 1 confers insecticide resistance to Culex pipiens mosquitoes from Cyprus. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**, 41–47. doi: 10.1016/j.ibmb.2006.10.001.

Alout, H., Djogbénou, L., Berticat, C., Chandre, F. and Weill, M. (2008). Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetycholinesterase 1 biochemical properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **150**, 271–277. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.03.008.

Alout, H., Ndam, N. T., Sandeu, M. M., Djégbe, I., Chandre, F., Dabiré, R. K., Djogbénou, L. S., Corbel, V. and Cohuet, A. (2013). Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of Anopheles gambiae s.s. for Plasmodium falciparum Field Isolates. *PLoS ONE* **8**, e63849. doi: 10.1371/journal.pone.0063849.

Alout, H., Dabiré, R. K., Djogbénou, L. S., Abate, L., Corbel, V., Chandre, F. and Cohuet, A. (2016). Interactive cost of Plasmodium infection and insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae. *Scientific Reports* **6**, 29755. doi: 10.1038/srep29755.

Alves-Carvalho, S., Gazengel, K., Bretaudeau, A., Robin, S., Daval, S. and Legeai, F. (2021). AskoR, A R Package for Easy RNASeq Data Analysis. In *Proceedings of The 1st International Electronic Conference on Entomology*, p. 10646. MDPI, Sciforum.net doi: 10.3390/IECE-10646.

An R Companion to Applied Regression (2023). *SAGE Publications Inc*.

Andrea Rau, C. M.-R. (2017). coseq. doi: 10.18129/B9.BIOC.COSEQ.

Assogba, B. S., Milesi, P., Djogbénou, L. S., Berthomieu, A., Makoundou, P., Baba-Moussa, L. S., Fiston-Lavier, A.-S., Belkhir, K., Labbé, P. and Weill, M. (2016). The ace-1 Locus Is Amplified in All Resistant Anopheles gambiae Mosquitoes: Fitness Consequences of Homogeneous and Heterogeneous Duplications. *PLOS Biology* **14**, e2000618. doi: 10.1371/journal.pbio.2000618.

Atyame, C. M., Alout, H., Mousson, L., Vazeille, M., Diallo, M., Weill, M. and Failloux, A.-B. (2019). Insecticide resistance genes affect Culex quinquefasciatus vector competence for West Nile virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**, 20182273. doi: 10.1098/rspb.2018.2273.

Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M. and Chevillon, C. (2002a). Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in Culex pipiens mosquitoes. *Genetics Research* **79**, 41–47. doi: 10.1017/S001667230100547X.

Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M. and Chevillon, C. (2002b). Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in *Culex pipiens* mosquitoes. *Genetical Research* **79**, 41–47. doi: 10.1017/S001667230100547X.

519 **Bourguet, D., Raymond, M., Bisset, J., Pasteur, N. and Arpagaus, M.** (1996). Duplication
520 of the Ace.1 locus in Culex pipiens mosquitoes from the Caribbean. *Biochemical Genetics* **34**,
521 351–362. doi: 10.1007/BF00554410.

522 **Bourguet, D., Guillemaud, T., Chevillon, C. and Raymond, M.** (2004). FITNESS COSTS
523 OF INSECTICIDE RESISTANCE IN NATURAL BREEDING SITES OF THE MOSQUITO
524 CULEX PIPIENS. *Evolution* **58**, 128–135. doi: 10.1111/j.0014-3820.2004.tb01579.x.

525 **Cadar, D. and Simonin, Y.** (2022). Human Usutu Virus Infections in Europe: A New Risk on
526 Horizon? *Viruses* **15**, 77. doi: 10.3390/v15010077.

527 **Choy, A., Severo, M. S., Sun, R., Girke, T., Gillespie, J. J. and Pedra, J. H. F.** (2013).
528 Decoding the Ubiquitin-Mediated Pathway of Arthropod Disease Vectors. *PLOS ONE* **8**,
529 e78077. doi: 10.1371/journal.pone.0078077.

530 **Clé, M., Beck, C., Salinas, S., Lecollinet, S., Gutierrez, S., Van de Perre, P., Baldet, T.,**
531 **Foulongne, V. and Simonin, Y.** (2019). Usutu virus: A new threat? *Epidemiology and*
532 *Infection* **147**, e232. doi: 10.1017/S0950268819001213.

533 **Collins, C. A. and Brown, E. J.** (2010). Cytosol as battleground: ubiquitin as a weapon for
534 both host and pathogen. *Trends in Cell Biology* **20**, 205–213. doi: 10.1016/j.tcb.2010.01.002.

535 **Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M.** (2005).
536 Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics
537 research. *Bioinformatics* **21**, 3674–3676. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610.

538 **Cox, D. R.** (1972). Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society:*
539 *Series B (Methodological)* **34**, 187–202. doi: 10.1111/j.2517-6161.1972.tb00899.x.

540 **Dana, A. N., Hong, Y. S., Kern, M. K., Hillenmeyer, M. E., Harker, B. W., Lobo, N. F.,**
541 **Hogan, J. R., Romans, P. and Collins, F. H.** (2005). Gene expression patterns associated with
542 blood-feeding in the malaria mosquito Anopheles gambiae. *BMC genomics* **6**, 5. doi:
543 10.1186/1471-2164-6-5.

544 **DAO, A., KASSOGUE, Y., ADAMOU, A., DIALLO, M., YARO, A. S., TRAORE, S. F.**
545 **and LEHMANN, T.** (2010). Reproduction-Longevity Trade-Off in Anopheles gambiae
546 (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology* **47**, 769–777.

547 **Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P.,**
548 **Chaisson, M. and Gingeras, T. R.** (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner.
549 *Bioinformatics* **29**, 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.

550 **Du, W., Awolola, T. S., Howell, P., Koekemoer, L. L., Brooke, B. D., Benedict, M. Q.,**
551 **Coetzee, M. and Zheng, L.** (2005). Independent mutations in the *Rdl* locus confer dieldrin
552 resistance to *Anopheles gambiae* and *An. arabiensis*. *Insect Molecular Biology* **14**, 179–183.
553 doi: 10.1111/j.1365-2583.2005.00544.x.

554 **Duron, O., Lagnel, J., Raymond, M., Bourtzis, K., Fort, P. and Weill, M.** (2005).
555 Transposable element polymorphism of Wolbachia in the mosquito Culex pipiens: evidence of
556 genetic diversity, superinfection and recombination. *Molecular Ecology* **14**, 1561–1573. doi:
557 10.1111/j.1365-294X.2005.02495.x.

Galun, R., Avi-Dor, Y. and Bar-Zeev, M. (1963). Feeding Response in Aedes aegypti: Stimulation by Adenosine Triphosphate. *Science* **142**, 1674–1675. doi: 10.1126/science.142.3600.1674.

Gazave, É., Chevillon, C., Lenormand, T., Marquine, M. and Raymond, M. (2001). Dissecting the cost of insecticide resistance genes during the overwintering period of the mosquito Culex pipiens. *Heredity* **87**, 441–448. doi: 10.1046/j.1365-2540.2001.00926.x.

Gehlenborg, N. (2015). UpSetR: A More Scalable Alternative to Venn and Euler Diagrams for Visualizing Intersecting Sets. 1.4.0. doi: 10.32614/CRAN.package.UpSetR.

Gorman, M. J. and Paskewitz, S. M. (2001). Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 257–262. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00145-4.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A. B. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* **284**, 1313–1318. doi: 10.1126/science.284.5418.1313.

Kading, R. C., Brault, A. C. and Beckham, J. D. (2020). Global Perspectives on Arbovirus Outbreaks: A 2020 Snapshot. *Tropical Medicine and Infectious Disease* **5**, 142. doi: 10.3390/tropicalmed5030142.

Kärber, G. (1931). Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. *Naunyn-Schmiedebergs Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie* **162**, 480–483. doi: 10.1007/BF01863914.

Kassambara, A., Kosinski, M., Biecek, P. and Fabian, S. (2021). survminer: Drawing Survival Curves using "ggplot2."

Labbé, P., Milesi, P., Yébakima, A., Pasteur, N., Weill, M. and Lenormand, T. (2014). GENE-dosage effects on fitness in recent adaptive duplications: ace-1 in the mosquito Culex pipiens. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* **68**, 2092–2101. doi: 10.1111/evo.12372.

Labbé, P., David, J.-P., Alout, H., Milesi, P., Djogbénou, L., Pasteur, N. and Weill, M. (2017). Evolution of Resistance to Insecticide in Disease Vectors. In *Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition)* (ed. Tibayrenc, M.), pp. 313–339. Elsevier, London doi: 10.1016/B978-0-12-799942-5.00014-7.

Lecollinet, S., Blanchard, Y., Manson, C., Lowenski, S., Laloy, E., Quenault, H., Touzain, F., Lucas, P., Eraud, C., Bahuon, C., Zientara, S., Beck, C. and Decors, A. (2016). Dual Emergence of Usutu Virus in Common Blackbirds, Eastern France, 2015. *Emerging Infectious Diseases* **22**, 2225. doi: 10.3201/eid2212.161272.

Levashina, E. A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J. A. and Reichhart, J. M. (1999). Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient Drosophila. *Science (New York, N.Y.)* **285**, 1917–1919. doi: 10.1126/science.285.5435.1917.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200.

Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Bergé, J. B., Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N. and Pauron, D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s. *Insect Molecular Biology* **7**, 179–184. doi: 10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x.

Milesi, P., Assogba, B. S., Atyame, C. M., Pocquet, N., Berthomieu, A., Unal, S., Makoundou, P., Weill, M. and Labbé, P. (2018). The evolutionary fate of heterogeneous gene duplications: A precarious overdominant equilibrium between environment, sublethality and complementation. *Molecular Ecology* **27**, 493–507. doi: 10.1111/mec.14463.

Milesi, P., Claret, J.-L., Unal, S., Weill, M. and Labbé, P. (2022). Evolutionary trade-offs associated with copy number variations in resistance alleles in Culex pipiens mosquitoes. *Parasites & Vectors* **15**, 484. doi: 10.1186/s13071-022-05599-8.

Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S. B. and Sall, A. A. (2011). Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**, 1417–1423. doi: 10.1089/vbz.2011.0631.

Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N. and Chevillon, C. (2001). Insecticide resistance in the mosquito Culex pipiens: What have we learned about adaptation? In *Microevolution Rate, Pattern, Process* (ed. Hendry, A. P. and Kinnison, M. T.), pp. 287–296. Springer Netherlands, Dordrecht doi: 10.1007/978-94-010-0585-2_18.

Reeves, W. C. (1990). *Epidemiology and control of mosquito-borne arboviruses in California, 1943-1987*. California Mosquito and Vector Control Association, Sacramento, Calif. (197 Otto Circle, Sacramento 95822).

Severo, M. S., Sakhon, O. S., Choy, A., Stephens, K. D. and Pedra, J. H. F. (2013). The 'ubiquitous' reality of vector immunology. *Cellular Microbiology* **15**, 1070–1078. doi: 10.1111/cmi.12128.

Tabachnick, W. J. (1994). Genetics of Insect Vector Competence for Arboviruses. In *Advances in Disease Vector Research* (ed. Harris, K. F.), pp. 93–108. Springer, New York, NY doi: 10.1007/978-1-4612-2590-4_4.

Therneau, T. M. (2024). coxme: Mixed Effects Cox Models.

Verma, J. (2018). Antiviral Mechanism of Serine Protease in Various Insects. In *Trends in Insect Molecular Biology and Biotechnology* (ed. Kumar, D. and Gong, C.), pp. 143–161. Springer International Publishing, Cham doi: 10.1007/978-3-319-61343-7_8.

Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S. and Rivero, A. (2015). Plasmodium infection brings forward mosquito oviposition. *Biology Letters* **11**, 20140840. doi: 10.1098/rsbl.2014.0840.

Weetman, D., Mitchell, S. N., Wilding, C. S., Birks, D. P., Yawson, A. E., Essandoh, J., Mawejje, H. D., Djogbenou, L. S., Steen, K., Rippon, E. J., Clarkson, C. S., Field, S. G., Rigden, D. J. and Donnelly, M. J. (2015). Contemporary evolution of resistance at the major insecticide target site gene Ace-1 by mutation and copy number variation in the malaria mosquito Anopheles gambiae. *Molecular Ecology* **24**, 2656–2672. doi: 10.1111/mec.13197.

Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M. and Raymond, M. (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily

637 detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* **13**, 1–7. doi: 10.1111/j.1365-
638 2583.2004.00452.x.

639 **Williams, M. C., Simpson, D. I. H., Haddow, A. J. and Knight, E. M.** (1964). The Isolation
640 of West Nile Virus from Man and of Usutu Virus from the Bird-Biting Mosquito Mansonia
641 Aurites (Theobald) in the Entebbe Area of Uganda. *Annals of Tropical Medicine &*
642 *Parasitology* **58**, 367–374. doi: 10.1080/00034983.1964.11686258.

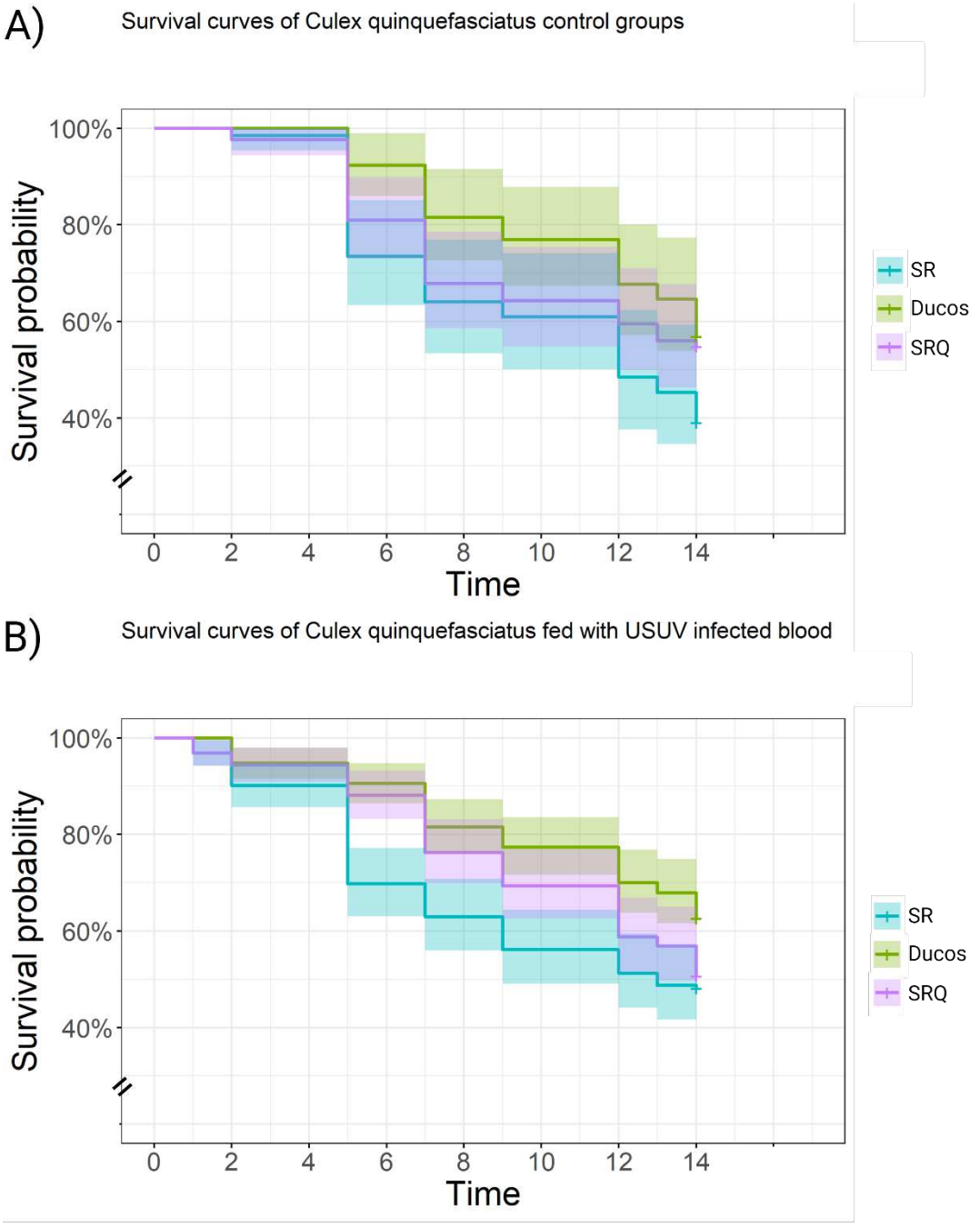
643 **Yunshun Chen, A. L.** (2017). edgeR. doi: 10.18129/B9.BIOC.EDGER.

644

645

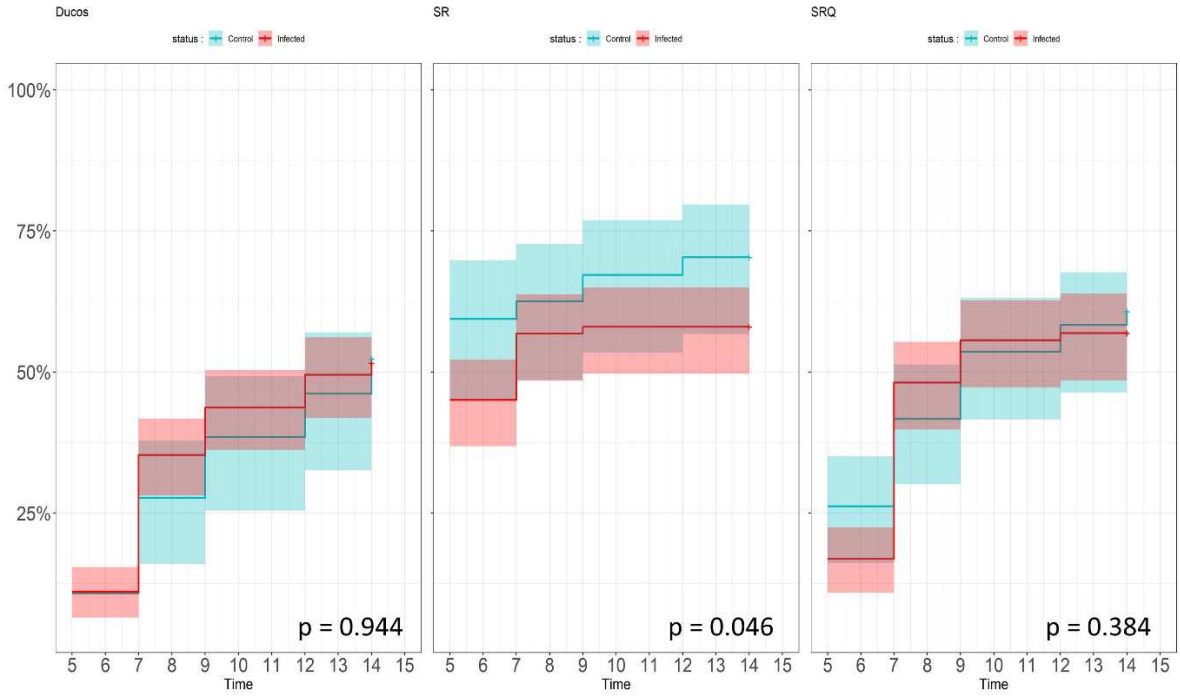
Supplementary data :

Figure S1 : Kaplan Meier survival curves of *Culex quinquefasciatus* colonies blood fed with non-infected ("control") and bloodmeal infected with USUV EU3 ("exposed to USUV").



Survival curves between colonies : SR blue line, Ducos green line and SRQ purple line, with areas representing the IC95, Significance were tested with log likelihood test. (: p-value < 0.05 ; ** : p-value < 0.01). Pannel A) is the "control" condition and B) the "exposed to USUV" condition. Survival assay were performed in triplicate for each condition and each colony. Y axis was truncated (//) to improve visibility between curves.*

Figure S2 : Comparisons of the cumulative percentage of eggs hatching for the 3 colonies between "control" and "exposed to USUV" conditions.



Cumulative egg hatching rate is plotted over time after bloodmeal. For the three Cx. quinquefasciatus colonies the "control" condition is in blue and the "exposed to USUV" condition in red . The P-values of the log-rank tests comparing the two conditions are given for each colony.

Figure S3 : Comparisons of the cumulative percentage of eggs laying for the two conditions tested (A) "control" and B) "exposed to USUV") between the 3 *Cx. quinquefasciatus* colonies.

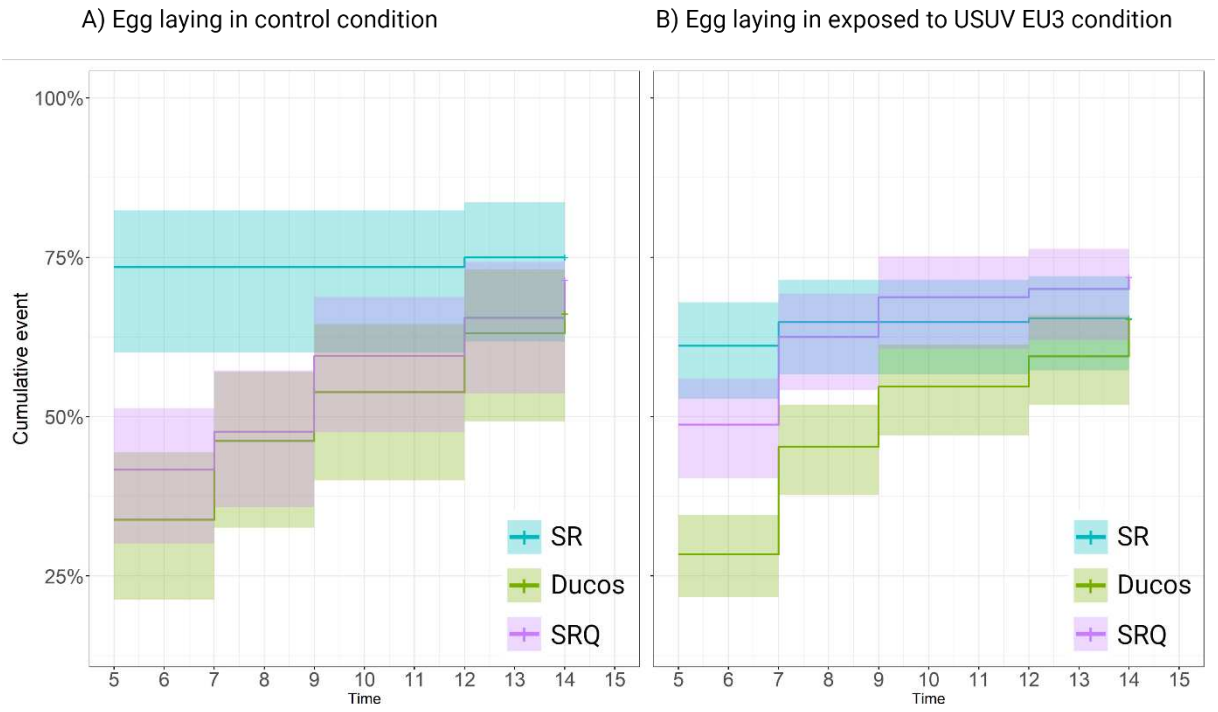
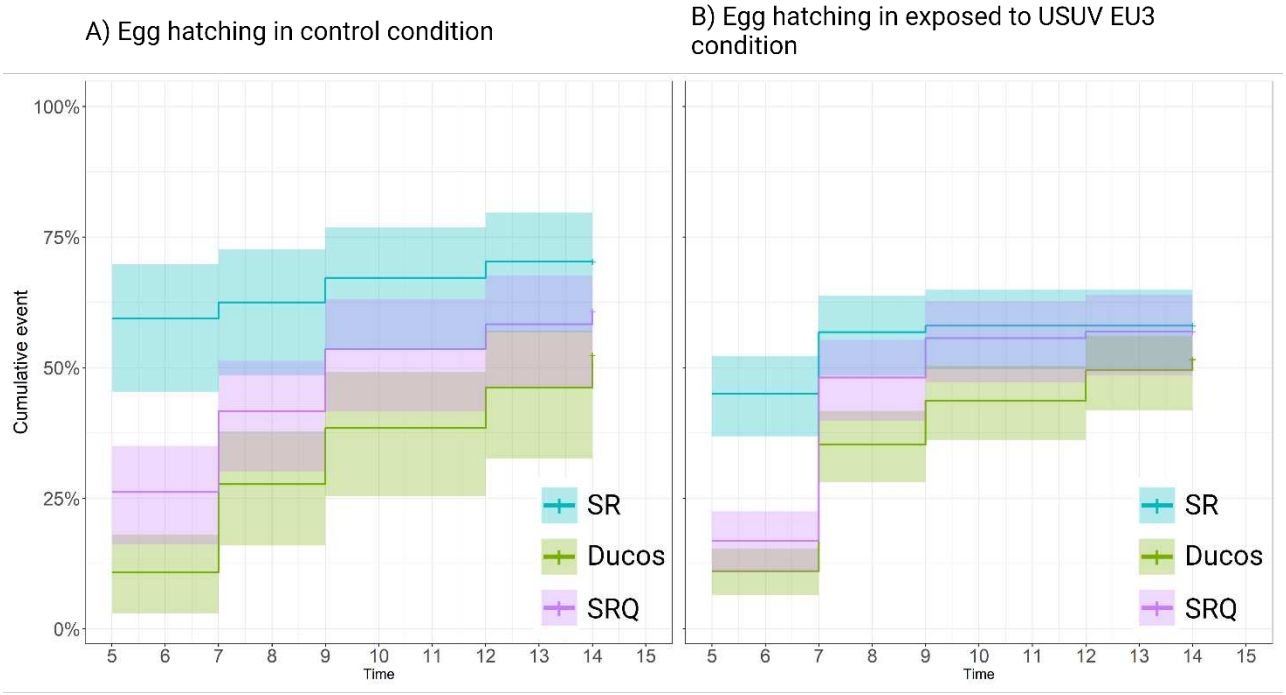


Figure S4 : Comparisons of the cumulative percentage of eggs hatching for the two conditions tested (A) "control" and B) "exposed to USUV") between the 3 *Cx. quinquefasciatus* colonies.



672 **Table S1 : Significant DEG :**

673 https://github.com/maxprat/Thesis-Culex-mosquitoes

674

675 **Table S2 : GO term enrichment :**

676 https://github.com/maxprat/Thesis-Culex-mosquitoes

677

678 **Table S3 : Table of most differentially expressed genes for each contrasts**
679 **tested in "control condition" :**

transcript	*regulation*	*logFC*	*p-value*	*Protein Description optain by BLAST*
Ducos vs SR				
quinque_mtp_093910	down	-15.00	1.47E-37	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.3.8.7)
quinque_mtp_070470	down	-13.83	1.06E-08	3-oxoacyl-[acyl-carrier-protein] reductase FabG (EC 1.1.1.100)
quinque_mtp_040660	down	-13.47	5.24E-11	Chromosome transmission fidelity protein 18 homolog (CTF18) (Cutlet protein)
quinque_mtp_124980	up	11.34	3.58E-15	DNA repair protein RAD51 homolog 3 (AtRAD51C)
quinque_mtp_018810	up	11.42	9.80E-10	Kelch-like protein 18
quinque_mtp_019780	up	12.22	3.13E-12	PREDICTED: Culex pipiens pallens c-Myc-binding protein (LOC120419440) : XM_039582122.2
SRQ vs SR				
quinque_mtp_093910	down	-15.00	2.11E-37	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.3.8.7)
quinque_mtp_031800	down	-13.15	6.70E-12	Chymotrypsin-2 (EC 3.4.21.1) (AnChym2)
quinque_mtp_144810	down	-12.97	9.99E-09	Culex quinquefasciatus uncharacterized protein LOC119769252 (XM_038261188.1)
quinque_mtp_084210	up	11.25	1.47E-09	Fibroblast growth factor receptor homolog 1 (EC 2.7.10.1)
quinque_mtp_055440	up	11.50	1.89E-24	Golgin-84
quinque_mtp_011750	up	12.03	1.45E-05	PREDICTED: Culex pipiens pallens uncharacterized LOC120424585
Ducos vs SRQ				
quinque_mtp_013510	down	-13.47	1.19E-10	Probable chitinase 2 (EC 3.2.1.14)
quinque_mtp_037210	down	-13.10	3.27E-17	E3 ubiquitin-protein ligase Hakai (EC 2.3.2.27)
quinque_mtp_128470	down	-12.48	1.10E-23	Chronophin (EC 3.1.3.16) (EC 3.1.3.74)
quinque_mtp_034650	up	10.36	1.02E-19	Probable 28S ribosomal protein S16, mitochondrial (MRP-S16) (S16mt)
quinque_mtp_144810	up	10.69	4.76E-07	Culex quinquefasciatus uncharacterized protein LOC119769252 (XM_038261188.1)
quinque_mtp_002820	up	10.99	2.00E-05	Culex quinquefasciatus protein lethal(2)denticleless (LOC6038664) XM_001848369.2

680

Table S4 : Table of most differentially expressed genes for each contrasts tested in "exposed to USUV" condition :

transcript	*regulation*	*logFC*	*p-value*	*Protein Description optain by BLAST*
Ducos vs SR				
quinque_mtp_093910	down	-14.50	2.61E-34	Medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial (EC 1.3.8.7)
quinque_mtp_117880	down	-13.71	9.88E-25	60S ribosomal export protein NMD3
quinque_mtp_043880	down	-13.12	1.81E-18	DNA damage-regulated autophagy modulator protein 1 (Damage-regulated autophagy modulator)
quinque_mtp_018810	up	11.90	7.33E-10	Kelch-like protein 18
quinque_mtp_019780	up	12.42	5.20E-12	PREDICTED: Culex pipiens pallens c-Myc-binding protein (LOC120419440) : XM_039582122.2
quinque_mtp_140440	up	13.32	2.85E-15	Cytochrome c oxidase subunit 5A
SRQ vs SR				
quinque_mtp_144280	down	-12.56	9.84E-10	Culex pipiens pallens mucin-5AC XM_039583209.2
quinque_mtp_034640	down	-12.46	8.04E-12	CDGSH iron-sulfur domain-containing protein 2 homolog
quinque_mtp_071980	down	-11.16	1.29E-11	Sin3 histone deacetylase corepressor complex component SDS3
quinque_mtp_075460	up	11.08	6.85E-10	ATP-dependent RNA helicase DHX15 homolog (EC 3.6.4.13)
quinque_mtp_002240	up	12.46	2.51E-06	Probable Golgi SNAP receptor complex member 2
quinque_mtp_140440	up	13.72	6.59E-16	Cytochrome c oxidase subunit 5A
Ducos vs SRQ				
quinque_mtp_049760	down	-13.19	0.00021484	Culex quinquefasciatus uncharacterized protein LOC6034346 XM_038256330.1
quinque_mtp_049170	down	-13.11	1.16E-28	Culex quinquefasciatus 26S proteasome complex subunit SEM1
quinque_mtp_077800	down	-12.74	1.03E-10	Culex quinquefasciatus aminopeptidase N-like
quinque_mtp_107510	up	10.35	7.18E-11	tRNA (guanine(37)-N1)-methyltransferase (EC 2.1.1.228)
quinque_mtp_069910	up	10.70	6.12E-22	Culex quinquefasciatus tRNA (guanine(37)-N1)-methyltransferase transcript variant X3 (LOC6041984)
quinque_mtp_114470	up	13.84	9.23E-18	NA

Conclusions du chapitre 1 :

Dans ce premier chapitre, j'ai caractérisé la compétence vectorielle de deux espèces du complexe *Cx. pipiens,* principalement pour le virus Usutu mais aussi pour West Nile. L'approche par infections expérimentales a permis d'explorer les variations de phénotypes d'infection en lien avec différents allèles de résistance aux insecticides sélectionnés dans les populations naturelles.

En préambule, l'étude de la compétence vectorielle de *Cx. pipiens* pour différentes lignées du virus Usutu a montré un aspect important : la transmission est fortement impactée par les couples vecteur-pathogènes qui constituent les systèmes vectoriels. Ceci doit être considéré à des échelles fines, à savoir l'espèce chez le vecteur et l'origine de la population considérée, ainsi que la lignée virale pour le pathogène.

Dans un premier temps nous avons mis en évidence un effet des facteurs génétiques viraux sur deux paramètres de la capacité vectorielle : la survie et la compétence vectorielle. En effet nos résultats suggèrent que l'exposition la lignée EU3 serait beaucoup plus délétère vis-à-vis de *Cx. pipiens* en cas de contact par piqure sur un hôte infecté, comme en témoigne sa plus grande virulence chez ce dernier. Les phénotypes d'infection observés sur modèle mammifère avec ces mêmes lignées suggéraient l'existence d'un compromis évolutif entre virulence et transmission. Les phénotypes observés chez *Cx. pipiens* n'indiquent pas de compromis si on limite les observations soit à l'hôte soit au vecteur. Cependant en tenant compte de l'ensemble des acteurs du cycle de transmission, la lignée virale la plus virulente pour l'hôte serait moins transmise aux moustiques (et inversement) car elle réduirait l'espérance de vie infectieuse de manière importante de l'hôte (ou du vecteur).

A partir des infections menées, les résultats ont indiqué un effet d'allèles de résistance aux insecticides sur la transmission de USUV. Les allèles de résistance associées à des mécanismes de mutation de cible (*ace-1, kdr, rdl)* ne semblent pas corrélés à la prévalence de l'infection des vecteurs, contrairement aux estérases, impliquées dans la résistance métabolique, dont les génotypes résistants sont corrélés à une prévalence d'infection plus forte. La surproduction de ces estérases pourrait avoir des effets négatifs sur les ressources énergétiques de l'individu (Rivero *et al.*, 2011) permettant au virus de se répliquer plus efficacement dans un environnement moins propice à initier une réponse immunitaire efficace. De plus, on observe une corrélation positive entre le nombre d'allèles de résistance (au quatre loci testés) et la prévalence d'USUV dans le thorax, et sur la charge virale dans la salive. Plus les individus ont

une résistance multiple (appelée multirésistance ici), c'est-à-dire une combinaison de génotypes résistants sur les 4 gènes, plus l'efficacité de dissémination et de transmission de la lignée EU3 est importante.

A la suite de cela, l'étude de la compétence vectorielle sur des colonies à fond génétique homogène a permis d'explorer les effets d'allèles de résistance d'un gène cible sur la compétence vectorielle pour le virus Usutu et les traits d'histoire de vie de *Cx. quinquefasciatus*. Nous avons pu mettre en avant une réduction de la compétence vectorielle chez les individus résistants, quelle que soit l'allèle considéré, par rapport aux individus sensibles. Mais les différentes architectures génomiques sélectionnées au cours du temps, tel que les duplications, sont associées à des effets sur les traits d'histoire de vie tel que la survie et la fécondité.

Ceci est notamment visible pour les duplications hétérogènes et non pour les triplications homogènes.

En conclusion, les résultats décrits dans ce premier chapitre concernent les impacts de facteurs génétiques sur divers phénotypes : la compétence vectorielle des espèces étudiées et les conséquences de l'infection sur les traits d'histoire de vie des vecteurs. Nous avons mis en avant 3 aspects : i) les effets de facteurs génétiques viraux (lignées virales), ii) l'effet des allèles de résistance ainsi que iii) les architectures génomiques de ces allèles sur la compétence vectorielle ainsi que sur la valeur sélective des individus. Plus spécifiquement, la résistance aux insecticides a une influence sur la compétence vectorielle de *Cx. pipiens* pour USUV. Mais les phénotypes d'infections sont hétérogènes entre les couples, considérant une espèce vectrice et une lignée spécifique d'un pathogène étudié. Tantôt il est observé une augmentation tantôt une réduction de la compétence vectorielle, ce qui met en avant la nécessité de considérer et de replacer les études dans un contexte précis et a des échelles fines. Considérer l'origine de l'espèce étudiée, sa population, et la lignée virale d'intérêt.

Sur la base de ces observations, nous allons dans le second chapitre changer d'échelle et explorer les gènes impliqués dans la compétence vectorielle des différentes espèces étudiées dans le but d'identifier des éléments génétiques pour expliquer la transmission différentielle pour i) une même espèce infectée par deux lignées virales et ii) entre les génotypes de résistances pour une lignée virale unique.

Points clés du chapitre 1 :

La compétence vectorielle est influencée par les facteurs génétiques viraux, ce qui nécessite de considérer les lignées virales d'un arbovirus dans les études.

Les allèles de résistance aux insecticides ont des impacts divers sur la transmission et la valeur sélective des individus :

- Individuellement, les mécanismes de résistance par mutation de cible ne sont pas associés à une variation de la compétence vectorielle, contrairement à un mécanisme de résistance métabolique.
- La synergie des allèles de résistance pour plusieurs gènes est associée à une compétence vectorielle accrue.
- Les architectures génomiques telles que les duplications hétérogènes et homogènes sont à l'origine d'effets divers sur la valeur sélective des individus et sur la transmission.

Chapitre II : Impacts des arbovirus et des gènes de résistance sur l'expression du génome

La première partie de mes travaux de recherche a visé à mesurer comment les effets des allèles de résistance aux insecticides sur les phénotypes d'infection, la mortalité ou la fécondité affectaient la compétence et la capacité vectorielles des moustiques. La synthèse de ces observations montre que les allèles de résistance et leurs architectures génomiques ont des impacts complexes sur les traits mesurés (**Articles 2, 3 et 4**). L'objectif était ensuite de savoir quels gènes voyaient leur expression modifiée par ces variations dans les réponses à l'exposition et l'infection par des arbovirus en fonction des allèles de résistance présents, et si ces patrons d'expression sont communs au sein du complexe *Cx. pipiens.* Ce second chapitre s'articule donc autour des analyses transcriptomiques réalisées à partir des échantillons produits lors des études décrites au chapitre 1.

Prérequis pour des analyses RNA-seq sur un modèle arthropode

Le premier point crucial a été d'obtenir la qualité nécessaire des acides nucléiques issus de nos échantillons pour le séquençage du transcriptome. L'ARN étant une matrice sensible à la dégradation, plusieurs échantillons n'ont pas pu être séquencés dus à une dégradation trop importante. En effet, malgré les nombreuses précautions prises pour l'éviter, par exemple, des cycles de décongélations inutiles. L'ARN des arthropodes est connu comme étant très thermosensible et la spécificité de ces ARN peut générer des résultats de contrôles qualités trompeurs (Winnebeck *et al.*, 2010; DeLeo *et al.*, 2018). Les trois réplicats d'exposition à un repas sanguin infecté ont ainsi dû être entièrement répétés pour avoir un matériel biologique de qualité suffisante pour cette analyse (ce qui a représenté des mois de travail à recommencer, avec environ 3 semaines par réplicats concernant la partie P3 et biologie moléculaire, sans compter le temps nécessaire en amont pour élever suffisamment d'individus pour une infections).

Un second prérequis pour ces analyses est la disponibilité d'un génome de référence de qualité, avec une annotation également de bonne qualité. Dans le complexe *Cx. pipiens*, très peu d'espèces disposaient d'un génome annoté : *Cx. pipiens pallens, Cx. molestus et Cx. quinquefasciatus* (Matthews *et al.*, 2018; Peng *et al.*, 2021; Liu *et al.*, 2023, 2022). Par ailleurs,

ces génomes étaient très fragmentés ce qui réduisait fortement la qualité de leur annotation. En prévision des études transcriptomiques, il avait été entrepris d'assembler et d'annoter à partir d'une stratégie hybride les génomes des espèces d'intérêt, à savoir *Cx. pipiens pipiens*, *Cx. molestus* et *Cx. quinquefasciatus*. Nous avons utilisé plusieurs méthodes de séquençages, mélangeant short-reads et long-reads. Très récemment, un nouvel assemblage du génome de *Cx. quinquefasciatus* a été publié (Ryazansky *et al.*, 2024) ce qui a permis de valider les données génomiques que nous avons produites. Grâce au travail précieux de Théo Durand, ingénieur bio-informaticien, j'ai pu avoir accès à des données et à un encadrement de très bonne qualité.

A) Gènes impactés par la réponse à l'infection par USUV chez *Cx. pipiens*

Les analyses ayant menées à la rédaction du premier article « Virulence and transmission vary between Usutu virus lineages in *Culex pipiens* » ont fait état d'impacts variables sur les traits d'histoire de vie des individus infectés par deux lignées du virus Usutu. Afin d'explorer les différences phénotypiques observées, j'ai mené une première étude transcriptomique sur ces échantillons. L'objectif de cette étude était d'explorer les gènes différentiellement exprimés chez *Cx. pipiens* en réponse à l'infection par deux lignées USUV (EU2 et EU3), puisqu'elles présentaient des profils différents de transmission et d'impact sur la survie des individus. L'objectif était de savoir si ces différences phénotypiques étaient attribuables à des gènes communs mais exprimés différentiellement entre les deux lignées, ou si l'infection par l'une ou l'autre des deux lignées stimulait l'expression de gènes différents.

Matériel et méthode

Nous avons préalablement réalisé des extractions d'ARN totaux sur les tissus du thorax et des abdomens des individus compétents pour les deux lignées, c'est à dire des individus infectés et présentant du génome viral de USUV dans leur salive. Afin de convenir aux exigences des plateformes de séquençage quant aux quantités d'ARN (minimum 1000 ng par banque), des pools de 5 individus ont été réalisés. La qualité et la quantité de tous les échantillons ont été contrôlées, afin de vérifier leur concentration ainsi que leur profil de dégradation. Ces contrôles sont importants pour de ne pas mélanger au sein d'un pool des ARN de qualité moindre, afin

de ne pas séquencer du matériel génétique dégradé pouvant avoir des répercussions sur le travail bio-informatique ultérieur. Ces pools ont été formés de façon équimolaire à partir d'ARN présentant des qualités et des profils en RT-qPCR USUV équivalents, afin de minimiser les variations interindividuelles dans les pools.

Au total j'ai réalisé 9 pools correspondant à 3 conditions, issues de trois réplicats d'exposition indépendants.

- 3 pools de femelles *Cx. p. pipiens* contrôles (gorgées avec du sang non infecté)
- 3 pools de femelles compétentes pour la lignée EU2 USUV (présentant du génome viral dans la salive)
- 3 pools de femelles compétentes pour la lignée EU3 USUV (présentant du génome viral dans la salive)

Les banques ont été construites avec le kit TruSeq Stranded mRNA d'Illumina, et ont été séquencées sur une flowcell SP en paired-end de 50 nucléotides. Le séquençage a été réalisé sur Novaseq6000 par la plateforme Montpellier GenomiX (MGX).

Analyse des données NGS :

Pour l'analyse des données NGS, les séquences adaptatrices ont été éliminées avec Cutadapt (Martin, 2011), et les données brutes de séquençage ont été contrôlées avec FastQC (Andrews, S. 2010). L'annotation du génome de *Cx. pipiens,* issue de l'annotation réalisée sur les individus tirés de la colonie en élevage à l'insectarium et utilisé pour les infections (AN : JBEHCU000000000) a été utilisée pour aligner les séquences RNA-seq sur le transcriptome de référence à l'aide du logiciel STAR (Dobin *et al.*, 2013). L'expression différentielle des gènes a été analysée avec AskoR (Alves-Carvalho *et al.*, 2021), un pipeline automatisé réalisant une analyse transcriptomique complète avec les packages R EdgeR (Yunshun Chen, 2017), UpSetR (Gehlenborg, 2015), topGO (Adrian Alexa, 2017) et Coseq (Andrea Rau, 2017). Les changements significatifs d'expression ont été filtrés par une différence d'expression (log2 fold-change) supérieure à 1 ou inférieure à -1 et une *p-value* ajustée ≤ 0.01. Les termes ontologiques des gènes (GO:term), représentant leur fonction, ont été attribués aux gènes différentiellement exprimés à l'aide de Blast2GO (Conesa *et al.*, 2005). Les transcrits et les protéines associées ont été identifiés à l'aide de Blast sur la base de données Uniprot : https://gannet.fish.washington.edu/seashell/snaps/uniprot_table_r2023_01.tab.

Une analyse de la surreprésentation de GO terms a été menée lorsque le nombre de gènes différentiellement exprimés dans un contraste était supérieure à 100 DEG annotés. Un algorithme weight01 et un test exact de Fisher ont été utilisés pour catégoriser les gènes différentiellement exprimés (DEG) dans les processus biologiques (BP).

NB : Pour la suite de cette partie et pour plus de clarté, j'abrègerais par icEU2 « les individus compétents pour la lignée EU2 USUV », icEU3 « les individus compétents pour la lignée EU3 » et CG « les individus contrôles non infectés à USUV ».

Résultats :

Plusieurs contrastes ont été testés : icEU2 vs CG, icEU3 vs CG et icEU2 vs icEU3. L'analyse globale montre qu'une grande partie des DEG sont sous-exprimés dans icEU2 et icEU3 par rapport aux CG (**Figure 14**). L'identité des gènes est précisée dans le **Tableau 4** ci-dessous ; 74 n'ont pas de fonction annotée dans les bases de données (37 pour icEU2 vs CG et 37 pour icEU3 vs CG).

Table 4 : Nombres de gènes différentiellement exprimés selon les contrastes

Contrastes	*gènes totaux différentiellement exprimés*	*gènes sous-exprimés*	*gènes surexprimés*
icEU2 vs CG	77	75	2
icEU3 vs CG	78	71	7
icEU2 vs icEU3	2	2	0

Tout d'abord, on constate une très forte homogénéité dans la réponse aux deux souches de USUV, visible quand on analyse directement le contraste icEU2 vs icEU3. En effet, seuls deux gènes présentent des différences d'expression significatives entre les individus compétents, i.e. 2 DEG : i) le premier code pour une protéine salivaire appartenant à la famille D7, il est sous-exprimé chez les deux lignées (log_2FC = -10,15 pour icEU2 vs CG et log_2FC = -4,79 chez icEU3 vs CG), mais significativement plus fortement pour icEU2vsCG (log_2FC = - 5,4, p-value < 0,0001) ; ii) le second gène correspond à un ncRNA de la classe des lncRNA (AN : XR_005277434), il est sous-exprimé chez icEU2 (logFC = -2.65 pour icEU2 vs CG) mais pas chez icEU3 et la différence est significative (logFC = -2,2, p-value < 0.0001).

Si on s'intéresse maintenant à l'identité des gènes dont l'expression est modifiée par l'infection, i.e. dans les contrastes icEU2 vs CG et icEU3 vs CG, on observe qu'il y en a 77 et 78 respectivement (**Figure 15**). On observe également que la réponse à l'infection passe essentiellement par la sous-expression de nombreux gènes, moins de 10% présentant au contraire une surexpression.

Afin d'identifier les gènes dont l'expression est la plus affectée par l'infection, nous avons fait le choix de ne présenter ici (**supplementary data**) que les 44 gènes significativement affectés pour les deux souches. C'est un choix arbitraire, qui vise à ne pas alourdir inutilement le manuscrit.

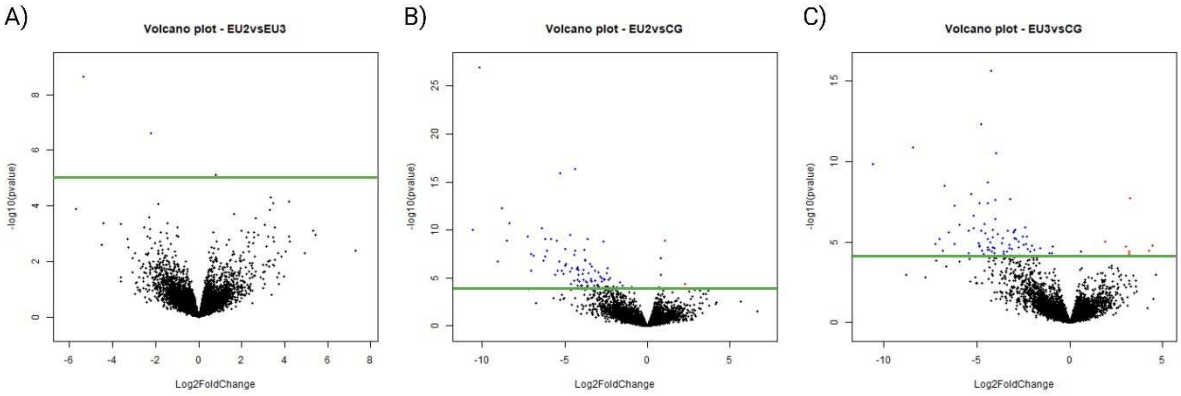


Figure 14 : Distribution de l'expression des gènes dans les contrastes : *Gènes différentiellement exprimés (DEG) entre : A) icEU2 vs icEU3 B) icEU2 vs CG ; B) icEU3 vs CG ; Les points rouges indiquent les DEG avec un log2FC (log_2 Fold-Change) > 1 et un seuil de significativité FDR (false discovery rate) < 0.01 (ligne verte horizontale) ; les points bleus indiquent les DEG avec un log2FC < -1 et un FDR < 0.01.*

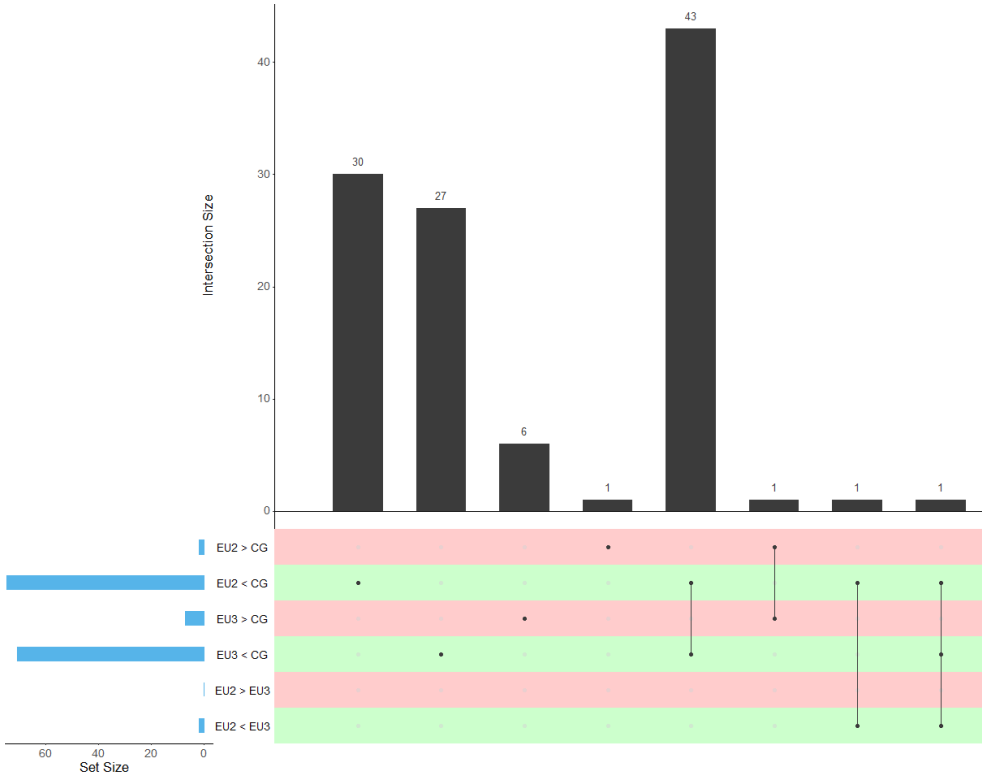


Figure 15 : Analyse croisée des DEG entre contrastes : *La barre verticale supérieure indique le nombre de gènes (axe y) contenus dans chaque intersection (axe x). La barre horizontale du bas indique le nombre de gènes différentiellement exprimés pour chaque comparaison.*

Discussion :

Dans cette étude, j'ai étudié les modifications du transcriptome observées chez *Cx. pipiens* en réponse à l'infection par les lignées USUV EU2 et EU3, donc en faisant varier les facteurs génétiques viraux. Cette étude nous a permis d'observer qu'un nombre important (≈70) de gènes voient leur expression altérée chez les individus compétents (*i.e.* avec une salive positive au génome viral USUV). Par ailleurs, ces gènes présentent majoritairement des profils de sous-expression par rapport aux individus contrôles, non exposés au virus. Enfin, on constate que les réponses du transcriptome sont extrêmement similaires entre les deux lignées virales, témoignant d'une réponse globalement homogène à l'infection par USUV.

En effet, seuls deux gènes sont significativement et différentiellement exprimés entre icEU2 et icEU3. Ces expressions différentielles pourraient donc potentiellement expliquer les différences phénotypiques entre les deux lignées USUV concernant la transmission : pour rappel, la lignée EU2 a montré dans nos études phénotypiques une plus forte réplication au sein des tissus par rapport à EU3, la différence étant surtout marquée à faible titre (voir article 1).

Le premier gène code pour une protéine salivaire de la famille D7, abondamment exprimée au sein des diptères hématophages (Valenzuela *et al.*, 2002). Ces protéines ont été caractérisées comme ayant un rôle anti-hémostatique et anti-inflammatoires chez *Ae. albopictus* et *Cx. quinquefasciatus* (Martin-Martin *et al.*, 2020a; b; Smith *et al.*, 2022, Djegbe *et al.*, 2011). Leurs implications dans les processus de transmission des pathogènes par les arthropodes restent néanmoins peu documentés. Ce gène est sous-exprimé dans la réponse à l'infection par EU2 comme à celle par EU3, néanmoins cette sous-expression est moins prononcée dans le second cas. S'il est difficile de comprendre l'effet de cette sous-expression sur le moustique lui-même, il est en revanche possible qu'elle est un impact sur la transmission : une réduction de l'effet anti-hémostatique de la salive de moustiques pourrait diminuer l'efficacité des repas sanguins post-infection, ce qui pourrait se traduire par une augmentation des piqures nécessaires pour atteindre un repas complet, ce qui en conséquence faciliterait la transmission du virus. Il pourrait donc s'agir d'une manipulation du vecteur par le virus (comme observé pour d'autres pathogènes, un exemple est le virus La Cross qui augmente le taux de piqures chez *Ae. triseriatus* (Jackson *et al.*, 2012)). Il est néanmoins possible également que la diminution de l'efficacité des repas sanguins entraine une augmentation de mortalité par une exposition accrue du moustique a une défense de l'hôte.

Le second gène code pour un lncRNA dont les fonctions, bien que rapportées chez *An. gambiae* (Jenkins *et al.*, 2015), ont majoritairement été décrites chez *D. melanogaster* : la revue de (Han *et al.*, 2024) fait état des nombreuses implications métaboliques de ces molécules, parmi lesquelles on trouve notamment l'immunité. Ce gène est sous-exprimé chez les individus compétents pour EU2, mais pas chez ceux compétents pour EU3. En réduisant l'immunité, il est possible que la sous-expression de ce gène entraine une meilleure réplication du virus, ce qui pourrait expliquer la meilleure réplication de la lignée EU2 par rapport à EU3 (Prat *et al.*, 2024).

Il est important de garder à l'esprit qu'il ne s'agit là que de pistes préliminaires, et que le rôle et l'impact des variations observées restent très largement à confirmer par des études fonctionnelles : on pourrait par exemple altérer l'expression de ces locus, par des outils moléculaires tels que CRISPR-CAS9 par exemple, pour confirmer leur effet sur les phénotypes de réponse à l'infection et la transmission.

Si on s'intéresse maintenant plus largement à la réponse générale à l'infection par USUV, on observe 44 gènes dont l'expression est significativement modifiée pour les 2 souches par rapport aux contrôles (Figure 15). Pour les 31 autres gènes qui ne montrent une expression significativement différente que pour le contraste icEU2 vs GC, et les 33 que pour le contraste icEU3 vs GC), les tendances restent néanmoins identiques pour la réponse aux deux lignées virales (sous- ou surexpression dans les deux contrastes). On peut donc penser que ces gènes correspondent bien à la réponse générique de *Cx. pipiens* face à l'infection par USUV.

Parmi les gènes partagés les plus différentiellement exprimés, on trouve des gènes codant pour des Heat shock proteins 70 (HSP70 ; niveaux d'expression moyen $\log_2$FC = -7.5 pour icEU3 vs CG et -7.9 pour icEU2 vs CG). Ces protéines jouent un rôle majeur dans de multiples voies de signalisations cellulaires liées notamment à la réponse au stress abiotique (Kiang and Tsokos, 1998; Mayer and Bukau, 2005), mais aussi dans la réponse immunitaire (Millar *et al.*, 2003; Multhoff, 2007). Chez les Culicidae, il a notamment été montré son importance dans la tolérance à la déshydratation (Benoit *et al.*, 2010). Un tel déficit en HSP70 chez les individus infectés pourrait suggérer un manque de réponse efficiente au stress engendré par l'exposition au virus, permettant la réplication efficace des deux lignées virales.

On observe aussi une forte sous-expression, similaire pour les 2 lignées ($\log_2$FC = -6.18), du gène codant pour la protéine Efl21 chez *D. melanogaster* (protein lethal(2)essential for life). Cette protéine semble avoir un rôle dans la réplication du virus de la Dengue chez *Ae. aegypti* :

la surexpression de ce gène entrainerait une diminution de la réplication du DENV dans les lignées cellulaires *A. aegypti* CCL-125 (Runtuwene *et al.*, 2020). La sous-expression de Efl21 chez les individus infectés par EU2 et EU3 pourrait là-encore être le signe d'une manipulation du vecteur moustique par USUV, en entrainant ainsi une réplication plus efficace du virus.

Pour conclure sur cette première étude, il semble de façon générale que la réponse à l'infection par le virus USUV soit globalement très homogène quelle que soit la lignée considérée : à part deux gènes, ce sont les mêmes dont l'expression est modifiée par les lignées EU2 et EU3. Par ailleurs, dans ces moustiques qui n'ont pas pu résister à l'infection, l'analyse des locus les plus altérés suggère bien une réponse peu efficace, avec des gènes impliqués dans l'immunité et la réponse au stress dont l'expression est diminuée. Il pourrait s'agir là de la trace transcriptomique des altérations engendrées par le virus sur son vecteur qui permettent de favoriser sa transmission vers son hôte vertébré. Néanmoins, les différences quantitatives (niveaux de sous-expression différents pour la protéine salivaire de la famille D7) ou qualitatives (sous-expression pour lncRNA pour la réponse à EU2 mais pas EU3) observées dans cette réponse générique à USUV pourraient expliquer au moins en partie les différences observées dans la virulence et la transmission des différentes lignées USUV au sein de son vecteur *Cx. pipiens*. Des études fonctionnelles plus poussées seront nécessaires pour mieux comprendre ces différences.

La seconde partie de ce chapitre présente les expériences que j'ai réalisées pour étudier cette fois comment des facteurs génétiques du vecteur pouvaient également affecter les réponses transcriptomiques à l'infection par USUV. Pour cela, j'ai voulu explorer les effets de différents allèles de résistance sur ces réponses.

B) Influence de la résistance aux insecticides organophosphorés sur l'expression des gènes lors de la réponse de *Cx. quinquefasciatus* à l'infection par USUV

Dans le premier chapitre, nous avons étudié l'impact des allèles *ace-1* responsables de résistance aux OP sur la compétence vectorielle et les traits d'histoire de vie des moustiques exposés ou non à la lignée USUV EU3. Les résultats phénotypiques ont montré d'une part une compétence vectorielle très faible pour les trois colonies résistantes aux OP, et d'autre part, des variations des traits d'histoires de vie mesurées chez ces différentes colonies. J'ai donc cherché à savoir comment ces différences phénotypiques se traduisaient en termes d'expression des gènes.

Pour des questions de clarté, je diviserai les analyses sous la forme de deux articles (**Article 3** et **Article 4**). Dans **l'article 3,** je m'intéresserai donc aux gènes différentiellement exprimés en réponse à l'exposition à USUV EU3 pour chaque colonie (sensible et résistantes) par rapport à son contrôle non exposé (impact intra-colonie de l'exposition). Dans **l'article 4,** je m'intéresserai plus spécifiquement aux gènes exprimés différentiellement, après exposition ou non à USUV EU3, mais cette fois entre ces colonies résistantes présentant des traits d'histoire de vie différents (impact inter-colonies de l'exposition et des traits d'histoire de vie).

NB : la colonie Slab repurifiée (sensible aux OP) a montré lors de ces expériences les taux de mortalité les plus élevés et les taux de fécondité les plus bas, à l'inverse de ce qui était connu dans la littérature et obtenu dans mes expériences précédentes. En particulier, ces résultats étaient très différents de ceux issus des infections expérimentales réalisées avec WNV, malgré la contamination la colonie Slab (Chapitre 1 : Cx. quinquefasciatus vs WNV*). Nous suspectons un effet de consanguinité lié au goulot d'étranglement résultant du processus de purification. Il nous apparaît donc impossible de l'utiliser comme témoin sensible dans le cadre de l'étude des différentiels d'expression entre colonies, et nous avons donc choisi de comparer les effets des différents allèles de résistance uniquement entre eux (**article 4**). Nous avons choisi en revanche de conserver l'analyse de la colonie Slab pour **l'article 3** : notre raisonnement était que l'état général de la souche n'aurait que peu ou pas d'impact, puisque nous ne cherchions dans ce cas que des gènes différentiellement exprimés entre femelles exposées ou non à USUV, au sein de chaque colonie indépendamment.*

Matériel et méthodes :

Pour ces deux analyses, la méthode d'obtention des échantillons ainsi que les analyses bio-informatique et statistiques ont été réalisées de la même manière que dans la partie précédente, et sont communes aux deux articles suivants. Seules les comparaisons étudiées diffèrent et seront décrites dans chaque partie indépendamment. Le matériel génétique de départ est constitué d'ARN totaux de *Cx. quinquefasciatus* extraits individuellement puis assemblés par pools de 5 individus issus d'une même colonie et d'un même traitement. Le contrôle qualité ainsi que le séquençage de ces échantillons a suivi le même protocole que décrit plus haut (chapitre 2 partie A). La différence majeure est l'annotation du génome de *Cx. quinquefasciatus* utilisée pour aligner les séquences RNA-seq : j'ai en effet utilisé ici un génome dont l'assemblage et l'annotation avaient été initiés par Haoues Alout et mis en œuvre par Théo Durand à partir de la colonie Slab *Cx. quinquefasciatus* (en cours de validation par NCBI). Les séquences RNA-seq ont été alignées sur le transcriptome de Slab à l'aide du logiciel STAR (Dobin *et al.* 2013). L'expression différentielle des gènes ainsi que l'enrichissement en GO term a été analysé avec AskoR (Alves-Carvalho *et al.* 2021), en suivant le même paramétrage que décrit précédemment.

1) Réponses à l'exposition à USUV (article 3)

Dans un premier temps, comme pour *Cx. p. pipiens* (voir plus haut), j'ai donc cherché à étudier l'expression différentielle des gènes dans quatre colonies de *Cx. quinquefasciatus* présentant différentes compétences vectorielles. Les résultats et conclusions détaillées de cette partie ont été rassemblés dans l'**article 3** présenté en annexe de ce manuscrit « Investigating the interplay between insecticide resistance and Usutu virus transmission in *Cx. quinquefasciatus*. »; je ne présenterai ici qu'une rapide synthèse.

Résultats :

Trois types de femelles ont pu être étudiées au cours de ce travail : i) les femelles exposées à un repas sanguin non-infectieux, qualifiées dans ce manuscrit de "contrôles non-exposés", ii) les femelles exposées à un repas sanguin infectieux mais ne présentant pas de virus dans la

salive, qualifiées dans ce manuscrit de "non-compétentes", et les femelles exposées à un repas sanguin infectieux présentant pour lesquels des virus ont été mis en évidence dans la salive, qualifiées dans ce manuscrit de "compétentes". Dans le chapitre 1, nous avons observé que les colonies résistantes ne présentaient que très peu de femelles compétentes pour USUV (cf Figure 2 Article 3). La colonie Slab est donc la seule pour laquelle nous avons pu comparer les femelles compétentes et non-compétentes (Données phénotypiques dans **l'article 3**). Pour les colonies résistantes, les seules comparaisons possibles étaient entre femelles non-compétentes et femelles contrôles non-exposées.

Contrairement à ce qui a été observé dans le cas de *Cx. p. pipiens*, le nombre de gènes différentiellement exprimés entre les différents types de femelles étaient très important (>100) dans cette nouvelle étude. Je me suis donc concentré cette fois essentiellement sur l'enrichissement des Go-terms. Le détail des résultats est présenté dans l'**article 3**.

Globalement, on observe plusieurs tendances dans les *comparaisons entre femelles non-compétentes et femelles contrôles non-exposées* :

- On observe beaucoup de gènes différentiellement exprimés chez Slab et Ducos, les deux colonies les plus compétentes (675 et 549, resp.). Les femelles non-compétentes montrent l'enrichissement de processus biologiques tel que la protéolyse (63 gènes, majoritairement des sérines protéases, principalement surexprimés, pour Slab et Ducos), l'immunité innée (25 et 34 gènes, majoritairement surexprimés, dont 11 et 14 protéines de la voie Toll, resp.) ou des processus liés aux métabolisme énergétique (ex : activation du zymogène, transport du sodium, lipides, sucres).
- On observe par contraste peu de gènes différentiellement exprimés chez SR et SRQ (142 et 8, resp), deux colonies très peu voire pas compétentes pour USUV. Dans les deux le trop faible nombre de gènes annotés (<100) ne permettait pas d'analyser l'enrichissement en GO terms. Néanmoins dans les deux colonies, ces gènes sont plutôt surexprimés, et concernent des gènes de détoxication ou l'immunité (cytochromes P450, peptidases, etc.) ou des gènes de réponse au stress.

Pour Slab seulement, on retrouve aussi et principalement des gènes de protéolyse (17) et de l'immunité innée (15) dans la comparaison *entre femelles compétentes et femelles contrôles non-exposées* (et un nombre réduit de DEG significatifs, environ 50% moins que pour les femelles *non-compétentes*). La forte similarité des réponses à l'exposition est d'ailleurs confirmée par la *comparaison entre femelles non-compétentes et femelles compétentes* qui n'a

permis d'identifier que 4 DEG, tous surexprimés chez les femelles compétentes (voir annexe article 3). Ils codent pour des protéines impliquées dans la biogenèse des ribosomes, la biogénèse des complexes de la chaîne respiratoire dans la régulation cellulaire ou dans la réplication et la réparation de l'ADN chez les mammifères.

Discussion :

Les processus affectés par l'exposition au virus USUV, i.e. enrichis chez les femelles *non-compétentes* par rapport aux *femelles contrôles non-exposées*, semblent assez congruents dans toutes les colonies. Il s'agit en outre de processus qui pourraient effectivement participer à perturber la réplication du virus et sa dissémination jusqu'à la salive, via l'immunité de façon évidente, mais aussi via des modifications métaboliques (Hoffmann *et al.*, 1999; Levashina *et al.*, 1999; Gorman and Paskewitz, 2001).

Une seconde observation importante est que les *femelles compétentes* (au moins chez Slab) présentent très peu de variations qualitatives par rapport aux *non-compétentes*. Le fait de bloquer (non-compétentes) ou non (compétentes) la circulation du virus vers les glandes salivaires, i.e. les différences de compétence vectorielle, pourrait ainsi ne résulter principalement que de variations quantitatives dans la réponse immunitaire et le métabolisme énergétique. Il serait toutefois important de s'intéresser aux quatre gènes présentant une expression significativement différente pour tester leur impact sur la compétence vectorielle via des expériences de *knock-out* lors d'infections expérimentales.

Par ailleurs, un résultat frappant est que les colonies non-compétentes (SRQ et SR) présentent nettement moins de réponse apparente à l'exposition que celles présentant une compétence plus marquée (Slab et Ducos). Il est possible que ces différences résultent des impacts nettement plus négatifs sur la valeur sélective des allèles R_1 et R_2[3] (uniquement des allèles résistants) par rapport à l'allèle sensible ou à l'allèle D_1 (duplication hétérogène (Labbé *et al.*, 2007a)), notamment à cause de la présence d'une copie *ace-1* non-mutée dans ces deux dernières colonies. Il est ainsi possible que les effets pléiotropes induit par l'activité enzymatique plus efficiente de la copie S permette de réguler plus efficacement les réponses physiologiques suite à un stress, dont l'exposition au virus. Il est aussi possible que le fait de ne porter que des copies R entraine une perturbation globale du métabolisme qui rendrait la colonie réfractaire au virus. USUV serait alors soit éliminé avant même de pénétrer les tissus du système digestif, et donc

sans éliciter de réaction particulière, soit confronté à un niveau de perturbation métabolique déjà très élevé lors du passage dans les tissus, ce qui l'éliminerait rapidement sans modifier encore plus le métabolisme déjà perturbé. Pour tester ces hypothèses et les discriminer, il pourrait être intéressant de comparer ces mêmes souches lors de l'exposition à un virus atténué, incapable d'infecter le vecteur lors de l'exposition, pour voir si l'expression des colonies Ducos et Slab se rapprocherait alors de celles des colonies SR et SRQ.

Mais il est aussi possible de tester directement l'hypothèse d'un métabolisme basal plus élevé pour SR et SRQ en comparant directement l'expression des gènes entre les souches résistantes (on ne peut malheureusement pas le faire pour la souche Slab comme mentionné plus haut). C'est l'objectif de la partie suivante.

2) Effet des différents gènes de résistance sur le transcriptome selon différentes conditions d'exposition à USUV (article 4)

Dans un second temps, j'ai donc cherché à étudier l'expression différentielle des gènes dans trois colonies de *Cx. quinquefasciatus* dont les différents allèles de résistance *ace-1* qu'elles portent modifient les traits d'histoires de vie, à savoir la survie et la fécondité (cf. partie « *Cx. quinquefasciatus vs* USUV »). Les résultats et conclusions détaillées de cette partie ont été rassemblés dans l'**article 4** présenté en annexe de ce manuscrit « Investigating the interplay between insecticide resistance and life history traits of *Cx. quinquefasciatus* exposed to Usutu virus. » ; là-encore, je ne présenterai ici qu'une rapide synthèse.

Résultats :

J'ai donc mené une analyse transcriptomique pour identifier les gènes et processus biologiques présentant des différentiels d'expression entre les trois colonies résistantes Ducos, SR, et SRQ. Pour les raisons mentionnées plus haut je n'ai pas pu utiliser ici la référence sensible Slab.

De façon générale, on observe une différence moins marquée entre SR (allèle R_1, monocopie) et SRQ (allèle R_2^3, dupliqué homogène) qu'entre ces deux souches et Ducos (allèle D_1, dupliqué hétérogène) :

1) Dans les conditions contrôles, 1121 gènes sont différentiellement exprimés (DEG) entre Ducos et SR, on en retrouve 916 DEG entre Ducos et SRQ, pour seulement 468 DEG entre SRQ et SR. Les différences entre Ducos et les deux colonies SR et SRQ montrent d'abord un enrichissement de gènes i) liés au métabolisme, plutôt sous-exprimés chez Ducos (le GO term le plus représenté étant la « protéolyse », 104 DEG *vs* SR et 73 *vs* SRQ; mais on retrouve aussi le métabolisme des lipides et des glucides avec 24 et 19 DEG *vs* SRQ), ii) de la réponse immunitaire innée, de nouveau plutôt sous-exprimés chez Ducos (51 DEG *vs* SR et 36 *vs* SRQ). Entre les colonies SR et SRQ, on trouve surtout des différences au niveau des gènes du métabolisme (ex. 13 gènes impliqués dans la dégradation des protéines dépendantes de l'ubiquitine).

2) Dans les femelles exposées à USUV EU3, on retrouve la même tendance avec 494 DEG antre Ducos et SR et 513 DEG entre Ducos et SRQ, pour seulement 136 DEG entre SRQ et SR. De nouveau, on retrouve plutôt des gènes sous-exprimés chez Ducos par rapport aux deux autres colonies, essentiellement des protéines liées à l'immunité innée et d'autres processus immunitaires (16 gènes *vs* SR et *vs* SRQ), ou au métabolisme des protéines (12 gènes *vs* SRQ). Il n'y a pas d'enrichissement significatif des GO terms entre les colonies SR et SRQ exposées à USUV.

Discussion :

L'ensemble de ces résultats mettent en lumière des variations de l'expression génique de *Cx. quinquefasciatus* en fonction des allèles *ace-1* qu'ils portent: on observe globalement une sous-expression de gènes essentiellement liés à l'immunité et au métabolisme chez Ducos par rapport à SRQ et SR, dans les deux conditions d'exposition. On retrouve ainsi de nombreux gènes codant pour des sérines protéases et endopeptidases: ces enzymes jouent un rôle clé dans la digestion, la synthèse de peptides antimicrobiens, ainsi que dans l'activation des voies immunitaires en réponse à une infection (Hoffmann *et al.*, 1999; Levashina *et al.*, 1999; Gorman and Paskewitz, 2001). On observe aussi de nombreux gènes de l'immunité innée sous-exprimés chez les femelles portant l'allèle D_1, en particulier en absence d'exposition au virus. Cette observation est en accord avec une étude précédente ayant montré également une surexpression constitutive de certaines protéines de l'immunité dans la colonie SR par rapport à la colonie sensible Slab notamment la transferrine (Vézilier *et al.*, 2013).

Comme indiqué plus haut, alors que les colonies SR et SRQ ne portent que des copies *ace-1* R (un ou trois, resp.), la colonie Ducos porte une copie S associée à sa copie R. Des études précédentes avaient déjà montré que cette architecture hétérogène confère un net avantage aux porteurs de cet allèle en termes de survie et de fécondité, principalement lié à la présence de cette copie S (Labbé *et al.*, 2014). Mes propres travaux ont confirmé cet avantage en termes de survie (cf. Chap. 1), et mes analyses transcriptomiques semblent suggérer que cet allèle D_1 pourrait être associé à de moindres investissements constitutifs dans divers processus métaboliques et immunitaires ; un niveau basal plus élevé dans ces processus, entrainant une dépense d'énergie supérieure, pourrait expliquer la survie réduite des femelles porteuses des

allèles R_1 et R_2[3]. Il est regrettable de ne pas avoir pu disposer ici des observations pour l'allèle S de la colonie Slab, qui aurait pu nous aider à confirmer (ou non) cette tendance.

Il est possible que cette économie d'énergie chez Ducos, favorisant la survie, se fasse au détriment de la fécondité précoce comme observé chez Ducos par rapport à SR (mais moins forte par rapport à SRQ, voir Figures 2 et 3, article 4 ; Chap 1). De tels compromis associés à l'allocation des ressources énergétiques entre fécondité et survie ont été rapportés notamment sur les colonies SR *Cx. quinquefasciatus* par (Vézilier *et al.*, 2012). Néanmoins d'autres études (réalisées dans d'autres conditions expérimentales) indiquaient plutôt à la fois une fécondité et une survie moindres pour l'allèles R_1 par rapport à D_1 (Labbé *et al.*, 2014; Milesi *et al.*, 2016).

Pour mieux confirmer ces observations et mieux comprendre, il nous semble donc nécessaire à ce stade de répliquer cette expérience avec les 4 colonies (Slab, Ducos, SR et SRQ), mais après avoir pris soin de ré-introgresser les allèles de résistance dans un fond génomique commun avec la colonie Slab disponible au laboratoire (via une série de backcross qui ont déjà débutés).

Un dernier point notable de cette étude est la forte proximité entre les transcriptomes de SRQ et SR, dans les deux conditions d'exposition. SRQ semble montrer une survie similaire à SR mais une fécondité réduite (voir Figures 2 et 3, article 4 ; Chap 1). Cela confirme l'étude réalisée par (Milesi *et al.*, 2022) qui montrait un désavantage sélectif de SRQ par rapport à SR en les laissant évoluer en cage sur plusieurs générations (et on retrouve une tendance similaire chez *An. gambiae*, où un nombre de copies R supérieur résulte en une valeur sélective plus basse (Assogba *et al.*, 2015). Il a été proposé que cela serait lié soit à la surexpression des gènes embarqués dans la zone dupliquée, qui générerait des déséquilibres du dosage génique, notamment via des interactions avec d'autres gènes, non dupliqués. Les travaux de thèse de Jean-Loup Claret semblent en effet indiquer que, comme chez *An. gambiae* (Assogba *et al.*, 2016c), les duplications présente chez *Culex* autour du locus *ace-1* soient relativement grandes (de 200 à 600kb) et contiennent une dizaine de gènes autres que *ace-1* (JL Claret, unp. data). Des analyses approfondies de ces zones dupliquées et de ces gènes embarqués permettront, je l'espère, à l'avenir de déterminer leurs impacts sur les traits mesurés.

Conclusion chapitre 2 :

Peu d'études ont examiné les profils d'expression génique des moustiques du complexe d'espèces *Cx. pipiens* infectés par des Flavivirus, vecteurs du virus Usutu.

Mes travaux exploratoires à ce sujet suggèrent que la réponse à l'infection par USUV (observables chez les femelles compétentes, *i.e.* avec du virus dans la salive), explorée chez des lignées *Cx. p. pipiens,* semble essentiellement similaire pour deux lignées virales (EU2 et EU3) : on observe principalement une réduction de l'expression d'environ 70 gènes, notamment des gènes impliqués dans la réponse au stress ou dans l'immunité. Il semble que cette réponse soit liée directement aux facteurs génétiques du virus lui permettant, via des altérations de son vecteur, d'être transmis à son hôte vertébré. Nous avons montré que ces facteurs génétiques viraux étaient néanmoins différents entre les lignées EU2 et EU3, avec des virulences différentes au sein du vecteur. Il y a pourtant peu de différences dans le génome des deux lignées : le facteur de virulence sécrété NS1 ne présente en effet que 3 substitutions non synonymes (R36K, S57T, E139G) parmi 12 sites polymorphes dans la région codante. La production de virus chimères USUV en modifiant un à un ces sites spécifiques, permettrait à l'avenir d'étudier les réponses phénotypiques et transcriptomiques qui en résultent, afin de comprendre comment ces mutations interagissent le génome du moustique, notamment avec les quelques gènes différentiellement exprimés dans la réponse à ces deux lignées.

Concernant l'effet de l'exposition à USUV analysé pour des colonies *Cx. quinquefasciatus* porteuses d'allèles de résistance différents, l'ensemble des résultats préliminaires que j'ai obtenus sont résumés dans le schéma ci-dessous **Figure 16**. Ils suggèrent également que ces adaptations du vecteur ne modifient que peu la réponse globale à USUV. On observe en effet pour tous les allèles *ace-1* étudiés (S, R_1, R_2^3 ou D_1) l'altération de processus similaires entre femelles non-compétentes (i.e. exposées au virus mais sans trace dans la salive) et non exposées, en particulier au niveau de l'immunité et du métabolisme, qui pourrait expliquer le blocage de la dissémination du virus chez ces individus. On n'observe en revanche que peu de différences entre femelles compétentes et non compétentes, suggérant des modifications plus quantitatives que qualitatives dans le succès du contrôle de l'infection par USUV. Enfin, il semble que l'absence d'allèle *ace-1* sensible pourrait perturber le métabolisme des moustiques : nos premiers résultats pourraient en effet aller dans le sens d'une surexpression constitutive de processus métaboliques et immunitaires chez les porteurs de copies exclusivement R (R_1 et R_2^3) par rapport à ceux qui portent au moins une copie S (D_1, et peut-être S). Cette perturbation

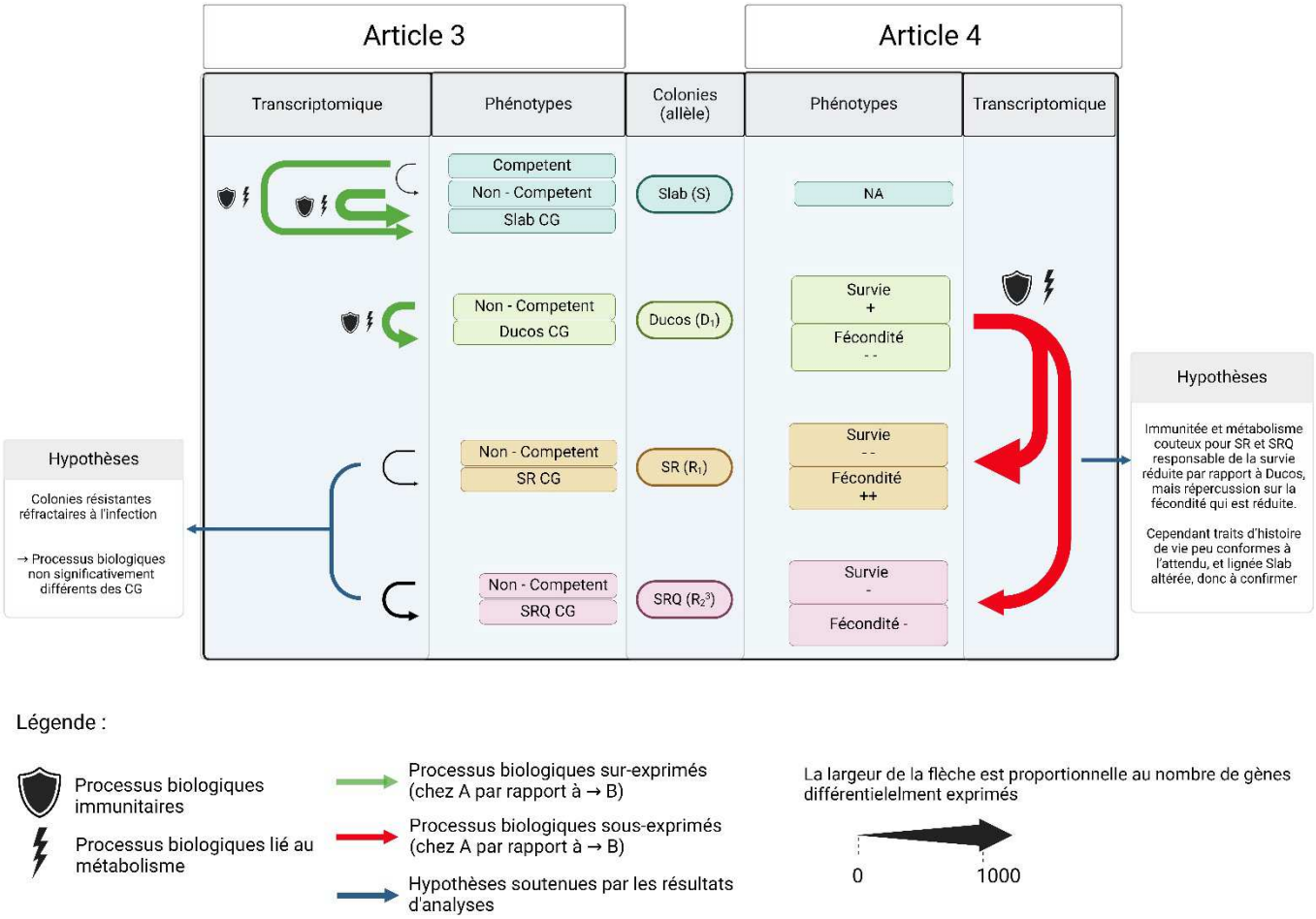
constitutive pourrait expliquer pourquoi les colonies porteuses de ces allèles (SR et SRQ) sont nettement plus réfractaires que les deux autres à l'infection par USUV, avec une compétence vectorielle quasi nulle. Ces différences pourraient aussi participer à expliquer les phénotypes observés sur divers traits d'histoire de vie comme la fécondité et la survie adulte : cette surexpression constitutive pourrait en effet engendrer des coûts énergétiques importants, limitant l'énergie disponible pour le maintien de l'intégrité métabolique et la production de descendants.

Globalement, mes travaux montrent que des facteurs viraux comme des variations génétiques présentes chez les vecteurs peuvent avoir des effets importants sur la dynamique des arbovirus. Ils montent aussi la fertilité des approches transcriptomiques pour explorer l'éventail de mécanismes impliqués dans les diverses réponses des vecteurs à l'exposition au virus. Les approches telles que celles utilisant les GO term, comme j'ai pu utiliser lors de ces études, permettent de manipuler de larges listes de gènes différentiellement exprimés. Le point positif est que cela permet de mettre en valeur de grands processus biologiques impliqués dans les réponses décrites. Un inconvénient vient des transcrits n'ayant pas trouvé d'association avec un GO term lors des Blast sur les bases de données, réduisant malheureusement le nombre de gènes utilisables pour les analyses. Cette approche est exploratoire et limitée par certains aspects techniques mais perfectible. A l'avenir, je prévois de réitérer les associations des transcrits avec les bases de données protéiques à l'aide de Blast moins stringent afin d'augmenter le nombre de gènes annotés dans mon jeu de données.

Ces analyses montrent néanmoins aussi la difficulté de ces approches : j'ai pu voir également ici l'importance de la qualité des données génomiques de référence, mais aussi de la qualité des colonies de moustiques utilisées pour ces infections expérimentales. Entre la difficulté de la mise au point techniques de ces expériences pour avoir un nombre suffisant d'individus à séquencer et la difficulté des analyses transcriptomiques elles-mêmes, j'ai dû me former sur de nombreux points. Mais si je ne peux pour le moment publier ces travaux, c'est essentiellement parce que les colonies elles-mêmes ont présenté des comportements non-conformes avec ceux qu'elles avaient montré jusque-là. Cela va malheureusement nécessiter une répétition de ces expériences, après ré-homogénéisation des colonies, pour être aussi sûrs que possible que l'on compare vraiment ce que l'on veut comparer. Mes travaux n'auront cependant pas été vains, puisque nous avons maintenant tous les outils techniques, les protocoles expérimentaux et les approches bioinformatiques nécessaire pour mener pleinement à bien ces recherches, et dans un temps nettement réduit.

Parmi les autres perspectives futures à explorer pour compléter ces travaux, il me semblerait intéressant d'envisager un séquençage ciblé visant dans un premier temps les petits ARN, impliqués dans les mécanismes immunitaires des arthropodes par la voie des ARN interférents (siRNA), me semble une piste très intéressante. Les voies des siRNA sont les principales réponses antivirales innées dont disposent les vecteurs pour limiter les infections à arbovirus (Blair, 2011). Cibler ces ARN, ainsi que les séquences codantes pour les protéines telles que Ago2 et Dcr2, essentielles à cette voie (Galiana-Arnoux *et al.*, 2006; Poirier *et al.*, 2018; Merkling *et al.*, 2023), me semble une piste très intéressante. Dans un second temps, il pourrait être intéressant aussi de cibler les gènes embarqués dans les zones dupliquées pour explorer précisément leurs niveaux d'expression ainsi que leurs fonctions physiologiques, afin d'explorer leur rôle dans les réponses phénotypiques observées.

Figure 16 : Schéma récapitulatif des résultats phénotypiques et transcriptomiques des expérimentations réalisées sur les colonies *Cx. quinquefasciatus* à fond génétique homogène :



Points clés du chapitre 2 :

- L'infection par deux lignées virales USUV modifie l'expression des gènes de façon globalement très uniforme, et les différences observées semblent plus quantitatives que qualitatives.

- Les allèles S et D_1 qui portent une copie sensible au locus *ace-1* sont associés à l'enrichissement de processus biologiques similaires chez les individus non-compétents, et plus nombreux que pour les allèles R_1 et R_2^3 qui ne portent que des copies mutées.

- Les allèles R_1 et R_2^3 ne présentent qu'un nombre réduit de DEG par rapport à leurs contrôles après une exposition au virus. Cette observation et le fait que leurs porteurs soient très peu compétents suggèrent une faible exposition au virus ou un blocage précoce de l'infection.

- Cette faible compétence associée aux allèles R_1 et R_2^3 pourrait être due à une activation constitutive de divers processus immunitaires et métaboliques, puisque beaucoup d'entre eux semblent sous-exprimés dans les porteurs de l'allèle D_1. Cette activation pourrait aussi entrainer un cout énergétique se traduisant notamment par une réduction de la survie.

- En altérant la compétence vectorielle et la survie, les allèles de résistance pourraient donc altérer la capacité vectorielle, et donc l'épidémiologie des arbovirus.

Comparaison *Cx. pipiens* et *Cx. quinquefasciatus* :

A l'heure actuelle, aucune étude à ma connaissance n'a rapporté de comparaisons directes entre les réponses aux Flavivirus de différentes espèces du complexe *Cx. pipiens*. Suite à nos analyses, nous pouvons tirer de premières observations et comparaisons entre *Cx. quinquefasciatus* et *Cx. p. pipiens* et les liens entre phénotypes et transcriptome[3]. Elles sont particulièrement intéressantes pour comprendre la coévolution entre nos vecteurs et cet arbovirus.

Les individus *Cx. quinquefasciatus* Slab et *Cx. p. pipiens* compétents pour USUV EU3 présentent des TE équivalentes (respectivement 0,22 et 0,25).

Étonnamment, nos données ne montrent pas de similitudes quant aux réponses transcriptomiques de *Cx. p. pipiens* et *Cx. quinquefasciatus*. Par exemple, on trouve peu de DEG, majoritairement sous-exprimés, chez les individus *Cx. p. pipiens* compétents pour USUV EU3 chez (78) alors qu'ils sont nettement plus nombreux (334), et majoritairement sur-exprimés chez *Cx. quinquefasciatus*. Ce ne sont pas non plus les mêmes familles de gènes dont l'expression est altérée par l'exposition à USUV EU3 : on trouve principalement des sérines protéases chez *Cx. quinquefasciatus*, qu'on ne retrouve pas chez *Cx. p. pipiens*.

Ainsi, chez *Cx. p. pipiens,* la lignée USUV EU3 serait capable d'infecter les tissus, de se répliquer efficacement et d'être transmise sans pour autant déclencher une forte régulation différentielle de gènes immunitaires ou métaboliques. Au contraire, chez *Cx. quinquefasciatus*, cette même dynamique virale engendrerait beaucoup plus de modifications de la transcription de nombreux gènes immunitaires et métaboliques, malgré une charge en génomes viraux plus faible, et pour une compétence équivalente.

Certains éléments de la littérature vont aussi dans le sens d'adaptation différentielle des arbovirus aux différentes espèces du complexe. En Amérique du nord, *Cx. pipiens* semble ainsi avoir pour USUV une compétence vectorielle supérieure à *Cx. quinquefasciatus* (Cook *et al.*, 2018), mais avec une lignée virale proche phylogénétiquement des lignées africaines (Bakonyi *et al.*, 2014). En Europe et en Amérique du Nord, *Cx. pipiens* est ainsi le vecteur principal de USUV (Cook *et al.*, 2018; Cadar and Simonin, 2022). Sur le continent africain, le virus a

[3] Attention : Ces comparaisons ne sont faites qu'à titre indicatives, et n'ont pas été testées de manière directe et avec des analyses statistiques associées. Du fait des différentes banques, construites à différents moments et séquencées indépendamment leurs comparaisons ne seront pas faites dans le cadre de cette thèse.

majoritairement été détecté chez *Cx. neavei*, et dans de moindre mesure chez *Cx. quinquefasciatus* (Nikolay *et al.*, 2011). Il pourrait donc être intéressant de réitérer ces infections sur diverses colonies *Cx. quinquefasciatus* et *Cx. p. pipiens* du monde entier, avec divers isolats européens et africains de USUV, pour mieux comprendre les co-adaptations du virus et de ses vecteurs.

En conclusion, on observe un réseau d'interactions complexes entre facteurs génétiques vectoriels et facteurs génétiques viraux, qui semblent façonner les trajectoires de transmission des arbovirus par les vecteurs.

Discussion générale :

Nous voici donc à la fin de ce manuscrit, il est temps pour moi de dresser le bilan de l'ensemble des observations issues de mes travaux et de leurs portées vis-à-vis des objectifs initiaux.

Cette thèse visait globalement à étudier l'influence de la diversité virale et des adaptations (résistance aux insecticides) du vecteur sur la compétence vectorielle et la transmission, depuis l'échelle phénotypique (prévalence et passage dans différents tissus pour le virus, traits d'histoire de vie pour le vecteur) jusqu'à l'exploration des réponses transcriptomiques des vecteurs suite à l'exposition à et à l'infection par le virus.

Le premier objectif, développé dans **l'article 1**, était d'étudier les interactions vecteurs-pathogènes et de voir si les facteurs génétiques viraux influençaient la transmission. Par le biais d'infections expérimentales, j'ai montré des différences de capacités vectorielles de *Cx. pipiens* pour deux lignées USUV, et mis en évidence un compromis virulence-transmission entre les différents hôtes de cet arbovirus au cours de son cycle de transmission. En effet, une lignée virale se répliquant fortement, et étant ainsi délétère pour la survie, chez un hôte vertébré, ne l'est pas nécessairement pour un arthropode vecteur, et inversement. Ces réponses différentes entre le vecteur et l'hôte vertébré sont importantes à considérer, et pourraient influencer/moduler la circulation de certaines lignées. Une lignée qui présente une réplication efficace et une virulence modérée dans les deux compartiments est associée à une probabilité plus forte de s'installer et de circuler, comparé à une lignée fortement virulente pour l'un des compartiments du cycle, qui risque d'interrompre ce cycle par la mort de l'hôte. Les études sur la transmission sont de ce fait difficilement généralisables à l'ensemble des lignées connues pour un virus donné, et il est important de considérer plusieurs lignées dans les futures études de compétence vectorielle. Un exemple marquant de cette prise en compte de la diversité virale est le modèle *Ae. albopictus*-Chikungunya, où les vecteurs possèdent une compétence vectorielle variable en fonctions des lignées (Vazeille et al., 2007).

Des approches de RNA-seq m'ont permis d'identifier quels groupes de gènes, codant principalement pour des processus métaboliques et l'immunité, sont impliqués dans la réponse à l'exposition et/ou sont affectés par l'infection par cet arbovirus chez différentes colonies. Dans la réponse à l'exposition, j'ai pu observer que i) les mêmes processus biologiques et les mêmes gènes semblent impliqués que les individus soient compétents (i.e. avec du virus dans la salive) ou non compétents (i.e. exposés au virus mais sans présence de celui-ci dans la salive), et que ii) il y a très peu de différences dans les réponses aux deux lignées USUV utilisées, malgré leurs

virulences différentes. Ces travaux suggèrent plutôt des différences quantitatives dans la capacité de l'individu exposé à développer une réponse efficace pour bloquer le virus : un individu non compétent serait ainsi plutôt celui qui arrive à éviter la réduction de l'expression de gènes dont les produits pourraient justement inhiber la progression du virus. Des études fonctionnelles complémentaires seront néanmoins nécessaires pour confirmer si la variabilité de la compétence vectorielle est effectivement expliquée principalement par les différences de niveaux d'expression de ces gènes.

Le second objectif, développé dans les **articles 2, 3 et 4**, était d'étudier les effets de la résistance aux insecticides sur la compétence vectorielle et les traits d'histoire de vie des vecteurs. Constatant la forte variabilité des réponses de *Cx. pipiens* à l'infection par USUV, malgré les conditions contrôlées, j'ai alors testé si cette variabilité pouvait être expliquée en partie par la présence de mécanismes de résistance aux insecticides. Pour cela, nous avons génotypé les échantillons issus de ces infections expérimentales sur quatre gènes distincts de résistance et ce pour plusieurs classes d'insecticides. Les résultats montrent que les effets des allèles de résistance sont complexes et hétérogènes, dépendant des allèles/locus considérés et des espèces vectrices étudiées. Par exemple, un allèle du gène *Est* impliqué dans la résistance métabolique augmente le taux d'infection des moustiques ; au contraire, les allèles des locus *vgsc*, *ace-1* et *rdl* impliqués dans la résistance par mutation de cible semblent n'avoir aucun effet observé sur la prévalence. Cependant, tous les allèles de résistance ont eu un impact sur la charge virale, mais dont la magnitude dépend aussi de la lignée virale considérée. Cette étude suggère également que les effets pléiotropes de ces allèles s'additionnent plus qu'ils ne se compensent, leur association affectant donc encore plus la compétence du vecteur. Les résultats de cette seconde étude restent corrélatifs et non causals, mais comme les différents mécanismes de résistance aux insecticides sont relativement fréquents dans les populations naturelles, beaucoup de vecteurs pourraient être effectivement porteurs de plusieurs allèles de différents locus, ce qui pourrait avoir un impact sur la circulation du virus dans ces populations. Il serait donc très intéressant de vérifier sur le terrain, au cours d'une épidémie, si on retrouve une prévalence d'infection plus élevée chez les individus porteurs de résistances multiples dans les populations où le virus circule. Cela permettrait par exemple de préciser les zones à risque plus élevées de transmission en lien avec la résistance pour mieux surveiller et prévenir la circulation de cet arbovirus.

Lors de mes infections au laboratoire, j'ai pu aussi montrer que même pour un locus donné, ici *ace-1*, différents allèles de résistance pouvaient avoir des impacts différents sur la transmission

des arbovirus. En particulier, si toutes les colonies porteuses d'un allèle de résistance sont nettement moins compétentes pour USUV que la colonie sensible, les allèles ne présentant que des copies R (R_1 et R_2^3) semblent encore plus, voire totalement, réfractaires que quand une copie S est présente (D_1). En outre, ces différents allèles de résistance n'engendrent pas non plus les mêmes impacts sur la survie et la fécondité de leur porteur : en effet les allèles comprenant des copies S semblent aussi conférer une plus grande longévité que ceux qui n'ont que des copies R (en une ou plusieurs copies), ce qui pourrait là-aussi avoir un impact significatif sur l'épidémiologie du virus. En effet, depuis de nombreuses années, les études concernant les agents pathogènes à transmission vectorielle ont tendance à se focaliser sur la compétence vectorielle (peut-être par facilité expérimental), mais ce n'est qu'un des paramètres de la capacité vectorielle (voir Equation 1 en introduction). En particulier, la survie des vecteurs a proportionnellement un effet d'un ordre de grandeur supérieur à celui de la compétence vectorielle, de petites variations de survie pouvant entrainer de grandes conséquences sur la capacité vectorielle (Table 1). Ainsi, les individus porteurs de l'allèle D_1, bien que peu compétents par rapport aux sensibles, seraient non seulement plus compétents, mais surtout leur plus grande survie en ferait des vecteurs avec une capacité vectorielle nettement plus forte que les individus porteurs des allèles R_1 et R_2^3 (réfractaires et/ou à durée de survie réduite). Cela suggère que la résistance elle-même n'a pas un effet univoque favorisant la transmission comme on le pense encore trop souvent, mais pourrait même la bloquer, au moins partiellement, pour certains allèles. A plus large échelle, ceci peut avoir des conséquences importantes sur l'épidémiologie de ces arbovirus, et il sera également nécessaire de mener des études sur le terrain, en mesurant la fréquence de ces différents allèles de résistance, pour confirmer leur impact sur la circulation virale en populations naturelles.

Malgré des difficultés expérimentales liées à l'état des colonies qui empêchent une conclusion relativement sûr et définitive, on observe que de nombreux gènes associés à des processus métaboliques et immunitaires sont sous-exprimés dans la colonie porteuse de D_1 par rapport aux colonies porteuses de R_1 et R_2^3 en conditions contrôles; en revanche, on observe une surexpression de ces gènes lors de l'exposition au virus pour la première colonie, alors que peu de changements sont observés dans les transcriptomes des deux dernières colonies. Ainsi, s'il nous manque la comparaison avec la colonie sensible, ces observations sont concordantes avec l'idée d'une stimulation constitutionnelle plus élevée (et couteuse) pour des individus sans copie sensible, alors que chez ceux possédant une telle copie S la réponse au virus est induite par l'exposition. La perte de compétence des colonies SR et SRQ semblent donc présente dès les

premières étapes, à savoir l'infection de l'intestin, alors que la colonie Ducos doit, comme la colonie sensible, monter une réponse plus complexe à l'infection.

L'ensemble de ces résultats restent exploratoires et balaye des processus biologiques larges. Ils doivent en outre être répliqués avec des colonies plus directement comparable (ré-introgressées sur la même souche sensible de référence). Néanmoins, ils sont une première base pour définir des cibles génétiques potentielles pour comprendre l'impact de la résistance sur la compétence et la capacité vectorielle de ces colonies. Enfin, comme évoqué dans la conclusion du chapitre 2, il sera pertinent à l'avenir de cibler le séquençage sur i) des gènes candidats précis, et ii) des petits ARN impliqués dans des voies métaboliques précises, comme ceux de l'immunité innée des arthropodes, la voie des ARN interférents (Prasad *et al.*, 2013b).

Des expérimentations en laboratoire vers le risque vectoriel lié à la résistance :

Pour mener à l'émergence d'un agent pathogène, plusieurs critères sont à considérer : i) la susceptibilité des hôtes vertébrés pour l'agent pathogène, ii) le spectre d'hôtes (les vecteurs et les hôtes vertébrés du vecteur) de l'agent pathogène, et iii) la compétence vectorielle des vecteurs locaux pour l'agent pathogène. Dans le cas d'USUV et WNV, i) les données de la littérature nous montrent qu'il existe une préférence d'hôte pour les deux virus, les espèces aviaires, qu'ils sont capables d'infecter plus facilement; ii) à travers les expérimentations réalisées au laboratoire et les campagnes de prophylaxie sur le terrain, il a été démontré qu'il existe un large spectre d'espèces vectrices, mais aussi d'hôtes vertébrés, capables d'être infectés par le virus, et j'ai pu montrer (**article 1;** (Prat *et al.*, 2024), que l'agent pathogène présente des génotypes viraux avec des trade-offs d'adaptation aux vecteurs et aux hôtes vertébrés, comme décrit dans l'étude de Clé *et al.* (2021); enfin iii) j'ai montré que des facteurs génétiques des vecteurs, ici la résistance aux insecticides, pouvaient modifier leur compétence et leur capacité vectorielles (**articles 2**, **3** et **4)**.

Il est ainsi possible de proposer des hypothèses quant à l'impact de la résistance aux insecticides chez *Cx. pipiens* sur l'émergence et la circulation des deux arbovirus USUV et WNV, c'est à dire le risque vectoriel (Fontenille *et al.*, 2009). Ce risque se défini comme la probabilité d'avoir une transmission d'un agent pathogène par un vecteur dans un milieu donné. Il est composé de trois notions : le « danger », la « vulnérabilité » et « l'exposition » (Fontenille *et al.*, 2009).

Le danger prend en compte la diversité et la prévalence des agents pathogènes présents chez les vecteurs dans un espace et un temps donné. Pour WNV et USUV, il existe une diversité de génotypes viraux à l'échelle mondiale, avec huit lignées USUV et neuf lignées WNV, mais qui restent peu prévalentes dans les populations naturelles de vecteurs collectées sur le terrain (Exemple en France : COVARS Octobre 2023 ; Constant *et al.*, 2022). Le danger semble donc faible pour WVN et USUV. Néanmoins, ce danger n'est plus majoritairement lié aux introductions des virus par des oiseaux migrateurs en France (Constant *et al.*, 2022): ces virus endémisés en Europe, et le danger semble avoir augmenté ces dernières années pour les animaux et pour les humains, avec une recrudescence des cas (ECDC).

La vulnérabilité est la probabilité qu'un hôte soit infecté suite au contact avec l'agent pathogène. En France, il existe un large spectre d'hôtes vulnérables aux virus WNV et USUV, mammifères (dont humains), oiseaux, ou invertébrés, démontré par des données de séroprévalence entre autres.

Enfin, l'« exposition » est la probabilité d'un contact entre un hôte et les vecteurs infectants. *Cx. pipiens* est un complexe d'espèces dont les représentants sont mondialement répartis. L'exposition des populations humaines est donc relativement importante, malgré le caractère plutôt ornithophile de *Cx. pipiens*. Pour réduire l'exposition, les premières mesures ont consisté et consistent toujours à diminuer la densité des vecteurs via la lutte antivectorielle, principalement grâce à des insecticides. Cette exposition à un vecteur infectant est aussi modulée par la compétence et la capacité vectorielle. Or j'ai pu montrer que l'adaptation à ces insecticides pouvait modifier cette compétence et cette capacité vectorielle pour les arbovirus, ce qui est cohérent avec d'autres études publiées (Juache-Villagrana *et al.*, 2022). Toutefois ces modifications sont loin d'être uniformes et unidirectionnelles, mais au contraire multiples et complexes !

Il apparait donc à l'issue de ces travaux que la résistance aux insecticides modifie probablement le risque vectoriel associé à WNV et USUV, mais il n'est pas évident qu'elle augmente ce risque. Au contraire, elle pourrait même le diminuer en rendant les individus qui la portent moins compétents au virus, et, en réduisant la survie, moins capables de transmettre ces virus. A l'échelle globale, ces facteurs pourraient avoir des impacts importants sur l'épidémiologie de ces agents pathogènes. Ces travaux soulignent donc la nécessité de considérer la complexité des interactions entre résistance et transmission, et donc de poursuivre l'effort de recherche dans ce domaine.

Dans un futur proche, étudier les effets de la résistance sur l'évolution virale

Une piste de recherche que je n'ai pas eu le temps d'étudier au cours de ma thèse, mais qui me semble très intéressante, est de celle de l'étude des effets de la résistance sur les essaims viraux d'une même espèce virus. Durant ma thèse, je me suis focalisé sur la transmission de deux virus d'intérêt en les considérant comme des « entités uniques ». Or, les Flavivirus sont des virus à ARN dont le taux de mutation est élevé, et ils sont donc présents au sein d'un hôte sous la forme d'un mélange génétiquement hétérogène de variants viraux. Ce spectre de variants viraux, dont les séquences génomiques sont proches d'une séquence consensus, est appelé « essaim viral » (Eigen, 1993; Domingo, 1998; Biebricher and Eigen, 2006). C'est donc bien un échantillon de l'essaim viral présent chez l'hôte vertébré qui est ingéré lors du repas sanguin: il a été observé que les moustiques transmettent un « essaim unique » de virions à chaque repas sanguin, la composition de l'inoculum variant même au cours de repas sanguins multiples (Grubaugh et al., 2017).

Ces variants sont par la suite exposés à de nombreux mécanismes immunitaires et barrières à l'infection qui exercent sur eux une pression de sélection : chez des moustiques infectés par WNV, il a ainsi été montré que les essaims viraux sont soumis à de nombreuses sélections diversifiantes, mais aussi à des goulots d'étranglement (Grubaugh and Ebel, 2016).

Les barrières structurelles et immunitaires des tissus peuvent ainsi moduler le nombre et la diversité de l'essaim viral (Grubaugh et al., 2016). Les mécanismes impliqués dans la modulation de la diversité des essaims viraux ne sont pas encore précisément caractérisés. Toutefois, Brackney et al. (2009) suggèrent que les voies immunitaires, notamment les ARNi (ARN interférent), pourrait être impliquées dans le cas de WNV. En passant à travers les différentes barrières, les goulots d'étranglement peuvent parfois mener à l'extinction du virus au sein de son vecteur (Chao, 1990; Duarte *et al.,* 1992) (Xiao *et al*., 2016). Mais la réduction n'est pas forcément aléatoire et peut favoriser les variants les plus adaptés au vecteur, dont la fréquence va ainsi augmenter.

Ces modifications de la population virale circulant dans les populations de vecteurs peuvent aussi affecter l'épidémiologie des virus. Il serait donc intéressant d'étudier si la résistance aux insecticides a un effet sur l'essaim viral au sein des vecteurs et sur la diversité de l'inoculum qu'ils transmettent. Ces questions ont fait l'objet de plusieurs mises au point de protocoles au laboratoire permettant d'y répondre, je l'espère, dans un futur proche.

Conclusion générale :

Les travaux réalisés durant ces trois années de thèse s'inscrivent dans une histoire de recherche antérieure bien plus vaste. Une histoire initiée lors de la découverte de ces allèles de résistance et qui s'est développée par la caractérisation de leur dynamique dans les populations de moustiques, la mise en évidence de leurs effets biochimiques et physiologiques, et la description de leurs architectures génomiques. Ces travaux viennent marquer une nouvelle étape en les inscrivant dans un contexte épidémiologique d'arbovirus émergents. Ils permettront, je l'espère, d'avoir une compréhension plus complète des éléments à prendre en considération dans la mise au point des stratégies de lutte antivectorielle, notamment pour prévenir ou limiter de futures épidémies.

Références :

Aardema, M. L., Olatunji, S. K. and Fonseca, D. M. (2022). The Enigmatic Culex pipiens (Diptera: Culicidae) Species Complex: Phylogenetic Challenges and Opportunities From a Notoriously Tricky Mosquito Group. *Annals of the Entomological Society of America* **115**, 95–104. doi: 10.1093/aesa/saab038.

Abbo, S. R., Visser, T. M., Koenraadt, C. J. M., Pijlman, G. P. and Wang, H. (2021). Effect of blood source on vector competence of Culex pipiens biotypes for Usutu virus. *Parasites & Vectors* **14**, 194. doi: 10.1186/s13071-021-04686-6.

Adrian Alexa, J. R. (2017). topGO. doi: 10.18129/B9.BIOC.TOPGO.

Agnew, P., Berticat, C., Bedhomme, S., Sidobre, C. and Michalakis, Y. (2004). Parasitism increases and decreases the costs of insecticide resistance in mosquitoes. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* **58**, 579–586.

Alizon, S. and van Baalen, M. (2008). Transmission–virulence trade-offs in vector-borne diseases. *Theoretical Population Biology* **74**, 6–15. doi: 10.1016/j.tpb.2008.04.003.

Alizon, S., Hurford, A., Mideo, N. and Van Baalen, M. (2009). Virulence evolution and the trade-off hypothesis: history, current state of affairs and the future. *Journal of Evolutionary Biology* **22**, 245–259. doi: 10.1111/j.1420-9101.2008.01658.x.

Allison, A. B., Mead, D. G., Gibbs, S. E. J., Hoffman, D. M. and Stallknecht, D. E. (2004). West Nile Virus Viremia in Wild Rock Pigeons. *Emerging Infectious Diseases* **10**, 2252–2255. doi: 10.3201/eid1012.040511.

Almire, F., Terhzaz, S., Terry, S., McFarlane, M., Gestuveo, R. J., Szemiel, A. M., Varjak, M., McDonald, A., Kohl, A. and Pondeville, E. (2021). Sugar feeding protects against arboviral infection by enhancing gut immunity in the mosquito vector Aedes aegypti. *PLoS Pathogens* **17**, e1009870. doi: 10.1371/journal.ppat.1009870.

Alout, H., Djogbénou, L., Berticat, C., Chandre, F. and Weill, M. (2008). Comparison of *Anopheles gambiae* and *Culex pipiens* acetycholinesterase 1 biochemical properties. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology* **150**, 271–277. doi: 10.1016/j.cbpb.2008.03.008.

Alout, H., Ndam, N. T., Sandeu, M. M., Djégbe, I., Chandre, F., Dabiré, R. K., Djogbénou, L. S., Corbel, V. and Cohuet, A. (2013). Insecticide Resistance Alleles Affect Vector Competence of Anopheles gambiae s.s. for Plasmodium falciparum Field Isolates. *PLOS ONE* **8**, e63849. doi: 10.1371/journal.pone.0063849.

Alout, H., Dabiré, R. K., Djogbénou, L. S., Abate, L., Corbel, V., Chandre, F. and Cohuet, A. (2016). Interactive cost of Plasmodium infection and insecticide resistance in the malaria vector Anopheles gambiae. *Scientific Reports* **6**, 29755. doi: 10.1038/srep29755.

Alves-Carvalho, S., Gazengel, K., Bretaudeau, A., Robin, S., Daval, S. and Legeai, F. (2021). AskoR, A R Package for Easy RNASeq Data Analysis. In *Proceedings of The 1st International Electronic Conference on Entomology*, p. 10646. MDPI, Sciforum.net doi: 10.3390/IECE-10646.

Anderson, R. M. and May, R. M. (1982). Coevolution of hosts and parasites. *Parasitology* **85**, 411–426. doi: 10.1017/S0031182000055360.

Andrea Rau, C. M.-R. (2017). coseq. doi: 10.18129/B9.BIOC.COSEQ.

Angeloni, G., Bertola, M., Lazzaro, E., Morini, M., Masi, G., Sinigaglia, A., Trevisan, M., Gossner, C. M., Haussig, J. M., Bakonyi, T., Capelli, G. and Barzon, L. (2023). Epidemiology, surveillance and diagnosis of Usutu virus infection in the EU/EEA, 2012 to 2021. *Eurosurveillance* **28**,. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2023.28.33.2200929.

Arich, S., Haba, Y., Assaid, N., Fritz, M. L., McBride, C. S., Weill, M., Taki, H., Sarih, M. and Labbé, P. (2022). No association between habitat, autogeny and genetics in Moroccan Culex pipiens populations. *Parasites & Vectors* **15**, 405. doi: 10.1186/s13071-022-05469-3.

Assogba, B. S., Djogbénou, L. S., Saizonou, J., Milesi, P., Djossou, L., Djegbe, I., Oumbouke, W. A., Chandre, F., Baba-Moussa, L., Weill, M. and Makoutodé, M. (2014). Phenotypic effects of concomitant insensitive acetylcholinesterase (ace-1R) and knockdown resistance (kdrR) in Anopheles gambiae: a hindrance for insecticide resistance management for malaria vector control. *Parasites & Vectors* **7**, 548. doi: 10.1186/s13071-014-0548-9.

Assogba, B. S., Djogbénou, L. S., Milesi, P., Berthomieu, A., Perez, J., Ayala, D., Chandre, F., Makoutodé, M., Labbé, P. and Weill, M. (2015). An ace-1 gene duplication resorbs the fitness cost associated with resistance in Anopheles gambiae, the main malaria mosquito. *Scientific Reports* **5**, 14529. doi: 10.1038/srep14529.

Assogba, B. S., Milesi, P., Djogbénou, L. S., Berthomieu, A., Makoundou, P., Baba-Moussa, L. S., Fiston-Lavier, A.-S., Belkhir, K., Labbé, P. and Weill, M. (2016a). The ace-1 Locus Is Amplified in All Resistant Anopheles gambiae Mosquitoes: Fitness Consequences of Homogeneous and Heterogeneous Duplications. *PLoS Biology* **14**, e2000618. doi: 10.1371/journal.pbio.2000618.

Assogba, B. S., Milesi, P., Djogbénou, L. S., Berthomieu, A., Makoundou, P., Baba-Moussa, L. S., Fiston-Lavier, A.-S., Belkhir, K., Labbé, P. and Weill, M. (2016b). The ace-1 Locus Is Amplified in All Resistant Anopheles gambiae Mosquitoes: Fitness Consequences of Homogeneous and Heterogeneous Duplications. *PLOS Biology* **14**, e2000618. doi: 10.1371/journal.pbio.2000618.

Assogba, B. S., Milesi, P., Djogbénou, L. S., Berthomieu, A., Makoundou, P., Baba-Moussa, L. S., Fiston-Lavier, A.-S., Belkhir, K., Labbé, P. and Weill, M. (2016c). The ace-1 Locus Is Amplified in All Resistant Anopheles gambiae Mosquitoes: Fitness Consequences of Homogeneous and Heterogeneous Duplications. *PLOS Biology* **14**, e2000618. doi: 10.1371/journal.pbio.2000618.

Atyame, C. M., Alout, H., Mousson, L., Vazeille, M., Diallo, M., Weill, M. and Failloux, A.-B. (2019). Insecticide resistance genes affect Culex quinquefasciatus vector competence for West Nile virus. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **286**, 20182273. doi: 10.1098/rspb.2018.2273.

Bahuon, C., Marcillaud-Pitel, C., Bournez, L., Leblond, A., Beck, C., Hars, J., Leparc-Goffart, I., L'Ambert, G., Paty, M.-C., Cavalerie, L., Daix, C., Tritz, P., Durand, B., Zientara, S. and Lecollinet, S. (2016). West Nile virus epizootics in the Camargue (France)

in 2015 and reinforcement of surveillance and control networks. *Revue Scientifique Et Technique (International Office of Epizootics)* **35**, 811–824. doi: 10.20506/rst.35.3.2571.

Bakonyi, T., Gould, E. A., Kolodziejek, J., Weissenböck, H. and Nowotny, N. (2004). Complete genome analysis and molecular characterization of *Usutu virus* that emerged in Austria in 2001. *Virology* **328**, 301–310. doi: 10.1016/j.virol.2004.08.005.

Bakonyi, T., Busquets, N. and Nowotny, N. (2014). Comparison of complete genome sequences of Usutu virus strains detected in Spain, Central Europe, and Africa. *Vector Borne and Zoonotic Diseases (Larchmont, N.Y.)* **14**, 324–329. doi: 10.1089/vbz.2013.1510.

Balabanidou, V., Grigoraki, L. and Vontas, J. (2018). Insect cuticle: a critical determinant of insecticide resistance. *Current Opinion in Insect Science* **27**, 68–74. doi: 10.1016/j.cois.2018.03.001.

Bardos, V., Adamcova, J., Dedei, S., Gjini, N., Rosicky, B. and Simkova, A. (1959). Neutralizing antibodies against some neurotropic viruses determined in human sera in Albania. *Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology* **3**, 277–282.

Bażanów, B., Jansen van Vuren, P., Szymański, P., Stygar, D., Frącka, A., Twardoń, J., Kozdrowski, R. and Pawęska, J. T. (2018). A Survey on West Nile and Usutu Viruses in Horses and Birds in Poland. *Viruses* **10**, 87. doi: 10.3390/v10020087.

Becker, N., Jöst, A. and Weitzel, T. (2012). The Culex pipiens Complex in Europe. *Journal of the American Mosquito Control Association* **28**, 53–67. doi: 10.2987/8756-971X-28.4s.53.

Ben Hassine, T., De Massis, F., Calistri, P., Savini, G., BelHaj Mohamed, B., Ranen, A., Di Gennaro, A., Sghaier, S. and Hammami, S. (2014). First detection of co-circulation of West Nile and Usutu viruses in equids in the south-west of Tunisia. *Transboundary and Emerging Diseases* **61**, 385–389. doi: 10.1111/tbed.12259.

Benoit, J. B., Lopez-Martinez, G., Phillips, Z. P., Patrick, K. R. and Denlinger, D. L. (2010). Heat shock proteins contribute to mosquito dehydration tolerance. *Journal of insect physiology* **56**, 151–156. doi: 10.1016/j.jinsphys.2009.09.012.

Berticat, C., Dubois, M.-P., Marquine, M., Chevillon, C. and Raymond, M. (2000). A molecular test to identify resistance alleles at the amplified esterase locus in the mosquito Culex pipiens. *Pest Management Science* **56**, 727–731. doi: 10.1002/1526-4998(200009)56:9<727::AID-PS214>3.0.CO;2-I.

Berticat, C., Boquien, G., Raymond, M. and Chevillon, C. (2002). Insecticide resistance genes induce a mating competition cost in Culex pipiens mosquitoes. *Genetics Research* **79**, 41–47. doi: 10.1017/S001667230100547X.

Berticat, C., Bonnet, J., Duchon, S., Agnew, P., Weill, M. and Corbel, V. (2008). Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for Culex quinquefasciatus mosquitoes. *BMC Evolutionary Biology* **8**, 104. doi: 10/cbfqwz.

Biebricher, C. K. and Eigen, M. (2006). What Is a Quasispecies? In *Quasispecies: Concept and Implications for Virology* (ed. Domingo, E.), pp. 1–31. Springer, Berlin, Heidelberg doi: 10.1007/3-540-26397-7_1.

Blair, C. D. (2011). Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission. *Future Microbiology* **6**, 265–277. doi: 10.2217/fmb.11.11.

Bolling, B. G., Vasilakis, N., Guzman, H., Widen, S. G., Wood, T. G., Popov, V. L., Thangamani, S. and Tesh, R. B. (2015). Insect-Specific Viruses Detected in Laboratory Mosquito Colonies and Their Potential Implications for Experiments Evaluating Arbovirus Vector Competence. doi: 10.4269/ajtmh.14-0330.

Bourguet, D., Raymond, M., Bisset, J., Pasteur, N. and Arpagaus, M. (1996). Duplication of the Ace.1 locus in Culex pipiens mosquitoes from the Caribbean. *Biochemical Genetics* **34**, 351–362. doi: 10.1007/BF00554410.

Brackney, D. E., Beane, J. E. and Ebel, G. D. (2009). RNAi Targeting of West Nile Virus in Mosquito Midguts Promotes Virus Diversification. *PLOS Pathogens* **5**, e1000502. doi: 10.1371/journal.ppat.1000502.

Bradshaw, W. E., Burkhart, J., Colbourne, J. K., Borowczak, R., Lopez, J., Denlinger, D. L., Reynolds, J. A., Pfrender, M. E. and Holzapfel, C. M. (2018). Evolutionary transition from blood feeding to obligate nonbiting in a mosquito. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, 1009–1014. doi: 10.1073/pnas.1717502115.

Bronkhorst, A. W. and van Rij, R. P. (2014). The long and short of antiviral defense: small RNA-based immunity in insects. *Current Opinion in Virology* **7**, 19–28. doi: 10.1016/j.coviro.2014.03.010.

Cadar, D. and Simonin, Y. (2022). Human Usutu Virus Infections in Europe: A New Risk on Horizon? *Viruses* **15**, 77. doi: 10.3390/v15010077.

Cadar, D., Becker, N., Campos, R. de M., Börstler, J., Jöst, H. and Schmidt-Chanasit, J. (2014). Usutu virus in bats, Germany, 2013. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 1771–1773. doi: 10.3201/eid2010.140909.

Caragata, E. P., Dutra, H. L. C. and Moreira, L. A. (2016). Exploiting Intimate Relationships: Controlling Mosquito-Transmitted Disease with Wolbachia. *Trends in Parasitology* **32**, 207–218. doi: 10.1016/j.pt.2015.10.011.

Carrington, L. B., Armijos, M. V., Lambrechts, L., Barker, C. M. and Scott, T. W. (2013a). Effects of Fluctuating Daily Temperatures at Critical Thermal Extremes on Aedes aegypti Life-History Traits. *PLOS ONE* **8**, e58824. doi: 10.1371/journal.pone.0058824.

Carrington, L. B., Seifert, S. N., Armijos, M. V., Lambrechts, L. and Scott, T. W. (2013b). Reduction of Aedes aegypti Vector Competence for Dengue Virus under Large Temperature Fluctuations. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **88**, 689–697. doi: 10.4269/ajtmh.12-0488.

Cavrini, F., Gaibani, P., Longo, G., Pierro, A. M., Rossini, G., Bonilauri, P., Gerunda, G. E., Benedetto, F. D., Pasetto, A., Girardis, M., Dottori, M., Landini, M. P. and Sambri, V. (2009). Usutu virus infection in a patient who underwent orthotropic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Eurosurveillance* **14**, 19448. doi: 10.2807/ese.14.50.19448-en.

CDC (2024). West Nile: Symptoms, Diagnosis, & Treatment. *West Nile Virus*.

Champer, J., Buchman, A. and Akbari, O. S. (2016). Cheating evolution: engineering gene drives to manipulate the fate of wild populations. *Nature Reviews. Genetics* **17**, 146–159. doi: 10.1038/nrg.2015.34.

Chandra, G., Bhattacharjee, I., Chatterjee, S. N. and Ghosh, A. (2008). Mosquito control by larvivorous fish. *The Indian Journal of Medical Research* **127**, 13–27.

Chao, L. (1990). Fitness of RNA virus decreased by Muller's ratchet. *Nature* **348**, 454–455. doi: 10.1038/348454a0.

Ciota, A. T. and Kramer, L. D. (2010). Insights into Arbovirus Evolution and Adaptation from Experimental Studies. *Viruses* **2**, 2594–2617. doi: 10.3390/v2122594.

Clé, M., Constant, O., Barthelemy, J., Desmetz, C., Martin, M. F., Lapeyre, L., Cadar, D., Savini, G., Teodori, L., Monaco, F., Schmidt-Chanasit, J., Saiz, J.-C., Gonzales, G., Lecollinet, S., Beck, C., Gosselet, F., Van de Perre, P., Foulongne, V., Salinas, S. and Simonin, Y. (2021). Differential neurovirulence of Usutu virus lineages in mice and neuronal cells. *Journal of Neuroinflammation* **18**, 11. doi: 10.1186/s12974-020-02060-4.

Clements, A. N. (1992). *The Biology of Mosquitoes, Volume 1: Development, Nutrition and Reproduction*, 1st Edn. CABI, GB doi: 10.1079/9780851993744.0000.

Conesa, A., Götz, S., García-Gómez, J. M., Terol, J., Talón, M. and Robles, M. (2005). Blast2GO: a universal tool for annotation, visualization and analysis in functional genomics research. *Bioinformatics* **21**, 3674–3676. doi: 10.1093/bioinformatics/bti610.

Constant, O., Gil, P., Barthelemy, J., Bolloré, K., Foulongne, V., Desmetz, C., Leblond, A., Desjardins, I., Pradier, S., Joulié, A., Sandoz, A., Amaral, R., Boisseau, M., Rakotoarivony, I., Baldet, T., Marie, A., Frances, B., Reboul Salze, F., Tinto, B., van de Perre, P., Salinas, S., Beck, C., Lecolinet, S., Gutierrez, S. and Simonin, Y. (2022). One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses: a repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020. *Eurosurveillance* **27**, 2200068. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2022.27.25.2200068.

Cook, C. L., Huang, Y.-J. S., Lyons, A. C., Alto, B. W., Unlu, I., Higgs, S. and Vanlandingham, D. L. (2018). North American Culex pipiens and Culex quinquefasciatus are competent vectors for Usutu virus. *PLoS neglected tropical diseases* **12**, e0006732. doi: 10.1371/journal.pntd.0006732.

Cornel, A. J., McAbee, R. D., Rasgon, J., Stanich, M. A., Scott, T. W. and Coetzee, M. (2003). Differences in extent of genetic introgression between sympatric Culex pipiens and Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) in California and South Africa. *Journal of Medical Entomology* **40**, 36–51. doi: 10.1603/0022-2585-40.1.36.

DAO, A., KASSOGUE, Y., ADAMOU, A., DIALLO, M., YARO, A. S., TRAORE, S. F. and LEHMANN, T. (2010). Reproduction-Longevity Trade-Off in Anopheles gambiae (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology* **47**, 769–777.

Das, M. K. and Prasad, R. N. (1991). Evaluation of mosquito fish Gambusia affinis in the control of mosquito breeding in rice fields. *Indian Journal of Malariology* **28**, 171–177.

David, J.-P., Ismail, H. M., Chandor-Proust, A. and Paine, M. J. I. (2013). Role of cytochrome P450s in insecticide resistance: impact on the control of mosquito-borne diseases and use of insecticides on Earth. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **368**, 20120429. doi: 10.1098/rstb.2012.0429.

De Angeli Dutra, D., Poulin, R. and Ferreira, F. C. (2022). Evolutionary consequences of vector-borne transmission: how using vectors shapes host, vector and pathogen evolution. *Parasitology* **149**, 1667–1678. doi: 10.1017/S0031182022001378.

DeLeo, D. M., Pérez-Moreno, J. L., Vázquez-Miranda, H. and Bracken-Grissom, H. D. (2018). RNA profile diversity across arthropoda: guidelines, methodological artifacts, and expected outcomes. *Biology Methods & Protocols* **3**, bpy012. doi: 10.1093/biomethods/bpy012.

Després, L., David, J.-P. and Gallet, C. (2007). The evolutionary ecology of insect resistance to plant chemicals. *Trends in Ecology & Evolution* **22**, 298–307. doi: 10.1016/j.tree.2007.02.010.

Di Giallonardo, F., Geoghegan, J. L., Docherty, D. E., McLean, R. G., Zody, M. C., Qu, J., Yang, X., Birren, B. W., Malboeuf, C. M., Newman, R. M., Ip, H. S. and Holmes, E. C. (2015). Fluid Spatial Dynamics of West Nile Virus in the United States: Rapid Spread in a Permissive Host Environment. *Journal of Virology* **90**, 862–872. doi: 10.1128/jvi.02305-15.

Diagne, M. M., Ndione, M. H. D., Di Paola, N., Fall, G., Bedekelabou, A. P., Sembène, P. M., Faye, O., Zanotto, P. M. de A. and Sall, A. A. (2019). Usutu Virus Isolated from Rodents in Senegal. *Viruses* **11**, 181. doi: 10.3390/v11020181.

Djegbe, I., Cornelie, S., Rossignol, M., Demettre, E., Seveno, M., Remoue, F. and Corbel, V. (2011). Differential Expression of Salivary Proteins between Susceptible and Insecticide-Resistant Mosquitoes of Culex quinquefasciatus. *PLoS ONE* **6**, e17496. doi: 10.1371/journal.pone.0017496.

Djogbénou, L., Labbé, P., Chandre, F., Pasteur, N. and Weill, M. (2009). Ace-1 duplication in Anopheles gambiae: a challenge for malaria control. *Malaria Journal* **8**, 70. doi: 10.1186/1475-2875-8-70.

Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M. and Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21. doi: 10.1093/bioinformatics/bts635.

Dohm, D. J., O'Guinn, M. L. and Turell, M. J. (2002). Effect of Environmental Temperature on the Ability of Culex pipiens (Diptera: Culicidae) to Transmit West Nile Virus. *Journal of Medical Entomology* **39**, 221–225. doi: 10.1603/0022-2585-39.1.221.

Domingo, E. (1998). Quasispecies and the implications for virus persistence and escape. *Clinical and Diagnostic Virology* **10**, 97–101. doi: 10.1016/s0928-0197(98)00032-4.

Duarte, E., Clarke, D., Moya, A., Domingo, E. and Holland, J. (1992). Rapid fitness losses in mammalian RNA virus clones due to Muller's ratchet. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 6015–6019. doi: 10.1073/pnas.89.13.6015.

Duchateau, T., Morvan, C. and Steffan, F. (2020). La sécrétion de vésicules extracellulaires par les plaquettes activées à l'origine de la létalité de la dengue ? *médecine/sciences* **36**, 1088–1090. doi: 10.1051/medsci/2020218.

Dumas, E., Atyame, C. M., Malcolm, C. A., Le Goff, G., Unal, S., Makoundou, P., Pasteur, N., Weill, M. and Duron, O. (2016). Molecular data reveal a cryptic species within the Culex pipiens mosquito complex. *Insect Molecular Biology* **25**, 800–809. doi: 10.1111/imb.12264.

Durand, B., Haskouri, H., Lowenski, S., Vachiery, N., Beck, C. and Lecollinet, S. (2016). Seroprevalence of West Nile and Usutu viruses in military working horses and dogs, Morocco, 2012: dog as an alternative WNV sentinel species? *Epidemiology and Infection* **144**, 1857–1864. doi: 10.1017/S095026881600011X.

Eigen, M. (1993). Viral quasispecies. *Scientific American* **269**, 42–49. doi: 10.1038/scientificamerican0793-42.

Engel, D., Jöst, H., Wink, M., Börstler, J., Bosch, S., Garigliany, M.-M., Jöst, A., Czajka, C., Lühken, R., Ziegler, U., Groschup, M. H., Pfeffer, M., Becker, N., Cadar, D. and Schmidt-Chanasit, J. (2016). Reconstruction of the Evolutionary History and Dispersal of Usutu Virus, a Neglected Emerging Arbovirus in Europe and Africa. *mBio* **7**, e01938-01915. doi: 10.1128/mBio.01938-15.

Epidemiological update: West Nile virus transmission season in Europe, 2023 (2024).

Escribano-Romero, E., Lupulović, D., Merino-Ramos, T., Blázquez, A.-B., Lazić, G., Lazić, S., Saiz, J.-C. and Petrović, T. (2015). West Nile virus serosurveillance in pigs, wild boars, and roe deer in Serbia. *Veterinary Microbiology* **176**, 365–369. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.02.005.

Farajollahi, A., Fonseca, D. M., Kramer, L. D. and Marm Kilpatrick, A. (2011). "Bird biting" mosquitoes and human disease: A review of the role of *Culex pipiens* complex mosquitoes in epidemiology. *Infection, Genetics and Evolution* **11**, 1577–1585. doi: 10.1016/j.meegid.2011.08.013.

Farfán-Ale, J. A., Blitvich, B. J., Marlenee, N. L., Loroño-Pino, M. A., Puerto-Manzano, F., García-Rejón, J. E., Rosado-Paredes, E. P., Flores-Flores, L. F., Ortega-Salazar, A., Chávez-Medina, J., Cremieux-Grimaldi, J. C., Correa-Morales, F., Hernández-Gaona, G., Méndez-Galván, J. F. and Beaty, B. J. (2006). Antibodies to West Nile virus in asymptomatic mammals, birds, and reptiles in the Yucatan Peninsula of Mexico. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **74**, 908–914.

Flores, H. A. and O'Neill, S. L. (2018). Controlling vector-borne diseases by releasing modified mosquitoes. *Nature Reviews Microbiology* **16**, 508–518. doi: 10.1038/s41579-018-0025-0.

Fontenille, D., Lagneau, C., Lecollinet, S., Lefait Robin, R., Setbon, M., Tirel, B. and Yébakima, A. eds. (2009). De l'évaluation des risques vectoriels à l'évaluation du risque épidémique. In *La lutte antivectorielle en France*, pp. 163–180. IRD Éditions, Marseille doi: 10.4000/books.irdeditions.1236.

Franz, A. W. E., Kantor, A. M., Passarelli, A. L. and Clem, R. J. (2015). Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* **7**, 3741–3767. doi: 10.3390/v7072795.

Fros, J. J., Miesen, P., Vogels, C. B., Gaibani, P., Sambri, V., Martina, B. E., Koenraadt, C. J., van Rij, R. P., Vlak, J. M., Takken, W. and Pijlman, G. P. (2015). Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe. *One Health* **1**, 31–36. doi: 10.1016/j.onehlt.2015.08.002.

Galiana-Arnoux, D., Dostert, C., Schneemann, A., Hoffmann, J. A. and Imler, J.-L. (2006). Essential function in vivo for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila. *Nature Immunology* **7**, 590–597. doi: 10.1038/ni1335.

Garrigós, M., Garrido, M., Morales-Yuste, M., Martínez-de la Puente, J. and Veiga, J. (2024). Survival effects of antibiotic exposure during the larval and adult stages in the West Nile virus vector Culex pipiens. *Insect Science* **31**, 542–550. doi: 10.1111/1744-7917.13259.

Gehlenborg, N. (2015). UpSetR: A More Scalable Alternative to Venn and Euler Diagrams for Visualizing Intersecting Sets. 1.4.0. doi: 10.32614/CRAN.package.UpSetR.

Georghiou, G. P., Metcalf, R. L. and Gidden, F. E. (1966). Carbamate-resistance in mosquitos. Selection of Culex pipiens fatigans Wiedemann (=C. quinquefasciatus Say) for resistance to Baygon. *Bulletin of the World Health Organization* **35**, 691–708.

Gorman, M. J. and Paskewitz, S. M. (2001). Serine proteases as mediators of mosquito immune responses. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **31**, 257–262. doi: 10.1016/S0965-1748(00)00145-4.

Grottola, A., Marcacci, M., Tagliazucchi, S., Gennari, W., Gennaro, A. D., Orsini, M., Monaco, F., Marchegiano, P., Marini, V., Meacci, M., Rumpianesi, F., Lorusso, A., Pecorari, M. and Savini, G. (2017). Usutu virus infections in humans: a retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clinical Microbiology and Infection* **23**, 33–37. doi: 10.1016/j.cmi.2016.09.019.

Grubaugh, N. D. and Ebel, G. D. (2016). Dynamics of West Nile virus evolution in mosquito vectors. *Current opinion in virology* **21**, 132–138. doi: 10.1016/j.coviro.2016.09.007.

Grubaugh, N. D., Weger-Lucarelli, J., Murrieta, R. A., Fauver, J. R., Garcia-Luna, S. M., Prasad, A. N., Black, W. C. and Ebel, G. D. (2016). Genetic Drift during Systemic Arbovirus Infection of Mosquito Vectors Leads to Decreased Relative Fitness during Host Switching. *Cell Host & Microbe* **19**, 481–492. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.002.

Grubaugh, N. D., Fauver, J. R., Rückert, C., Weger-Lucarelli, J., Garcia-Luna, S., Murrieta, R. A., Gendernalik, A., Smith, D. R., Brackney, D. E. and Ebel, G. D. (2017). Mosquitoes transmit unique West Nile virus populations during each feeding episode. *Cell reports* **19**, 709–718. doi: 10.1016/j.celrep.2017.03.076.

Haba, Y. and McBride, L. (2022). Origin and status of Culex pipiens mosquito ecotypes. *Current Biology* **32**, R237–R246. doi: 10.1016/j.cub.2022.01.062.

Hadfield, J., Megill, C., Bell, S. M., Huddleston, J., Potter, B., Callender, C., Sagulenko, P., Bedford, T. and Neher, R. A. (2018). Nextstrain: real-time tracking of pathogen evolution. *Bioinformatics* **34**, 4121–4123. doi: 10.1093/bioinformatics/bty407.

Hammond, A. M., Kyrou, K., Bruttini, M., North, A., Galizi, R., Karlsson, X., Kranjc, N., Carpi, F. M., D'Aurizio, R., Crisanti, A. and Nolan, T. (2017). The creation and selection of

mutations resistant to a gene drive over multiple generations in the malaria mosquito. *PLOS Genetics* **13**, e1007039. doi: 10.1371/journal.pgen.1007039.

Han, Y., Pu, Q., Fan, T., Wei, T., Xu, Y., Zhao, L. and Liu, S. (2024). Long non-coding RNAs as promising targets for controlling disease vector mosquitoes. *Insect Science* 1744-7917.13383. doi: 10.1111/1744-7917.13383.

Harbach, R. E. (2007). The Culicidae (Diptera): a review of taxonomy, classification and phylogeny*. *Zootaxa* **1668**,. doi: 10.11646/zootaxa.1668.1.28.

Hardstone, M. and Scott, J. (2010). A review of the interactions between multiple insecticide resistance loci. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **97**, 123–128. doi: 10.1016/j.pestbp.2009.07.010.

Hery, L., Guidez, A., Durand, A.-A., Delannay, C., Normandeau-Guimond, J., Reynaud, Y., Issaly, J., Goindin, D., Legrave, G., Gustave, J., Raffestin, S., Breurec, S., Constant, P., Dusfour, I., Guertin, C. and Vega-Rúa, A. (2021). Natural Variation in Physicochemical Profiles and Bacterial Communities Associated with Aedes aegypti Breeding Sites and Larvae on Guadeloupe and French Guiana. *Microbial Ecology* **81**, 93–109. doi: 10.1007/s00248-020-01544-3.

Hien, D. F. D. S., Dabiré, K. R., Roche, B., Diabaté, A., Yerbanga, R. S., Cohuet, A., Yameogo, B. K., Gouagna, L.-C., Hopkins, R. J., Ouedraogo, G. A., Simard, F., Ouedraogo, J.-B., Ignell, R. and Lefevre, T. (2016). Plant-Mediated Effects on Mosquito Capacity to Transmit Human Malaria. *PLoS pathogens* **12**, e1005773. doi: 10.1371/journal.ppat.1005773.

Hoffmann, J. A., Kafatos, F. C., Janeway, C. A. and Ezekowitz, R. A. B. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science* **284**, 1313–1318. doi: 10.1126/science.284.5418.1313.

Jackson, B. T., Brewster, C. C. and Paulson, S. L. (2012). La Crosse Virus Infection Alters Blood Feeding Behavior in Aedes triseriatus and Aedes albopictus (Diptera: Culicidae). *Journal of medical entomology* **49**, 1424. doi: 10.1603/me12023.

Jenkins, A. M., Waterhouse, R. M. and Muskavitch, M. A. (2015). Long non-coding RNA discovery across the genus anopheles reveals conserved secondary structures within and beyond the Gambiae complex. *BMC Genomics* **16**, 337. doi: 10.1186/s12864-015-1507-3.

Jia, X.-Y., Briese, T., Jordan, I., Rambaut, A., Chi, H. C., Mackenzie, J. S., Hall, R. A., Scherret, J. and Lipkin, W. I. (1999). Genetic analysis of West Nile New York 1999 encephalitis virus. *The Lancet* **354**, 1971–1972. doi: 10.1016/S0140-6736(99)05384-2.

Johnson, R. M. and Rasgon, J. L. (2018). Densonucleosis viruses (‘densoviruses’) for mosquito and pathogen control. *Current Opinion in Insect Science* **28**, 90–97. doi: 10.1016/j.cois.2018.05.009.

Joubert, L., Oudar, J., Hannoun, C., Beytout, D., Corniou, B., Guillon, J. C. and Panthier, R. (1970). [Epidemiology of the West Nile virus: study of a focus in Camargue. IV. Meningo-encephalomyelitis of the horse]. *Annales De l’Institut Pasteur* **118**, 239–247.

Joyce, J. D., Nogueira, J. R., Bales, A. A., Pittman, K. E. and Anderson, J. R. (2011). Interactions Between La Crosse Virus and Bacteria Isolated From the Digestive Tract of Aedes albopictus (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **48**, 389–394. doi: 10.1603/ME09268.

Juache-Villagrana, A. E., Pando-Robles, V., Garcia-Luna, S. M., Ponce-Garcia, G., Fernandez-Salas, I., Lopez-Monroy, B., Rodriguez-Sanchez, I. P. and Flores, A. E. (2022). Assessing the Impact of Insecticide Resistance on Vector Competence: A Review. *Insects* **13**, 377. doi: 10.3390/insects13040377.

Kain, M. P., Skinner, E. B., Athni, T. S., Ramirez, A. L., Mordecai, E. A. and Hurk, A. F. van den (2022). Not all mosquitoes are created equal: A synthesis of vector competence experiments reinforces virus associations of Australian mosquitoes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **16**, e0010768. doi: 10.1371/journal.pntd.0010768.

Kaiser, J. A. and Barrett, A. D. T. (2019). Twenty Years of Progress Toward West Nile Virus Vaccine Development. *Viruses* **11**, 823. doi: 10.3390/v11090823.

Kiang, J. G. and Tsokos, G. C. (1998). Heat shock protein 70 kDa: molecular biology, biochemistry, and physiology. *Pharmacology & Therapeutics* **80**, 183–201. doi: 10.1016/s0163-7258(98)00028-x.

Kilpatrick, A. M., Meola, M. A., Moudy, R. M. and Kramer, L. D. (2008). Temperature, Viral Genetics, and the Transmission of West Nile Virus by Culex pipiens Mosquitoes. *PLOS Pathogens* **4**, e1000092. doi: 10.1371/journal.ppat.1000092.

Koch, R. T., Erazo, D., Folly, A. J., Johnson, N., Dellicour, S., Grubaugh, N. D. and Vogels, C. B. F. (2024). Genomic epidemiology of West Nile virus in Europe. *One Health* **18**, 100664. doi: 10.1016/j.onehlt.2023.100664.

Koh, C. and Saleh, M.-C. (2024). Translating mosquito viromes into vector management strategies. *Trends in Parasitology* **40**, 10–20. doi: 10.1016/j.pt.2023.11.002.

Komar, N., Langevin, S., Hinten, S., Nemeth, N., Edwards, E., Hettler, D., Davis, B., Bowen, R. and Bunning, M. (2003). Experimental Infection of North American Birds with the New York 1999 Strain of West Nile Virus. *Emerging Infectious Diseases* **9**, 311–322. doi: 10.3201/eid0903.020628.

Körsten, C., Al-Hosary, A. A., Holicki, C. M., Schäfer, M., Tews, B. A., Vasić, A., Ziegler, U., Groschup, M. H. and Silaghi, C. (2023). Simultaneous Coinfections with West Nile Virus and Usutu Virus in Culex pipiens and Aedes vexans Mosquitoes. *Transboundary and Emerging Diseases* **2023**, 6305484. doi: 10.1155/2023/6305484.

Kostiukov, M. A., Gordeeva, Z. E., Bulychev, V. P., Nemova, N. V. and Daniiarov, O. A. (1985). [The lake frog (Rana ridibunda)--one of the food hosts of blood-sucking mosquitoes in Tadzhikistan--a reservoir of the West Nile fever virus]. *Meditsinskaia Parazitologiia I Parazitarnye Bolezni* 49–50.

Kramer, L. D., Styer, L. M. and Ebel, G. D. (2008). A Global Perspective on the Epidemiology of West Nile Virus. *Annual Review of Entomology* **53**, 61–81. doi: 10.1146/annurev.ento.53.103106.093258.

Kuo, L., Jaeger, A. S., Banker, E. M., Bialosuknia, S. M., Mathias, N., Payne, A. F., Kramer, L. D., Aliota, M. T. and Ciota, A. T. (2020). Reversion to ancestral Zika virus NS1 residues increases competence of Aedes albopictus. *PLoS Pathogens* **16**, e1008951. doi: 10.1371/journal.ppat.1008951.

Labbé, P., Berthomieu, A., Berticat, C., Alout, H., Raymond, M., Lenormand, T. and Weill, M. (2007a). Independent Duplications of the Acetylcholinesterase Gene Conferring Insecticide Resistance in the Mosquito Culex pipiens. *Molecular Biology and Evolution* **24**, 1056–1067. doi: 10.1093/molbev/msm025.

Labbé, P., Berticat, C., Berthomieu, A., Unal, S., Bernard, C., Weill, M. and Lenormand, T. (2007b). Forty Years of Erratic Insecticide Resistance Evolution in the Mosquito Culex pipiens. *PLOS Genetics* **3**, e205. doi: 10.1371/journal.pgen.0030205.

Labbé, P., Milesi, P., Yébakima, A., Pasteur, N., Weill, M. and Lenormand, T. (2014). GENE-dosage effects on fitness in recent adaptive duplications: ace-1 in the mosquito Culex pipiens. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* **68**, 2092–2101. doi: 10.1111/evo.12372.

Labbé, P., David, J.-P., Alout, H., Milesi, P., Djogbénou, L., Pasteur, N. and Weill, M. (2017). Evolution of Resistance to Insecticide in Disease Vectors. In *Genetics and Evolution of Infectious Diseases (Second Edition)* (ed. Tibayrenc, M.), pp. 313–339. Elsevier, London doi: 10.1016/B978-0-12-799942-5.00014-7.

Lambrechts, L., Paaijmans, K. P., Fansiri, T., Carrington, L. B., Kramer, L. D., Thomas, M. B. and Scott, T. W. (2011). Impact of daily temperature fluctuations on dengue virus transmission by Aedes aegypti. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 7460–7465. doi: 10.1073/pnas.1101377108.

Lanciotti, R. S., Roehrig, J. T., Deubel, V., Smith, J., Parker, M., Steele, K., Crise, B., Volpe, K. E., Crabtree, M. B., Scherret, J. H., Hall, R. A., MacKenzie, J. S., Cropp, C. B., Panigrahy, B., Ostlund, E., Schmitt, B., Malkinson, M., Banet, C., Weissman, J., Komar, N., Savage, H. M., Stone, W., McNamara, T. and Gubler, D. J. (1999). Origin of the West Nile Virus Responsible for an Outbreak of Encephalitis in the Northeastern United States. *Science* **286**, 2333–2337. doi: 10.1126/science.286.5448.2333.

Lee, W.-S., Webster, J. A., Madzokere, E. T., Stephenson, E. B. and Herrero, L. J. (2019). Mosquito antiviral defense mechanisms: a delicate balance between innate immunity and persistent viral infection. *Parasites & Vectors* **12**, 165. doi: 10.1186/s13071-019-3433-8.

Lenormand, T., Guillemaud, T., Bourguet, D. and Raymond, M. (1998). APPEARANCE AND SWEEP OF A GENE DUPLICATION: ADAPTIVE RESPONSE AND POTENTIAL FOR NEW FUNCTIONS IN THE MOSQUITO CULEX PIPIENS. *Evolution; International Journal of Organic Evolution* **52**, 1705–1712. doi: 10.1111/j.1558-5646.1998.tb02250.x.

Levashina, E. A., Langley, E., Green, C., Gubb, D., Ashburner, M., Hoffmann, J. A. and Reichhart, J. M. (1999). Constitutive activation of toll-mediated antifungal defense in serpin-deficient Drosophila. *Science (New York, N.Y.)* **285**, 1917–1919. doi: 10.1126/science.285.5435.1917.

Linke, S., Ellerbrok, H., Bairlein, F., Pauli, G., Müller, T., Kaiser, A., Mühle, R.-U., Berthold, P., Müller, K., Köppen, U., Niedrig, M., Schmidt, D. and Conraths, F. J. (2007).

Serologic Evidence of West Nile Virus Infections in Wild Birds Captured in Germany. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **77**, 358–364. doi: 10.4269/ajtmh.2007.77.358.

Liu, J., Liu, Y., Nie, K., Du, S., Qiu, J., Pang, X., Wang, P. and Cheng, G. (2016). Flavivirus NS1 protein in infected host sera enhances viral acquisition by mosquitoes. *Nature Microbiology* **1**, 16087. doi: 10.1038/nmicrobiol.2016.87.

Liu, T., Xu, Y., Wang, X., Gu, J., Yan, G. and Chen, X.-G. (2018). Antiviral systems in vector mosquitoes. *Developmental & Comparative Immunology* **83**, 34–43. doi: 10.1016/j.dci.2017.12.025.

Liu, W., Cheng, P., An, S., Zhang, K., Gong, M., Zhang, Z. and Zhang, R. (2023). Chromosome-level assembly of *Culex pipiens molestus* and improved reference genome of *Culex pipiens pallens* (Culicidae, Diptera). *Molecular Ecology Resources* **23**, 486–498. doi: 10.1111/1755-0998.13712.

Lorenz, C., Alves, J. M. P., Foster, P. G., Suesdek, L. and Sallum, M. A. M. (2021). Phylogeny and temporal diversification of mosquitoes (Diptera: Culicidae) with an emphasis on the Neotropical fauna. *Systematic Entomology* **46**, 798–811. doi: 10.1111/syen.12489.

Lumjuan, N., Stevenson, B. J., Prapanthadara, L., Somboon, P., Brophy, P. M., Loftus, B. J., Severson, D. W. and Ranson, H. (2007). The *Aedes aegypti* glutathione transferase family. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **37**, 1026–1035. doi: 10.1016/j.ibmb.2007.05.018.

Macdonald, G. (1952). The analysis of the sporozoite rate. *Tropical Diseases Bulletin* **49**, 569–586.

Mancuso, E., Toma, L., Pascucci, I., d'Alessio, S. G., Marini, V., Quaglia, M., Riello, S., Ferri, A., Spina, F., Serra, L., Goffredo, M. and Monaco, F. (2022). Direct and Indirect Role of Migratory Birds in Spreading CCHFV and WNV: A Multidisciplinary Study on Three Stop-Over Islands in Italy. *Pathogens* **11**, 1056. doi: 10.3390/pathogens11091056.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**, 10–12. doi: 10.14806/ej.17.1.200.

Martínez-Rojas, P. P., Quiroz-García, E., Monroy-Martínez, V., Agredano-Moreno, L. T., Jiménez-García, L. F. and Ruiz-Ordaz, B. H. (2020). Participation of Extracellular Vesicles from Zika-Virus-Infected Mosquito Cells in the Modification of Naïve Cells' Behavior by Mediating Cell-to-Cell Transmission of Viral Elements. *Cells* **9**, 123. doi: 10.3390/cells9010123.

Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M. S., Darriet, F., Bergé, J. B., Devonshire, A. L., Guillet, P., Pasteur, N. and Pauron, D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector Anopheles gambiae s.s. *Insect Molecular Biology* **7**, 179–184. doi: 10.1046/j.1365-2583.1998.72062.x.

Martin-Martin, I., Paige, A., Valenzuela Leon, P. C., Gittis, A. G., Kern, O., Bonilla, B., Chagas, A. C., Ganesan, S., Smith, L. B., Garboczi, D. N. and Calvo, E. (2020a). ADP binding by the Culex quinquefasciatus mosquito D7 salivary protein enhances blood feeding on mammals. *Nature Communications* **11**, 2911. doi: 10.1038/s41467-020-16665-z.

Martin-Martin, I., Smith, L. B., Chagas, A. C., Sá-Nunes, A., Shrivastava, G., Valenzuela-Leon, P. C. and Calvo, E. (2020b). Aedes albopictus D7 Salivary Protein Prevents Host Hemostasis and Inflammation. *Biomolecules* **10**, 1372. doi: 10.3390/biom10101372.

Mastrantonio, V., Crasta, G., Puggioli, A., Bellini, R., Urbanelli, S. and Porretta, D. (2018). Cannibalism in temporary waters: Simulations and laboratory experiments revealed the role of spatial shape in the mosquito Aedes albopictus. *PLoS ONE* **13**, e0198194. doi: 10.1371/journal.pone.0198194.

Matthews, B. J., Dudchenko, O., Kingan, S. B., Koren, S., Antoshechkin, I., Crawford, J. E., Glassford, W. J., Herre, M., Redmond, S. N., Rose, N. H., Weedall, G. D., Wu, Y., Batra, S. S., Brito-Sierra, C. A., Buckingham, S. D., Campbell, C. L., Chan, S., Cox, E., Evans, B. R., Fansiri, T., Filipović, I., Fontaine, A., Gloria-Soria, A., Hall, R., Joardar, V. S., Jones, A. K., Kay, R. G. G., Kodali, V. K., Lee, J., Lycett, G. J., Mitchell, S. N., Muehling, J., Murphy, M. R., Omer, A. D., Partridge, F. A., Peluso, P., Aiden, A. P., Ramasamy, V., Rašić, G., Roy, S., Saavedra-Rodriguez, K., Sharan, S., Sharma, A., Smith, M. L., Turner, J., Weakley, A. M., Zhao, Z., Akbari, O. S., Black, W. C., Cao, H., Darby, A. C., Hill, C. A., Johnston, J. S., Murphy, T. D., Raikhel, A. S., Sattelle, D. B., Sharakhov, I. V., White, B. J., Zhao, L., Aiden, E. L., Mann, R. S., Lambrechts, L., Powell, J. R., Sharakhova, M. V., Tu, Z., Robertson, H. M., McBride, C. S., Hastie, A. R., Korlach, J., Neafsey, D. E., Phillippy, A. M. and Vosshall, L. B. (2018). Improved reference genome of Aedes aegypti informs arbovirus vector control. *Nature* **563**, 501–507. doi: 10.1038/s41586-018-0692-z.

Mayer, M. P. and Bukau, B. (2005). Hsp70 chaperones: cellular functions and molecular mechanism. *Cellular and molecular life sciences: CMLS* **62**, 670–684. doi: 10.1007/s00018-004-4464-6.

McCarroll, L. and Hemingway, J. (2002). Can insecticide resistance status affect parasite transmission in mosquitoes? *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **32**, 1345–1351. doi: 10.1016/S0965-1748(02)00097-8.

Mencattelli, G., Ndione, M. H. D., Silverj, A., Diagne, M. M., Curini, V., Teodori, L., Di Domenico, M., Mbaye, R., Leone, A., Marcacci, M., Gaye, A., Ndiaye, E., Diallo, D., Ancora, M., Secondini, B., Di Lollo, V., Mangone, I., Bucciacchio, A., Polci, A., Marini, G., Rosà, R., Segata, N., Fall, G., Cammà, C., Monaco, F., Diallo, M., Rota-Stabelli, O., Faye, O., Rizzoli, A. and Savini, G. (2023). Spatial and temporal dynamics of West Nile virus between Africa and Europe. *Nature Communications* **14**, 6440. doi: 10.1038/s41467-023-42185-7.

Merkling, S. H., Crist, A. B., Henrion-Lacritick, A., Frangeul, L., Couderc, E., Gausson, V., Blanc, H., Bergman, A., Baidaliuk, A., Romoli, O., Saleh, M.-C. and Lambrechts, L. (2023). Multifaceted contributions of Dicer2 to arbovirus transmission by Aedes aegypti. *Cell Reports* **42**,. doi: 10.1016/j.celrep.2023.112977.

Milesi, P., Lenormand, T., Lagneau, C., Weill, M. and Labbé, P. (2016). Relating fitness to long-term environmental variations in natura. *Molecular Ecology* **25**, 5483–5499. doi: 10.1111/mec.13855.

Milesi, P., Weill, M., Lenormand, T. and Labbé, P. (2017a). Heterogeneous gene duplications can be adaptive because they permanently associate overdominant alleles. *Evolution Letters* **1**, 169–180. doi: 10.1002/evl3.17.

Milesi, P., Benoît, A., Nten, C., Pocquet, N., Berthomieu, A., Unal, S., Makoundou, P., Weill, M. and Labbé, P. (2017b). The evolutionary fate of heterogeneous gene duplications: A precarious overdominant equilibrium between environment, sublethality and complementation. *Molecular Ecology* **27**,. doi: 10.1111/mec.14463.

Milesi, P., Assogba, B. S., Atyame, C. M., Pocquet, N., Berthomieu, A., Unal, S., Makoundou, P., Weill, M. and Labbé, P. (2018). The evolutionary fate of heterogeneous gene duplications: A precarious overdominant equilibrium between environment, sublethality and complementation. *Molecular Ecology* **27**, 493–507. doi: 10.1111/mec.14463.

Milesi, P., Claret, J.-L., Unal, S., Weill, M. and Labbé, P. (2022). Evolutionary trade-offs associated with copy number variations in resistance alleles in Culex pipiens mosquitoes. *Parasites & Vectors* **15**, 484. doi: 10.1186/s13071-022-05599-8.

Millar, D. G., Garza, K. M., Odermatt, B., Elford, A. R., Ono, N., Li, Z. and Ohashi, P. S. (2003). Hsp70 promotes antigen-presenting cell function and converts T-cell tolerance to autoimmunity in vivo. *Nature Medicine* **9**, 1469–1476. doi: 10.1038/nm962.

Montagnaro, S., Piantedosi, D., Ciarcia, R., Loponte, R., Veneziano, V., Fusco, G., Amoroso, M. G., Ferrara, G., Damiano, S., Iovane, G. and Pagnini, U. (2019). Serological Evidence of Mosquito-Borne Flaviviruses Circulation in Hunting Dogs in Campania Region, Italy. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **19**, 142–147. doi: 10.1089/vbz.2018.2337.

Multhoff, G. (2007). Heat shock protein 70 (Hsp70): membrane location, export and immunological relevance. *Methods (San Diego, Calif.)* **43**, 229–237. doi: 10.1016/j.ymeth.2007.06.006.

Murgue, B., Murri, S., Zientara, S., Durand, B., Durand, J. P. and Zeller, H. (2001). West Nile outbreak in horses in southern France, 2000: the return after 35 years. *Emerging Infectious Diseases* **7**, 692–696.

Nash, D., Mostashari, F., Fine, A., Miller, J., O'Leary, D., Murray, K., Huang, A., Rosenberg, A., Greenberg, A., Sherman, M., Wong, S., Layton, M., and 1999 West Nile Outbreak Response Working Group (2001). The outbreak of West Nile virus infection in the New York City area in 1999. *The New England Journal of Medicine* **344**, 1807–1814. doi: 10.1056/NEJM200106143442401.

Nikolay, B. (2015). A review of West Nile and Usutu virus co-circulation in Europe: how much do transmission cycles overlap? *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **109**, 609–618. doi: 10.1093/trstmh/trv066.

Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S. B. and Sall, A. A. (2011). Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **11**, 1417–1423. doi: 10.1089/vbz.2011.0631.

Nikolay, B., Weidmann, M., Dupressoir, A., Faye, O., Boye, C. S., Diallo, M. and Sall, A. A. (2014). Development of a Usutu virus specific real-time reverse transcription PCR assay based on sequenced strains from Africa and Europe. *Journal of Virological Methods* **197**, 51–54. doi: 10.1016/j.jviromet.2013.08.039.

Novakova, E., Woodhams, D. C., Rodríguez-Ruano, S. M., Brucker, R. M., Leff, J. W., Maharaj, A., Amir, A., Knight, R. and Scott, J. (2017). Mosquito Microbiome Dynamics, a Background for Prevalence and Seasonality of West Nile Virus. *Frontiers in Microbiology* **8**,. doi: 10.3389/fmicb.2017.00526.

Pasteur, N., Rioux, J.-A., Guilvard, E. and Pech-Périères, J. (1977). Nouvelle mention, pour le « Midi » méditerranéen, de populations naturelles anautogènes et sténogames de *Culex pipiens pipiens* L. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparée* **52**, 205–210. doi: 10.1051/parasite/1977522205.

Pasteur, N., Nancé, E. and Bons, N. (2001). Tissue Localization of Overproduced Esterases in the Mosquito Culex pipiens (Diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* **38**, 791–801. doi: 10.1603/0022-2585-38.6.791.

Pecorari, M., Longo, G., Gennari, W., Grottola, A., Sabbatini, A., Tagliazucchi, S., Savini, G., Monaco, F., Simone, M., Lelli, R. and Rumpianesi, F. (2009). First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Euro Surveillance: Bulletin Europeen Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin* **14**, 19446.

Peng, C., Qian, Z., Xinyu, Z., Qianqian, L., Maoqing, G., Zhong, Z. and Ruiling, Z. (2021). A Draft Genome Assembly of *Culex pipiens pallens* (Diptera: Culicidae) Using PacBio Sequencing. *Genome Biology and Evolution* **13**, evab005. doi: 10.1093/gbe/evab005.

Poidinger, M., Hall, R. A. and Mackenzie, J. S. (1996). Molecular Characterization of the Japanese Encephalitis Serocomplex of the Flavivirus Genus. *Virology* **218**, 417–421. doi: 10.1006/viro.1996.0213.

Poirier, E. Z., Goic, B., Tomé-Poderti, L., Frangeul, L., Boussier, J., Gausson, V., Blanc, H., Vallet, T., Loyd, H., Levi, L. I., Lanciano, S., Baron, C., Merkling, S. H., Lambrechts, L., Mirouze, M., Carpenter, S., Vignuzzi, M. and Saleh, M.-C. (2018). Dicer-2-Dependent Generation of Viral DNA from Defective Genomes of RNA Viruses Modulates Antiviral Immunity in Insects. *Cell Host & Microbe* **23**, 353-365.e8. doi: 10.1016/j.chom.2018.02.001.

Prasad, A. N., Brackney, Doug. E. and Ebel, G. D. (2013a). The Role of Innate Immunity in Conditioning Mosquito Susceptibility to West Nile Virus. *Viruses* **5**, 3142–3170. doi: 10.3390/v5123142.

Prasad, A., Brackney, Doug. and Ebel, G. (2013b). The Role of Innate Immunity in Conditioning Mosquito Susceptibility to West Nile Virus. *Viruses* **5**, 3142–3170. doi: 10.3390/v5123142.

Prat, M., Jeanneau, M., Rakotoarivony, I., Duhayon, M., Simonin, Y., Savini, G., Labbé, P. and Alout, H. (2024). Virulence and transmission vary between Usutu virus lineages in Culex pipiens. *PLOS Neglected Tropical Diseases* **18**, e0012295. doi: 10.1371/journal.pntd.0012295.

Ranson, H., Rossiter, L., Ortelli, F., Jensen, B., Wang, X., Roth, C. W., Collins, F. H. and Hemingway, J. (2001). Identification of a novel class of insect glutathione S-transferases involved in resistance to DDT in the malaria vector Anopheles gambiae. *The Biochemical Journal* **359**, 295–304. doi: 10.1042/0264-6021:3590295.

Raymond, M., Heckel, D. G. and Scott, J. G. (1989). Interactions between Pesticide Genes: Model and Experiment. *Genetics* **123**, 543–551.

Raymond, M., Chevillon, C., Guillemaud, T., Lenormand, T. and Pasteur, N. (1998). An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito Culex pipiens. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* **353**, 1707–1711.

Raymond, M., Berticat, C., Weill, M., Pasteur, N. and Chevillon, C. (2001). Insecticide resistance in the mosquito Culex pipiens: What have we learned about adaptation? In *Microevolution Rate, Pattern, Process* (ed. Hendry, A. P. and Kinnison, M. T.), pp. 287–296. Springer Netherlands, Dordrecht doi: 10.1007/978-94-010-0585-2_18.

Richards, S. L., Mores, C. N., Lord, C. C. and Tabachnick, W. J. (2007). Impact of Extrinsic Incubation Temperature and Virus Exposure on Vector Competence of Culex pipiens quinquefasciatus Say (Diptera: Culicidae) for West Nile Virus. *Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)* **7**, 629–636. doi: 10.1089/vbz.2007.0101.

Ritz, C., Baty, F., Streibig, J. C. and Gerhard, D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PLoS ONE* **10**, e0146021. doi: 10.1371/journal.pone.0146021.

Rivero, A. and Gandon, S. (2018). Evolutionary Ecology of Avian Malaria: Past to Present. *Trends in Parasitology* **34**, 712–726. doi: 10.1016/j.pt.2018.06.002.

Rivero, A., Magaud, A., Nicot, A. and Vézilier, J. (2011). Energetic Cost of Insecticide Resistance in Culex pipiens Mosquitoes. *Journal of Medical Entomology* **48**, 694–700. doi: 10.1603/ME10121.

Rodgers, F. H., Gendrin, M., Wyer, C. A. S. and Christophides, G. K. (2017). Microbiota-induced peritrophic matrix regulates midgut homeostasis and prevents systemic infection of malaria vector mosquitoes. *PLOS Pathogens* **13**, e1006391. doi: 10.1371/journal.ppat.1006391.

Roesch, F., Fajardo, A., Moratorio, G. and Vignuzzi, M. (2019). Usutu Virus: An Arbovirus on the Rise. *Viruses* **11**, 640. doi: 10.3390/v11070640.

Root, J. J. and Bosco-Lauth, A. M. (2019). West Nile Virus Associations in Wild Mammals: An Update. *Viruses* **11**, 459. doi: 10.3390/v11050459.

Runtuwene, L. R., Kawashima, S., Pijoh, V. D., Tuda, J. S. B., Hayashida, K., Yamagishi, J., Sugimoto, C., Nishiyama, S., Sasaki, M., Orba, Y., Sawa, H., Takasaki, T., James, A. A., Kobayashi, T. and Eshita, Y. (2020). The Lethal(2)-Essential-for-Life [L(2)EFL] Gene Family Modulates Dengue Virus Infection in Aedes aegypti. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 7520. doi: 10.3390/ijms21207520.

Ryazansky, S. S., Chen, C., Potters, M., Naumenko, A. N., Lukyanchikova, V., Masri, R. A., Brusentsov, I. I., Karagodin, D. A., Yurchenko, A. A., Dos Anjos, V. L., Haba, Y., Rose, N. H., Hoffman, J., Guo, R., Menna, T., Kelley, M., Ferrill, E., Schultz, K. E., Qi, Y., Sharma, A., Deschamps, S., Llaca, V., Mao, C., Murphy, T. D., Baricheva, E. M., Emrich, S., Fritz, M. L., Benoit, J. B., Sharakhov, I. V., McBride, C. S., Tu, Z. and Sharakhova, M. V. (2024). The chromosome-scale genome assembly for the West Nile vector Culex quinquefasciatus uncovers patterns of genome evolution in mosquitoes. *BMC Biology* **22**, 16. doi: 10.1186/s12915-024-01825-0.

Saiz, J.-C., Martín-Acebes, M. A., Blázquez, A. B., Escribano-Romero, E., Poderoso, T. and Jiménez de Oya, N. (2021). Pathogenicity and virulence of West Nile virus revisited eight decades after its first isolation. *Virulence* **12**, 1145–1173. doi: 10.1080/21505594.2021.1908740.

Salazar, M. I., Richardson, J. H., Sánchez-Vargas, I., Olson, K. E. and Beaty, B. J. (2007). Dengue virus type 2: replication and tropisms in orally infected Aedes aegypti mosquitoes. *BMC Microbiology* **7**, 9. doi: 10.1186/1471-2180-7-9.

Schneider, B. S. and Higgs, S. (2008). The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **102**, 400–408. doi: 10.1016/j.trstmh.2008.01.024.

Scholte, E. J., Knols, B. G. J., Samson, R. A. and Takken, W. (2004). Entomopathogenic fungi for mosquito control: A review. *Journal of Insect Science* **4**, 1–24.

Shapiro, L. L. M., Murdock, C. C., Jacobs, G. R., Thomas, R. J. and Thomas, M. B. (2016). Larval food quantity affects the capacity of adult mosquitoes to transmit human malaria. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **283**, 20160298. doi: 10.1098/rspb.2016.0298.

Sicard, M., Bonneau, M. and Weill, M. (2019). Wolbachia prevalence, diversity, and ability to induce cytoplasmic incompatibility in mosquitoes. *Current Opinion in Insect Science* **34**, 12–20. doi: 10.1016/j.cois.2019.02.005.

Siljic, M., Sehovic, R., Jankovic, M., Stamenkovic, G., Loncar, A., Todorovic, M., Stanojevic, M. and Cirkovic, V. (2023). Evolutionary dynamics of Usutu virus: Worldwide dispersal patterns and transmission dynamics in Europe. *Frontiers in Microbiology* **14**,.

Simonin, Y. (2024). Circulation of West Nile Virus and Usutu Virus in Europe: Overview and Challenges. *Viruses* **16**, 599. doi: 10.3390/v16040599.

Smith, L. B., Duge, E., Valenzuela-León, P. C., Brooks, S., Martin-Martin, I., Ackerman, H. and Calvo, E. (2022). Novel salivary antihemostatic activities of long-form D7 proteins from the malaria vector Anopheles gambiae facilitate hematophagy. *The Journal of Biological Chemistry* **298**, 101971. doi: 10.1016/j.jbc.2022.101971.

Strycharz, J. P., Lao, A., Li, H., Qiu, X., Lee, S. H., Sun, W., Yoon, K. S., Doherty, J. J., Pittendrigh, B. R. and Clark, J. M. (2013). Resistance in the highly DDT-resistant *91-R* strain of *Drosophila melanogaster* involves decreased penetration, increased metabolism, and direct excretion. *Pesticide Biochemistry and Physiology* **107**, 207–217. doi: 10.1016/j.pestbp.2013.06.010.

Tantely, M. L., Tortosa, P., Alout, H., Berticat, C., Berthomieu, A., Rutee, A., Dehecq, J.-S., Makoundou, P., Labbé, P., Pasteur, N. and Weill, M. (2010). Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Réunion Island. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* **40**, 317–324. doi: 10.1016/j.ibmb.2010.02.005.

Taylor, R. M., Work, T. H., Hurlbut, H. S. and Rizk, F. (1956). A Study of the Ecology of West Nile Virus in Egypt. doi: 10.4269/ajtmh.1956.5.579.

Ulbert, S. (2019). West Nile virus vaccines – current situation and future directions. *Human Vaccines & Immunotherapeutics* **15**, 2337–2342. doi: 10.1080/21645515.2019.1621149.

Vaidyanathan, R., Fleisher, A. E., Minnick, S. L., Simmons, K. A. and Scott, T. W. (2008). Nutritional Stress Affects Mosquito Survival and Vector Competence for West Nile Virus. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* **8**, 727–732. doi: 10.1089/vbz.2007.0189.

Valenzuela, J. G., Charlab, R., Gonzalez, E. C., De Miranda-Santos, I. K. F., Marinotti, O., Francischetti, I. M. B. and Ribeiro, J. M. C. (2002). The D7 family of salivary proteins in blood sucking diptera. *Insect Molecular Biology* **11**, 149–155. doi: 10.1046/j.1365-2583.2002.00319.x.

Vantaux, A., Moiroux, N., Dabiré, K. R., Cohuet, A. and Lefèvre, T. (2023). Multiple hosts, multiple impacts: the role of vertebrate host diversity in shaping mosquito life history and pathogen transmission. *Peer Community Journal* **3**,. doi: 10.24072/pcjournal.288.

Vazeille, M., Moutailler, S., Coudrier, D., Rousseaux, C., Khun, H., Huerre, M., Thiria, J., Dehecq, J.-S., Fontenille, D., Schuffenecker, I., Despres, P. and Failloux, A.-B. (2007). Two Chikungunya Isolates from the Outbreak of La Reunion (Indian Ocean) Exhibit Different Patterns of Infection in the Mosquito, Aedes albopictus. *PLOS ONE* **2**, e1168. doi: 10.1371/journal.pone.0001168.

Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S. and Rivero, A. (2012). Plasmodium infection decreases fecundity and increases survival of mosquitoes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **279**, 4033–4041. doi: 10.1098/rspb.2012.1394.

Vézilier, J., Nicot, A., De Lorgeril, J., Gandon, S. and Rivero, A. (2013). The impact of insecticide resistance on *Culex pipiens* immunity. *Evolutionary Applications* **6**, 497–509. doi: 10.1111/eva.12037.

Vézilier, J., Nicot, A., Gandon, S. and Rivero, A. (2015). Plasmodium infection brings forward mosquito oviposition. *Biology Letters* **11**, 20140840. doi: 10.1098/rsbl.2014.0840.

Vilibic-Cavlek, T., Petrovic, T., Savic, V., Barbic, L., Tabain, I., Stevanovic, V., Klobucar, A., Mrzljak, A., Ilic, M., Bogdanic, M., Benvin, I., Santini, M., Capak, K., Monaco, F., Listes, E. and Savini, G. (2020). Epidemiology of Usutu Virus: The European Scenario. *Pathogens* **9**, 699. doi: 10.3390/pathogens9090699.

Vogels, C. B. F., Fros, J. J., Göertz, G. P., Pijlman, G. P. and Koenraadt, C. J. M. (2016). Vector competence of northern European Culex pipiens biotypes and hybrids for West Nile virus is differentially affected by temperature. *Parasites & Vectors* **9**, 393. doi: 10.1186/s13071-016-1677-0.

Vora, A., Zhou, W., Londono-Renteria, B., Woodson, M., Sherman, M. B., Colpitts, T. M., Neelakanta, G. and Sultana, H. (2018). Arthropod EVs mediate dengue virus transmission through interaction with a tetraspanin domain containing glycoprotein Tsp29Fb. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E6604–E6613. doi: 10.1073/pnas.1720125115.

Weetman, D., Mitchell, S. N., Wilding, C. S., Birks, D. P., Yawson, A. E., Essandoh, J., Mawejje, H. D., Djogbenou, L. S., Steen, K., Rippon, E. J., Clarkson, C. S., Field, S. G., Rigden, D. J. and Donnelly, M. J. (2015). Contemporary evolution of resistance at the major

insecticide target site gene Ace-1 by mutation and copy number variation in the malaria mosquito Anopheles gambiae. *Molecular Ecology* **24**, 2656–2672. doi: 10.1111/mec.13197.

Weill, M., Berticat, C., Raymond, M. and Chevillon, C. (2000). Quantitative Polymerase Chain Reaction to Estimate the Number of Amplified Esterase Genes in Insecticide-Resistant Mosquitoes. *Analytical Biochemistry* **285**, 267–270. doi: 10.1006/abio.2000.4781.

Weill, M., Malcolm, C., Chandre, F., Mogensen, K., Berthomieu, A., Marquine, M. and Raymond, M. (2004). The unique mutation in ace-1 giving high insecticide resistance is easily detectable in mosquito vectors. *Insect Molecular Biology* **13**, 1–7. doi: 10.1111/j.1365-2583.2004.00452.x.

Wilkerson, R. C., Linton, Y.-M. and Strickman, D. (2021). *Mosquitoes of the World*. JHU Press.

Williams, M. C., Simpson, D. I. H., Haddow, A. J. and Knight, E. M. (1964). The Isolation of West Nile Virus from Man and of Usutu Virus from the Bird-Biting Mosquito Mansonia Aurites (Theobald) in the Entebbe Area of Uganda. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology* **58**, 367–374. doi: 10.1080/00034983.1964.11686258.

Winnebeck, E. C., Millar, C. D. and Warman, G. R. (2010). Why Does Insect RNA Look Degraded? *Journal of Insect Science* **10**, 1–7. doi: 10.1673/031.010.14119.

Wu, Y.-W., Mettling, C., Wu, S.-R., Yu, C.-Y., Perng, G.-C., Lin, Y.-S. and Lin, Y.-L. (2016). Autophagy-associated dengue vesicles promote viral transmission avoiding antibody neutralization. *Scientific Reports* **6**, 32243. doi: 10.1038/srep32243.

Xiao, Y., Rouzine, I. M., Bianco, S., Acevedo, A., Goldstein, E. F., Farkov, M., Brodsky, L. and Andino, R. (2016). RNA Recombination Enhances Adaptability and Is Required for Virus Spread and Virulence. *Cell Host & Microbe* **19**, 493–503. doi: 10.1016/j.chom.2016.03.009.

Yanchula, K. Z. and Alto, B. W. (2021). Paternal and maternal effects in a mosquito: A bridge for life history transition. *Journal of Insect Physiology* **131**, 104243. doi: 10.1016/j.jinsphys.2021.104243.

Yunshun Chen, A. L. (2017). edgeR. doi: 10.18129/B9.BIOC.EDGER.

Zannoli, S. and Sambri, V. (2019). West Nile Virus and Usutu Virus Co-Circulation in Europe: Epidemiology and Implications. *Microorganisms* **7**, E184. doi: 10.3390/microorganisms7070184.

Résumé grand public :

Les moustiques sont vecteurs de maladies d'intérêt en santé humaine et animale qu'ils transmettent aux hôtes lors de leur repas sanguin. En plus des problématiques sanitaires, la densité des populations de moustiques crée de la nuisance, ce qui a poussé les sociétés à lutter contre eux, en partie avec des insecticides chimiques. En conséquence, des allèles responsables de résistance aux insecticides ont été sélectionnés dans les populations de moustiques qui leur permettent de survivre aux traitements insecticides. Or ces allèles peuvent aussi impacter d'autres traits d'histoire de vie des moustiques. Les travaux de ma thèse visent à caractériser l'effet des allèles de résistances sur la compétence vectorielle du virus Usutu et du virus du Nil occidental par les moustiques appartenant au complexe d'espèces *Culex pipiens*. Grâce à des infections expérimentales, nous avons montré que les interactions vecteurs-pathogène sont influencées par ces allèles, notamment en ce qui concerne la compétence vectorielle mais aussi des traits d'histoire de vie des vecteurs qui ont une importance dans la transmission des agents pathogènes. Les résultats obtenus suggèrent une réduction de la compétence vectorielle associée à certains allèles de résistances portés par les individus, mais d'autre part des effets positivement corrélé entre multirésistance et augmentation de la compétence vectorielle. Les coûts associés à ces allèles sur la survie réduisent quant à eux la capacité vectorielle. Des études transcriptomiques ont permis d'identifier des gènes et des processus biologiques potentiellement responsables des différences phénotypiques observées. Ces résultats ont permis d'acquérir des connaissances qui pourront orienter de futurs axes de recherche pour améliorer les méthodes de contrôle et pour caractériser les conséquences de la résistance aux insecticides sur les populations virales.

Abstract :

Mosquitoes are vectors of several human and animal diseases, which they transmit to vertebrate hosts during their blood meal. In addition, the density of mosquito populations creates a nuisance from their bites, and has prompted society to control them, mostly with chemical insecticides. As a result, alleles responsible for insecticide resistance have been selected in mosquito populations, enabling them to survive the insecticide treatments. However, these alleles can also have an impact on other life-history traits of mosquitoes. The aim of my thesis is to characterize the effect of resistance alleles on the vector competence for Usutu and West Nile viruses by mosquitoes belonging to the *Culex pipiens* species complex. Using experimental infections, we have shown that vector-pathogen interactions are influenced by these alleles, particularly with regard to vector competence, but also to life-history traits relevant for pathogen transmission. The results suggest a reduction in vector competence associated with some resistance alleles carried by individuals, but on the other may be positively correlated between multiresistance and increased of vector competence. The survival costs associated with these alleles reduces vectorial capacity. Transcriptomic studies identified genes and biological processes potentially responsible for the observed phenotypic differences. These results have enabled us to acquire knowledge that could guide future research into improving control methods and characterizing the consequences of insecticide resistance on viral populations.