



HAL
open science

Ecologie des organismes bactériens symbiotiques

Pablo Tortosa

► **To cite this version:**

Pablo Tortosa. Ecologie des organismes bactériens symbiotiques. Evolution [q-bio.PE]. Université de La Réunion, 2014. tel-01468026

HAL Id: tel-01468026

<https://hal.science/tel-01468026v1>

Submitted on 27 Mar 2017

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

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



Université de La Réunion

Faculté des Sciences et Technologies

Centre de Recherche et de Veille sur les Maladies Émergentes dans l'Océan Indien (CRVOI)

Dossier de candidature à l'Habilitation à Diriger la Recherche

Présenté par Pablo Tortosa

Ecologie des organismes bactériens symbiotiques

Rapporteurs :

Serge Morand, DR CNRS
Patrick Mavingui, DR CNRS
Matthieu Le Corre, Pr Université de La Réunion

Jury :

Serge Morand, DR CNRS
Patrick Mavingui, DR CNRS
Matthieu Le Corre, Pr Université de La Réunion
Emmanuel Bourdon, Professeur, université de La Réunion
Nathalie Becker, Maître de Conférences, MNHN
Mylène Weill, DR CNRS
Philippe Fort, DR CNRS

HDR soutenue le jeudi 24 avril 2014

Résumé.

Les îles du Sud-Ouest de l'Océan Indien constituent l'un des 34 points chauds de biodiversité. Parmi les îles qui composent cette région, Madagascar est listée comme l'un des 5 points chauds leaders dans le monde, distinction qui tient au niveau d'endémisme exceptionnellement élevé que la grande île abrite en termes d'espèces animales et végétales. Cependant, la diversité microbienne est parfaitement ignorée, pas un mot sur ce monde trop petit sans doute pour qu'on ait pu en apprécier la diversité. Il s'agit aujourd'hui d'une part de décrire cette diversité dont on peut raisonnablement penser qu'elle comporte un certain nombre de taxons endémiques, notamment pour ce qui concerne les microbes symbiotiques et infectieux qui nous intéressent. Il s'agit également de déchiffrer le rôle des facteurs biotiques et abiotiques dans la dynamique de ces communautés microbiennes, et au delà, comprendre l'écologie de ces micro organismes dans leur environnement. Nous avons abordé ce travail par une exploration non ciblée des micro-organismes infectant les espèces animales endémiques et introduites. Nous avons par ailleurs étudié spécifiquement les bactéries endosymbiotiques *Wolbachia* utilisées dans le développement d'une stratégie de lutte anti vectorielle innovante, et les leptospires, bactéries pathogènes émergentes d'importance médicale dans la région. Nos résultats montrent que la région abrite effectivement des taxons particuliers dont la diversification est étroitement liée à celle des espèces animales qu'ils infectent. L'ensemble de nos travaux indique que les approches biogéographiques permettant de comprendre les patrons de distribution des espèces animales et végétales permettent également d'étudier l'histoire évolutive de micro organismes dont certains ont un potentiel d'émergence.

Mots clefs. Bactéries pathogènes, *Wolbachia*, *Leptospira*, réservoirs, vecteurs.

Abstract.

The islands of the South-western Indian Ocean are listed as one of the 34 global diversity hotspots. Among these islands, Madagascar is considered as one of the 5 leaders hotspots strictly because of the exceptional vegetal and animal diversity hosted by the big island. Microbial diversity is simply not considered, mainly because of the microscopic size of these organisms, which require the implementation of somehow complex methodologies for the assessment of this diversity. It is now time to describe this microbial world, which can be reasonably expected to be composed of endemic taxa, notably concerning symbiotic and infectious microorganisms of potential medical interest. We also aim at deciphering the interactions that these microbes develop with other symbiotic microorganisms as well as with animal species participating to their biological cycle such as reservoir or vector species and humans. We carried out this investigation by describing microorganisms infecting endemic and introduced animal species, and by focusing on one hand on the endosymbiotic bacteria *Wolbachia* that we use in the development of an innovative vector control strategy, and on the other hand on pathogenic *Leptospira*, which are considered as main medical concern in the region. Our data show that regional microbial diversity includes endemics which diversification is tightly linked to that of their animal reservoirs. Altogether, our work supports that methods used for the investigation of animal and vegetal biogeography are indeed relevant to investigate the evolution history and geographic distribution of microorganisms of potential medical interest.

Key words : pathogenic bacteria, *Wolbachia*, *Leptospira*, reservoirs, vectors.

Table des matières

Préambule.....	1
Première partie : Informations générales	3
I- Curriculum Vitae	4
II-Publications	10
III- Présentations orales	13
Deuxième partie : Activités d’enseignement.....	14
I-Enseignement.....	15
II-Encadrement d’étudiants	16
III-Encadrement de Post-Doctorants	18
Troisième partie : Activités de recherche.....	20
I-Travaux antérieurs	21
1. Biochimie et Génétique Bactériennes	21
2. Interactions Bactéries-Insectes	29
II-Travaux en cours	32
1. Utilisation des bactéries <i>Wolbachia</i> en Lutte Anti Vectorielle.....	32
2. Histoire naturelle des agents infectieux dans les îles du Sud Ouest de l’Océan Indien.....	34
III-Perspectives de Recherche	42
 Références bibliographiques	 45

Préambule

Mes travaux de recherche montrent un parcours s'articulant autour de 2 thématiques principales: la compréhension du contrôle de l'expression des gènes et du développement chez les bactéries par des approches mécanistes, et l'étude des processus évolutifs ayant un impact sur la distribution de microbes infectieux. A la lecture de ces travaux, on peut légitimement s'interroger sur la cohérence de ce parcours, même si je vais dans la suite de ce document m'attacher à montrer le contraire. Ce parcours résulte d'un intérêt clairement affirmé dès les bancs de l'Université pour la génétique bactérienne, et de la rencontre ultérieure avec des biologistes de l'Evolution, rencontre qui s'est faite pour l'essentiel au grès d'un processus d'une importance fondamentale en biologie : le hasard. Le fil conducteur clairement identifié est la cellule bactérienne. Je l'ai côtoyée sur des boîtes de Pétri ou, s'agissant d'organismes non cultivables, sous forme de séquences nucléotidiques. Je me suis attaché, durant ma thèse et mon post-doctorat, à comprendre quelles protéines et cascades de régulation étaient impliquées dans des mécanismes de contrôles divers, en manipulant des souches cultivées depuis des décennies en laboratoire et que l'on n'hésite pas aujourd'hui à qualifier de « bêtes de cirque ». Si ces organismes modèles sur lesquels s'accordent à travailler de nombreuses équipes à l'échelle internationale permettent de faire des progrès considérables, en particulier à travers le développement d'outils génétiques performants mutualisés parmi les scientifiques organisés en réseau, je cherche aujourd'hui à comprendre le cycle de microbes dans leur milieu naturel. *Bacillus subtilis* est une star de laboratoire, quand je demandais à mes collègues l'origine de notre bactérie de chevet, j'avais droit à des réponses approximatives, certains n'hésitant pas à me répondre qu'avec cette odeur caractéristique de chaussette usagée, cette bactérie était vraisemblablement commensale de l'homme avec un tropisme marqué pour les pieds (sales). La bactériologie a évolué significativement depuis la fin des années 90, notamment avec l'essor des techniques de séquençage systématique qui ont permis d'accéder à un nombre considérable de génomes complets et de développer des méthodes permettant de mesurer la régulation non plus d'un gène ou régulon, mais d'un génome ou transcriptome, d'étudier non plus une espèce mais une communauté. On s'intéresse aujourd'hui au cycle de ces microbes *dans la vraie vie*, à savoir dans un monde où la compétition est féroce et où la ressource est rare, c'est à dire parfaitement aux antipodes d'une monoculture en milieu riche et en laboratoire confiné. Les travaux que j'ai réalisés chez *B. subtilis* ont permis de constater qu'une culture d'origine clonale produisait différentes populations engagées dans des développements distincts.

L'existence de destins multiples au sein d'une population bactérienne d'origine clonale augurait déjà du niveau de complexité qui pouvait exister au sein de communautés multi spécifiques, même si ces communautés étaient alors encore peu étudiées.

Je suis venu aux insectes par les bactéries, en collaborant avec Sylvain Charlat qui étudiait les bactéries *Wolbachia* dans le cadre d'un post doctorat à la station Gump - Berkeley University en Polynésie française. Si les concepts et questions posées par ces endosymbiotes sont passionnants, la communauté scientifique qui a choisi ce modèle d'investigation étudie encore peu les mécanismes moléculaires à l'origine des manipulations de ce parasite sexuel. Un monde, donc, où le « pourquoi » prévaut sur le « comment », clairement en opposition avec la culture scientifique que j'avais pu acquérir jusque là. Ce changement de thématique, radical, est à la fois une faiblesse et une force : il implique un passage par un stade néophyte, inconfortable et laborieux, mais il permet d'aborder un domaine nouveau avec une perspective et des méthodes originales. Il est raisonnable de penser que, les années passant, la balance se déséquilibre du côté des forces et atouts.

Première partie : Informations générales

I- Curriculum Vitae

Adresse professionnelle :

CRVOI-Centre de Recherche et de veille sur les
Maladies Émergentes dans l'Océan Indien
2 rue Maxime Rivière, 97490 Ste Clotilde
France

Tel : (+262) 262 93 88 39

Adresse électronique :

pablo.tortosa@univ-reunion.fr

1-Formation et expérience professionnelle

2010 : **Maitre de Conférences en Microbiologie**, Chaire Mixte CNRS-CRVOI/Université de La Réunion

2009-2010: **Chargé de Recherche** au CRVOI. Ste Clotilde, La Réunion

2008-2009 : **Ingénieur de Recherche** au CRVOI. Ste Clotilde, La Réunion.

2006-2007 : **Master International d'Entomologie Médicale et Vétérinaire**. Ouidah, Bénin. Stage de Master au Laboratoire de Génétique de l'adaptation de l'Université Montpellier II, UMR 5554, sous la direction de Mylène Weill. Etude des endosymbiotes *Wolbachia* chez *Aedes albopictus* et *Culex pipiens*. (Mention Très Bien, Rang :1^{er})

1998-2001: **Post-Doctorat** au Public Health Research Institute, 455 First Avenue, New York. Etats-Unis. Clonage et Caractérisation de nouveaux gènes impliqués dans la sporulation et la compétence chez *Bacillus subtilis*. Post doctorat co-financé par le National Institute of Health et la Fondation Lavoisier.

Juin 1998: **Doctorat de Génétique et physiologie des microorganismes** à l'Université Paris XI Orsay. Contrôle des antiterminateurs bactériens par phosphorylations multiples chez *Bacillus subtilis*. Mention très honorable avec les félicitations du Jury. Thèse financée par le Ministère de la Recherche.

1993-1995: Volontaire à l'Aide Technique. Etude de la susceptibilité génétique au diabète insulino-dépendant sur l'île de La Réunion. Centre Hospitalier Départemental Félix Guyon. St Denis de La Réunion. Financement INSERM.

Juin 1992: D.E.A. de Génétique et physiologie des microorganismes à l'Université Paris XI Orsay. Régulation de l'expression de la lévane-saccharase par antiterminaison chez *Bacillus subtilis*. Mention très bien.

2-Compétences techniques.

Entomologie: Élevage de moustiques (*Culex pipiens* et *Aedes albopictus*), de papillons (*Hypolimnas bolina*) et de tiques (*Rhipicephalus sanguineus*). Analyse des phénotypes associés à *Wolbachia* (Incompatibilité Cytoplasmique et Male Killing). Diagnose morphologique et moléculaire

Biologie moléculaire et Microbiologie: Clonage par hybridation sur colonies, complémentation fonctionnelle, PCR, transduction. Mutagenèse aléatoire et dirigée, séquençage manuel et automatique, southern-, western-, northern-blotting.

Biochimie : Production et purification de protéines hybrides -GST ou -poly histidine. Etude d'interactions protéine/protéine, protéine/ARN, protéine/ADN par gel retard, Bia Core ou chromatographie. Chromatographie sur couche mince, HPLC, FPLC.

Génétique humaine: Constitution d'une banque d'ADN et mise au point du typage génétique des *loci* HLA-DQ et -DR par PCR/RFLP.

3-Langues étrangères.

Trilingue français, anglais et espagnol.

4-Obtention de financements dans le cadre de programmes de recherche

La recherche de financements pour les activités de recherche est une activité chronophage et sans laquelle pourtant il est à peu près impossible d'être opérateur de recherche, sauf à développer des thématiques qui ne nécessitent ni consommable, ni équipement. J'ai activement participé à l'écriture de projets visant à structurer la recherche au CRVOI et à développer un réseau régional de coopération ; je ne présenterai ici que les projets ayant trouvé un financement et pour lesquels ma contribution a été substantielle.

4-1 Faune Sauvage Océan Indien (FS-OI). 2010-2012. Coordinateur: K. Dellagi.

Le Sud Ouest de l'Océan Indien constitue un carrefour de voies de circulation (commerciales, humaines et animales) reliant les continents africain, européen et asiatique. Les données épidémiologiques disponibles pour la région sont fragmentaires et le plus souvent anciennes. Par conséquent, elles ne permettent pas d'évaluer avec précision les risques encourus, ni de décrire les conditions d'émergence des pathologies présentes ou pouvant être introduites. On ne peut donc ni définir ni mettre en place une politique de prévention adaptée. Le projet FS-OI avait pour objectif principal d'apporter une connaissance plus précise des risques posés par les agents pathogènes présents à l'échelle régionale via l'identification des réservoirs animaux et des vecteurs arthropodes assurant le passage de certains de ces agents à l'homme ou à l'animal domestique. J'étais responsable du volet entomologique de ce programme d'un montant de 1 Million d'Euros.

4-2 RegPot RunEmerge. 2010-2013. Coordinateur: K. Dellagi

Le Programme Regpot n'est pas un programme de recherche à proprement parler mais un programme de développement de capacités. Ce programme, qui a nécessité un engagement important d'Hervé Pascalis et de moi-même autour de Koussay Dellagi, a été conçu pour faciliter ou accélérer le développement des capacités de recherche sur les maladies émergentes de l'Université de La Réunion et des Centres de Recherche qui lui sont adossés. Ce programme, d'un montant de 1,8 Million d'Euros, a permis de recruter 8 chercheurs post-doctorants dont ont pu bénéficier le Pôle de Protection des Plantes du CIRAD, le laboratoire ECOMAR, le GRI et le CRVOI. Il a permis de mettre en place des déplacements de chercheurs vers La Réunion et de La Réunion vers l'Europe ou vers les pays de la région, et ainsi faciliter la mise en place de collaborations scientifiques entre plusieurs équipes réunionnaises et des chercheurs internationaux.

4-3 LeptOI. 2012-2014. Coordinateur : P. Tortosa

Le programme LeptOI a naturellement suivi le programme Faune Sauvage qui avait pour objectif de mettre en évidence la circulation d'agents infectieux, dont des leptospires pathogènes, dans la faune sauvage régionale. Ce projet résulte également d'une mission de prospection réalisée par le CRVOI entre Aout 2007 et Aout 2008 auprès de l'ensemble des pays partenaires de l'Océan Indien. La Ministre de la Santé des Seychelles

en poste à cette date, avait déclaré considérer la leptospirose comme la pathologie à explorer en priorité en raison de sa morbidité et mortalité élevées dans ce pays. Cette priorité a été confirmée lors de l'atelier régional sur la recherche sur les maladies infectieuses d'importance régionale, qui s'est déroulé en septembre 2008 au CRVOI. Les données cliniques bien que parcellaires montrent un caractère contrasté de l'épidémiologie de l'infection dans la région OI, au niveau de l'incidence de la maladie humaine, de la prévalence de l'infection animale, de la diversité des sérogroupes et des espèces réservoirs. Le projet vise à comprendre les déterminants de cette épidémiologie contrastée en investiguant simultanément La Réunion et les Seychelles au travers d'une approche moléculaire et spatiale. Ce projet multidisciplinaire, d'un montant de 530 000 Euros, utilise le réservoir *Rattus* comme marqueur de l'infectiosité des paysages.

4-4 Genoticks. 2012. Coordinateur: H. Pascalis et P. Tortosa.

Ce programme, s'il est modeste par le financement qu'il a généré (3200 Euros-Fédération Environnement Biodiversité Santé), nous permet de tester les techniques de séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing ou NGS) dans la détection exhaustive de microbiomes (diversités bactérienne et virale). Nous avons jusqu'à présent appliqué des méthodes conventionnelles de détection par PCR et, pour la virologie, mise en culture, dans la détection de microbes infectieux. Ces méthodes nous ont permis de mettre en évidence de nombreux agents infectieux viraux (Paramyxovirus, Virus Hépatite E, Influenza, Tick Borne Flavivirus) bactériens (Leptospires, Rickettsies) ou Eucaryotes (Leucocytozoon, Plasmodium). Nous avons complété cette approche ciblée par une approche non ciblée utilisant les technologies de nouvelles génération de séquençage. Ce programme teste la puissance de l'approche sur des échantillons de tiques collectées sur les Îles Éparses et à La Réunion, tiques pour lesquelles nous avons pu mettre en évidence des co-infections virale (Tick Borne Flavivirus) et bactérienne (Rickettsies).

4-5 Exploring Genetic, Molecular, Mechanical and Behavioural of Sex Separation in Mosquitoes. 2013-2017. Coordinateur: P. Tortosa.

Cet appel à projet lancé par l'Agence Internationale à l'Énergie Atomique (AIEA), vise à développer des outils de sexage nécessaires à la mise en place, en phase opérationnelle,

de stratégies innovantes de contrôle vectoriel notamment la technique de l'insecte stérile (TIS) et la technique de l'insecte incompatible (T2I). Notre tâche, dans ce projet, est de construire une lignée *Aedes albopictus* homozygote pour le marqueur *rdl^R*, conférant une résistance à la dieldrine, qui sera nécessaire à la construction subséquente d'une lignée transloquée ayant un marqueur de résistance insecticide lié au locus sexuel. Ce financement, d'un montant de 10 000€ renouvelable chaque année pendant 5 ans, nous a permis de nous insérer dans le réseau des laboratoires collaborant avec l'AIEA, et de renforcer la thématique de l'insecte incompatible dans ce réseau.

4-6 ANR Blanche ESPEVEC. 2014-2017. Coordinateur : Karen McCoy.

Ce projet vise à investiguer les facteurs historiques et contemporains qui influencent l'évolution de la spécialisation d'hôte chez les organismes vecteurs. Dans le cadre de ce projet, nous étudierons plus particulièrement et par des approches de PCR les infections *Coxiella* dans les tiques d'oiseaux marins (mises en évidence par le projet Genoticks) et en particulier les interactions de ces bactéries avec d'autres bactéries infectant massivement les tiques d'oiseaux marins telles que les Rickettsies.

5-Collaborations.

Partenaires locaux et régionaux (et implications/programme de recherche):

Frédéric Pagès : Médecin épidémiologiste, CIRE (épidémiologie humaine de la leptospirose/ Lept-OI)

Jean-Sébastien Dehecq, entomologiste responsable du Service de LAV, ARS (études de la résistance insecticide et de l'Incompatibilité Cytoplasmique sur le terrain/TIS)

Vincent Herbreteau : CR UMR Espace-Dev (investigation du risque leptospirose par des approches spatiales/LeptOI)

Alain Michault, Chef de Service Biologie, CHU Sud (sérologie de la leptospirose/Lept-OI)

Matthieu Le Corre, Ecomar, Pr. Université de La Réunion (PathOrnothoTiques, Genoticks)

Partenaires nationaux :

Mylène Weill : DR ISEM, Montpellier, France (Incompatibilité Cytoplasmique et résistance/TIS)

Olivier Duron : CR MIVEGEC, Montpellier, France (Endosymbiose/Genoticks)

Philippe Parola : PUPH, URMITE, Marseille (Rickettsies/Genoticks)

Cristina Socolovschi : PH URMITE (Rickettsies /Genoticks)

Karen McCoy : CR MIVEGEC, Marseille (bactéries pathogènes et tiques d'oiseaux marins/Genoticks)

Partenaires internationaux :

Steve M Goodman : Field Museum of Chicago, USA (mammalogie /Faune Sauvage)

Rudy Hatskeerl : Royal Tropical Institute, Amsterdam, Netherlands (Leptospirose/Lept-OI)

Wanda Markotter : University of Pretoria, South Africa (chiroptères et leptospires / LeptOI)

Carl W Dick : University of Kentucky, USA (ectoparasites de chauves-souris/faune sauvage)

Anne Laudisoit : University of Liverpool, GB (Systématique des siphonaptères)

Maurizio Calvitti : CR ENEA, Rome, Italie (Technique de l'Insecte Incompatible/TIS)

II-Publications

J'ai rédigé ou participé à la rédaction de 23 articles publiés dans des journaux à comité de lecture. Quelques données bibliométriques sont données dans le tableau 1:

Nombre de publications dans des revues à comité de lecture	23
Nombre de citations	543 (max. de citations pour 1 article : 91)
Facteur d'impact moyen (calculé sur la base de l'IF sur 5 ans donné par ISI Web of knowledge)	4,7
Nombre de signatures en 1 ^{er} ou 2 ^{ème} auteur	16
Nombre de signatures en dernier ou avant dernier auteur	3
H index	13

Tabl
eau

1 : Production scientifique dans des journaux à comités de lecture

- 1- Gomard Y, Silai R, Hoarau G, Bon K, Gonneau F, Yssouf A, Michault A, Dellagi K and **Tortosa P**. Serological evidence of *Leptospira* infection in human populations in the Union of the Comoros. *Emerg. Infect. Dis.* Sous presse. (IF=6,3)
- 2- Séré M, **Tortosa P**, Turquet J, Quod JP, Chabanet P, and Schleyer M (2013). Bacterial communities associated with Porites white patch syndrome (PWPS) on three Western Indian Ocean (WIO) coral reefs. *PLoS One* (Sous presse). (IF=4,2)
- 3- **Tortosa P**, Dsouli N, Gomard Y, Ramasindrazana B, Dick C W, Goodman S M. 2013. Evolutionary history of Indian Ocean nycteribiid bat flies mirroring the ecology of their hosts. *PLoS One*. 8, e75215. (IF=4,2)
- 4- Stachurski F, **Tortosa P**, Rahajarison P, Jacquet S, Yssouf A, Huber K. 2013. Recent data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean Islands. *Vet. Research*. 44, 79 (IF=3,8)

- 5- Lagadec E, Gomard Y, Guernier V, Dietrich M, Pascalis H, Temmam S, Ramasindrazana B, Goodman SM, **Tortosa P**, Dellagi K. 2012. High infection rates and diversity of pathogenic *Leptospira* in bats from Comoros and Madagascar. *Emerg. Infect. Dis.* 18 (10) 1696-98. (IF=6,3)
- 6- **Tortosa P**, Pascalis H, Guernier V, Cardinale E, Le Corre M, Goodman SM, Dellagi K. 2012. Deciphering arboviral emergence within insular ecosystems. *Infect. Gen. Evol.* Apr 4 [Epub ahead of print]. (IF=3)
- 7- Atyame C M, Duron O, **Tortosa P**, Pasteur N, Fort P and Weill M. 2011. Multiple Wolbachia determinants control the evolution of cytoplasmic incompatibilities in *Culex pipiens* mosquito populations. *Mol. Ecol* 20:286–298. (IF=6,8)
- 8- Atyame CM, Pasteur N, Dumas E, **Tortosa P**, Tantely ML, Pocquet N, Licciardi S, Bheecarry A, Zumbo B, Weill M, and Duron O. 2011. Cytoplasmic Incompatibility as a Means of Controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* Mosquito in the Islands of the South-Western Indian Ocean. *PLoS Negl Trop Dis* 5:e1440. (IF=5)
- 9- Dellagi K., Rollot O., Temmam S., Salez N., Guernier V., Pascalis H., Gérardin P., Fianu A., Lapidus N., Naty N., **Tortosa P.**, Boussaïd K., Jaffar-Banjee M-C., Filleul L., Flahault A., Carrat F., Favier F., de Lamballerie X. (2011) Pandemic Influenza due to pH1N1/2009 Virus: Estimation of Infection Burden in Reunion Island Through a Prospective Serosurvey, Austral Winter 2009. *PLoS One* 6(9) : e25738. (IF=4,2)
- 10-Yssouf A., Lagadec E., Bakari A., Foray C., Stachurski F., Cardinale E., Plantard O., **Tortosa P.** (2011) Colonization of Grande Comore Island by a lineage of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasit Vectors* 14(1):38. (IF=3,3)
- 11-**Tortosa P**, Charlat S, Labbé P, Dehecq JS, Barré H and Weill M. (2010) Wolbachia age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: a host evolutionary response to Cytoplasmic Incompatibility? *PLoS ONE* (2010) 5(3): e9700. (IF=4,2)
- 12-Tantely ML, **Tortosa P**, Alout H, Berticat C, Berthomieu A, Rutee A, Dehecq JS, Makoundou P, Labbé P, Pasteur N, Weill M. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Réunion Island. *Insect Biochem Mol Biol.* (2010) Feb 24. 40:4, 317-324. (IF=3,6)
- 13-**Tortosa P**, Courtiol A, Moutailler S, Failloux AB, Weill M. Chikungunya-*Wolbachia* interplay in *Aedes albopictus*. *Insect Mol Biol.* (2008) Dec;17(6):677-84. (IF=2,8)

- 14-Charlat S, Engelstadter J, Dyson EA, Hornett EA, Duplouy A, **Tortosa P**, Davies N, Roderick GK, Wedell N and Hurst GD. Competing selfish genetic elements in the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Curr Biol*, (2006) 16(24): p. 2453-8. (IF=10,4)
- 15-Hoa TT, **Tortosa P**, Albano M, Dubnau D. *Rok (YkuW)* regulates genetic competence in *Bacillus subtilis* by directly repressing *comK*. *Mol Microbiol*. (2002) Jan;43(1):15-26. (IF=5,1)
- 16-**Tortosa P**, Declerck N, Dutartre H, Lindner C, Deutscher J, Le Coq D. Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators LicT and SacY. *Mol Microbiol*. (2001) Sep;41(6):1381-93. (IF=5,1)
- 17-**Tortosa P**, Logsdon L, Kraigher B, Itoh Y, Mandic-Mulec I, Dubnau D. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *J Bacteriol*. (2001) Jan;183(2):451-60. (IF=3,6)
- 18-**Tortosa P**, Albano M, Dubnau D. Characterization of *ylbF*, a new gene involved in competence development and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*. (2000) Mar;35(5):1110-9. (IF=5,1)
- 19-**Tortosa P**, Dubnau D. Competence for transformation: a matter of taste. *Curr Opin Microbiol*. (1999) Dec;2(6):588-92. (IF=8,1)
- 20-Piazza F, **Tortosa P**, Dubnau D. Mutational analysis and membrane topology of ComP, a quorum-sensing histidine kinase of *Bacillus subtilis* controlling competence development. *J Bacteriol*. (1999) Aug;181(15):4540-8. (IF=3,6)
- 21-**Tortosa P**, Aymerich S, Lindner C, Saier MH Jr, Reizer J, Le Coq D. Multiple phosphorylation of SacY, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J Biol Chem*. (1997) Jul 4;272(27):17230-7. (IF=5)
- 22-Feugeas JP, **Tortosa P**, Dulay S, Augustin-Pascalis I, Charron D, Krishnamoorthy R, Caillens H, Montchamp-Moreau C. Analysis of HLA haplotypes in families with type 1 diabetes mellitus in La Réunion island. *Eur J Immunogenet*. (1996) Dec;23(6):459-70. (IF=2,1)
- 23-**Tortosa P**, Le Coq D. A ribonucleic antiterminator sequence (RAT) and a distant palindrome are both involved in sucrose induction of the *Bacillus subtilis* *sacXY* regulatory operon. *Microbiology*. (1995) Nov;141 (Pt 11):2921-7. (IF=2,9)

III- Présentations orales

1. Septembre 2013 : Conférence de la Société Internationale sur la Leptospirose, Fukuaka, Japon. *A glimpse at viral and bacterial dynamics in a bat maternity enlightens pathogen maintenance in wild life.*
2. Septembre 2013 : Coordinated Research Project on the exploration of molecular, mechanical and behavioural methods of sex separation in mosquitoes, AIEA, Vienne, Autriche. Towards the construction of a Genetic sexing strain in *Ardes albopictus* : construction of a Rdl homozygous line.
3. Janvier 2012. Journée Scientifique du réseau SEGA , Antananarivo. *Leptospira et leptospiroses dans le Sud-Ouest de l'Océan Indien.*
4. Novembre 2011. Journées Scientifiques Run-Emerge, Université de La Réunion. *Cytoplasmic incompatibility as a means of controlling Culex pipiens quinquefasciatus mosquito in the islands of the south-western Indian Ocean.*
5. Novembre 2011. Conférence organisée par la Société française de parasitologie : Circulation des zoonoses et des parasitoses dans l'Océan Indien. Académie de Médecine de Madagascar. *Systèmes insulaires et investigation des phénomènes d'émergence.*
6. Décembre 2007. Conférence -Chikungunya et autres arboviroses émergentes en milieu tropical. St Pierre de La Réunion. *Le moustique Aedes albopictus et ses bactéries endosymbiotiques Wolbachia : des interactions mutualistes perturbées par le virus Chikungunya?*
7. Novembre 1999. New England Spore conference. Massachusetts Institute of Technology. *The competence pheromone system in Bacilli*
8. Novembre 1998. New England Spore conference. Massachusetts Institute of Technology. *Cloning and functional analysis of ylbF, a new gene involved in B. subtilis sporulation*

Deuxième partie : Activités d'enseignement

I-Enseignement.

Maître Auxiliaire en Collège et Lycée

J'ai eu l'occasion d'exercer en tant qu'enseignant en Sciences de la Vie en Collège et Lycée en Polynésie française. Cette expérience, courte puisqu'elle n'a duré que le temps d'une année scolaire a été néanmoins enrichissante à plus d'un titre : s'il est plutôt aisé d'enseigner à des élèves de lycée ou de 3^{ème} car ceux ci sont en attente d'un savoir académique, les élèves plus jeunes n'ont en revanche vis-à-vis des Sciences aucune attente, ni même, il faut en convenir, aucun intérêt particulier. Il m'a fallu alors sortir d'un enseignement purement transmissif pour chercher à éveiller chez eux une curiosité pour les sciences, leur faire comprendre que les sciences n'étaient pas confinées à des ouvrages abscons mais faisaient partie intégrante de leur univers. Cet exercice, difficile, s'est soldé par des échecs cuisants comme par des réussites savoureuses. J'ai pu motiver ces élèves, globalement peu concentrés, en reliant les sciences à leur environnement proche. Les notions de métabolisme ont été traitées par une mise en perspective des problèmes aigus d'obésité rencontrés dans la société polynésienne, l'astronomie a été étudiée en parallèle avec les légendes polynésiennes retraçant l'histoire du peuplement de ces îles, des notions d'écologie ont pu être abordées par l'étude des espèces animales ou végétales introduites dans ces systèmes insulaires fragiles, ou encore par l'étude du corail et plus généralement de l'écosystème lagonnaire.

Monitorat

J'ai été chargé d'assurer les Travaux Dirigés pour les élèves de 1^{ère} année à l'Institut National agronomique Paris-Grignon. Cette responsabilité m'a été confiée lors de mes deuxième et troisième années de thèse par Claude Gaillardin, en charge à l'INA-PG de l'enseignement en Génétique aux élèves de 1^{ère} année. Le programme englobait des notions de génétique formelle et moléculaire.

Responsabilités d'enseignement en tant que maître de Conférences à l'Université de La Réunion.

Depuis mon recrutement en tant que Maître de Conférences à l'Université de La Réunion, Le Département de Biologie m'a confié l'organisation de 2 Unités d'Enseignement : l'UE

d'Entomologie et Virologie du M1 Biodiversité et EcoSystèmes Tropicaux (BEST), et l'UE de Biologie Cellulaire de L3 SVT.

UE Entomologie et Virologie : Pour des raisons historiques, cette UE est axée sur les insectes d'intérêt agricole et sur les virus des plantes. Sa maquette a été réalisée après la crise du Chikungunya et reprend les thématiques de recherche abordées essentiellement par les chercheurs du CIRAD 3P. Suite à mon recrutement à l'Université, j'ai intégré un enseignement consacré à l'Évolution de la résistance insecticide chez les insectes et à la biologie et à l'utilisation des bactéries endosymbiotiques *Wolbachia* pour le contrôle de populations d'insectes. A l'occasion de la préparation de la prochaine maquette en 2014, l'offre d'enseignement de cette UE sera refondue notamment pour tenir compte de l'évolution de la recherche à La Réunion, et en particulier de la création du CRVOI. Il s'agira donc d'élargir le champ de la virologie aux virus animaux, et plus généralement, à inclure les parasites eucaryotes et procaryotes. Dans la nouvelle maquette, en cours d'élaboration, l'étude de l'effet des infections sur les traits d'histoire de vie ainsi que l'intégration du microbiome des arthropodes hôtes sera proposée. Ces modifications substantielles viseront à introduire l'investigation de la diversité microbienne insulaire, y compris les agents pathogènes, et tropicale au sein du Master BEST. En ce qui concerne les agents pathogènes cette nouvelle UE pourra aborder l'écologie de la santé en s'appuyant sur un nombre grandissant de travaux de recherche qui s'intéressent à cette thématique dans la région.

UE Biologie Cellulaire : Cet enseignement vise à exposer les expérimentations et réflexions scientifiques qui ont permis aux chercheurs de décrypter les principaux acteurs et verrous du cycle cellulaire. Les aspects mécanistes de la transduction de signal sont abordés en séances de Travaux Pratiques consacrés aux systèmes de transductions de signaux bactériens à 2 composants. Les étudiants, en utilisant des souches de *B. subtilis* que j'ai construites durant mon post doctorat, montrent que les bactéries sécrètent une phéromone qui active de manière spécifique un récepteur initiant le développement de la compétence et de la sporulation.

II-Encadrement d'étudiants

Barbara Kraigher : David Dubnau m'a confié durant mon post-doctorat l'encadrement de Barbara Kraigher, une étudiante slovène inscrite en deuxième année de Master à la New York University. Je l'ai initiée durant son stage aux techniques de biologie moléculaire et de génétique des *Bacillaceae*. Elle a pu cloner, par des méthodes génétiques, puis obtenir les séquences de l'opéron *comQXP*, codant notamment le censeur et le régulateur d'un

système à deux composants sensible aux densités bactériennes (« quorum sensing ») chez une dizaine d'espèces du genre *Bacillus*. Elle a valorisé ce travail en co-signant un article scientifique (Tortosa *et al.*, 2001b).

Amina Yssouf: Amina a effectué son stage de Master 2 (Master International d'Entomologie Médicale et Vétérinaire, Cotonou) au laboratoire sous ma direction. Elle a mis en évidence la colonisation de l'ensemble de l'île de Grande Comore par la tique *Rhipicephalus appendiculatus* et son absence sur les îles voisines d'Anjouan et de Mohéli. Cette distribution est corrélée avec une épidémie de theilériose ayant durement frappé en 2004 la Grande Comore uniquement. Son travail a également permis de mettre en évidence l'introduction d'une espèce nouvelle pour les Comores, *Rhipicephalus evertsi*, et plus généralement confirmé l'importance du flux de bétail entre la Tanzanie et la Grande Comore dans la colonisation de vecteurs et, vraisemblablement, d'arbopathogènes zoonotiques. Amina prépare actuellement son Doctorat dans le laboratoire de Philippe Parola, Doctorat pour lequel je suis co-encadrant. Amina s'intéresse aux infections de son échantillon de tiques par les Rickettsies et continue à contribuer, à travers le Laboratoire du Plan National de Lutte contre le Paludisme de Moroni, à des actions d'échantillonnage que le CRVOI mène aux Comores. Le travail de Master d'Amina a fait l'objet d'un article scientifique (1).

Yann Gomard : Dans le cadre de son stage de Master 2 (BEST-Université de La Réunion) Yann a étudié les processus de diversification des simules réunionnaises. Il a rejeté une hypothèse précédemment proposée de colonisation multiple à partir d'une espèce continentale source, suivie de diversification *in situ*. Son analyse a permis de montrer que les 3 espèces échantillonnées étaient issues de colonisations successives à partir de 3 espèces formées avant l'émergence de La Réunion. Ce travail se poursuit en collaboration avec Josselin Cornuault, de l'Université Paul Sabatier, qui déchiffre les chaînes de transmission et histoires évolutives d'hémoparasites aviaires transmis par ces mouches aux oiseaux endémiques du genre *Zosterops*. L'Ecole Doctorale STS de l'Université de La Réunion a accordé une bourse à 1 sujet que nous avons proposé sur l'étude de la transmission des leptospires chez les chauves souris malgaches. Yann a été retenu par l'Ecole Doctorale et a entamé un Doctorat en octobre 2012. Ce doctorat, que je co-encadre, est réalisé sous la direction de Koussay Dellagi.

Giovédie Stanislas et Stanislas Zafihita : J'essaie de prendre en charge chaque année des étudiants de Master 1 B4 de l'Université de La Réunion, auxquels je confie le soin de suivre de manière longitudinale l'évolution de la résistance insecticide chez les moustiques à La Réunion. Une étude que nous avons menée conjointement avec l'ARS et l'Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, a montré que le moustique *Cx. pipiens* exprime des niveaux de résistance élevés à toutes les familles d'insecticides testées (2). L'un des résultats les plus inattendus a été la mise en évidence de fréquences extrêmement élevées de l'allèle *rdl^R*, conférant une résistance à la dieldrine. Les patrons de résistance montrent des niveaux de résistance proches de la fixation au Parc de la Providence et une absence d'allèle résistant chez les moustiques collectés en altitude (Plaine des Palmistes). Le maintien de telles fréquences *rdl^R* pourrait être lié à une pression de sélection actuelle ou, alternativement, résulter d'un maintien par dérive génétique en l'absence de coût génétique important associé à la résistance. Ces 2 hypothèses sont testées par les étudiants qui suivent les fréquences de moustiques résistants (*Aedes albopictus* et *Culex quinquefasciatus*) à partir d'un échantillonnage mensuel sur 3 sites au niveau de la mer et 3 sites d'altitude à l'aplomb des sites côtiers.

Nassoi-Yhoudine Abdallah et Tovo Rakovatra : Dans le cadre de leur stage de M1 BEST, ces étudiants ont exploré l'effet que peuvent avoir des infections chez les animaux réservoirs. Il est communément admis qu'un réservoir est une espèce infectée par un agent infectieux sans que cette infection n'ait de coût apparent pour l'hôte vertébré. Nous disposons au laboratoire d'une biobanque conséquente constituées des tissus prélevés chez plus de 1000 animaux pour lesquels les données morphométriques ont été relevées sur le terrain et la détection d'agents infectieux réalisée au laboratoire. L'ensemble de ces données, compilée sur une base de données a permis d'explorer ce sujet et a mis en évidence des effets de certaines infections sur des caractères morphométriques des hôtes. Il s'agit maintenant d'affiner cette étude en utilisant les variables morphométriques des crânes de manière à mettre en évidence des assymétries crâniennes associées à ces infections.

III-Encadrement de Post-Doctorants

J'ai encadré au CRVOI 4 Post Doctorantes financées pendant 24 mois par le programme Faune sauvage Océan indien (Najla Dsouli), FP7 RegPot RunEmerge (Célestine Atyame et Muriel Dietrich) et LeptOI (Vanina Guernier).

Najla Dsouli a été recrutée à la suite d'un Doctorat qu'elle a effectué à Montpellier sous la direction du Pr. Gérard Duvallat et pendant lequel elle a étudié la phylogéographie des mouches Stomoxes. Elle a mis en œuvre une approche comparable pour résoudre l'histoire évolutive des mouches de la famille des Nycteribiidae, inféodées aux chauves souris malgaches et comoriennes (3), ainsi que la datation des introductions de souches virales influenza durant la pandémie de 2009 (4).

Célestine Atyame. Après avoir construit durant son Doctorat la lignée de moustiques *Cx. quinquefasciatus* incompatible avec les populations naturelles de l'Océan Indien (5, 6), sous la direction de Mylène Weill à l'Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier, Célestine a testé cette lignée en conditions semi naturelles à La Réunion. Les résultats tout à fait concluants nous ont conduit à baptiser cette lignée *Attila*. Nous poursuivons également cette approche sur l'espèce *Aedes albopictus* en collaboration avec Maurizio Calvitti, de l'ENEA en Italie. Ce Post Doctorat s'inscrit dans la continuité d'une collaboration pérenne avec l'équipe de Mylène Weill.

Muriel Dietrich s'intéresse à la dynamique des agents infectieux dans leur environnement. Elle s'est d'une part attachée à décrire les infections à *Rickettsia* chez les tiques d'oiseaux marins des îles Eparses et des Seychelles, dans la continuité des travaux qu'elle a mené au sein de l'équipe de Karen Mc Coy, à Montpellier (7). Son post-doctorat au CRVOI lui a permis de décrypter l'histoire évolutive des leptospires pathogènes dans la région océan indien grâce à la mise au point d'un génotypage MLST (Multilocus Sequence Typing).

Vanina Guernier, écologue de la santé, combine des approches moléculaires et spatiales (en collaboration avec l'UMR Espace-Dev où elle a réalisé ses travaux de Doctorat) pour déterminer les caractères infectiogènes des habitats. Les *Rattus* spp. sont ici utilisés comme marqueurs des habitats qu'ils contaminent.

Troisième partie : Activités de recherche

I-Travaux antérieurs

Introduction

Les travaux que j'ai réalisés durant mon Doctorat et mon Post Doctorat visaient à décrire les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la régulation de l'expression des gènes et, au delà, dans le développement des voies d'échappement au stress chez les bactéries. Ces travaux ont utilisé la bactérie modèle *Bacillus subtilis*, un organisme phare chez les bactéries Gram+ qui présente sur *Escherichia coli* l'avantage d'être naturellement transformable par de l'ADN exogène. Celui-ci est adsorbé à la surface de la paroi puis internalisé sous forme simple brin avant d'être recopié puis intégré dans le chromosome par recombinaison homologue. Ce processus, appelé compétence naturelle, permet de construire, en moins d'une semaine, des mutants nuls ou des fusions ciblées sur les gènes du chromosome circulaire. La compétence naturelle chez *B. subtilis*, dont j'ai étudié le contrôle génétique pendant mon post doctorat, a permis aux chercheurs de produire des résultats dont les plus saillants sont régulièrement publiés dans les revues de tout premier plan.

1. Biochimie et Génétique Bactériennes

J'ai accompli mes travaux de Doctorat entre 1995 et 1997 au Laboratoire de Génétique Microbienne de l'Institut National Agronomique Paris-Grignon, sous la direction du Dr. Dominique Le Coq. Je suis ensuite parti en post doctorat chez Dave Dubnau au Public Health Research Institute de New York. Pendant ma thèse et mon post doctorat, j'ai développé plusieurs approches pour étudier les mécanismes adaptatifs au stress déployés par la bactérie *B. subtilis*. Cette bactérie développe en fin de phase exponentielle une série de réponses parmi lesquelles la sécrétion d'enzymes cataboliques dans le milieu extérieur, le développement de la compétence naturelle et de la sporulation (8) ou encore la formation de biofilms (9). Ces réponses permettent aux bactéries en fin de phase exponentielle de contourner les conditions ne permettant plus la croissance –*When the going gets tough* (8)- en raison d'une carence carbonée ou de la présence d'un antibiotique, par exemple. La sécrétion d'enzymes cataboliques (lévane-saccharase, lévanease, etc.) permet à la bactérie de dégrader les sucres complexes présents dans le milieu extérieur en sucres simples qui peuvent ensuite être transportés dans la cellule (par les enzymes du Système Phospho Transférase) et

métabolisés, favorisant ainsi la croissance des bactéries sécrétrices. Le développement de la compétence naturelle et la formation de biofilms pourraient empêcher l'action de composés bactériostatiques ou bactéricides en permettant à *B. subtilis* d'acquérir un gène de résistance ou de former des structures résistantes à ces molécules (10). La sporulation, qui intervient en dernier lieu, permet à la fraction des bactéries sporulantes d'acquérir une structure particulièrement résistante à de nombreux traitements (dessiccation, rayonnements), une structure dormante qui permet aux bactéries d'attendre des jours meilleurs (8). Il n'est donc pas étonnant que ces voies soient mutuellement exclusives et étroitement co-régulées dans le temps. La sécrétion d'enzymes cataboliques et la compétence naturelle sont des fonctions dont le développement est initié en fin de phase exponentielle (T0), la sporulation intervient plus tardivement et les gènes de structures des acteurs principaux sont exprimés principalement 2h après le T0.

1-1. Régulation de la synthèse d'enzymes cataboliques

La lévane-saccharase est une enzyme catabolique sécrétée par *B. subtilis* en fin de phase exponentielle. Comme mentionné plus haut, la sécrétion de cette enzyme, codée par *sacB*, permet aux cellules de dégrader des sucres complexes présents dans le milieu et de poursuivre ainsi leur croissance. L'induction de *sacB* est contrôlée par un mécanisme d'anti terminaison de la transcription qui fait intervenir un terminateur de transcription rho-indépendant situé dans la région « leader » de l'ARN messager, à savoir entre le promoteur et les séquences codantes (11, 12):

- en absence d'inducteur, la transcription est initiée de manière constitutive mais le terminateur transcriptionnel situé dans la région leader se forme spontanément et entraîne un arrêt de la transcription en amont des séquences codantes.
- En présence d'inducteur, la protéine régulatrice *sacY* (également appelée Co Anti Termineur ou CAT) se fixe sur une cible (Ribonucleic Anti Terminator ou RAT) qui chevauche le terminateur de transcription (13). La formation du complexe CAT/RAT empêche la formation alternative du terminateur de transcription et conduit à la transcription et donc l'expression des séquences codantes en aval (cf Fig.1).

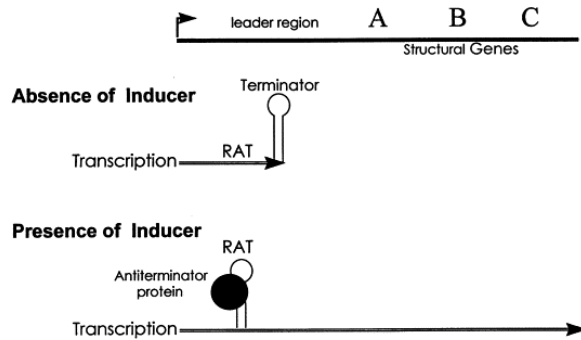


Figure 1 : mécanisme de régulation par anti terminaison (14)

Ce mode de régulation est contrôlé en amont par le Système Phospho transférase, un système de perméation phosphorylante des sucres typiquement bactérien faisant intervenir des enzymes générales impliquées dans la perméation de tous les sucres dits PTS, ainsi que des enzymes spécifiques à un ou à un nombre limité de sucres (15, 16). Ces deux familles d'enzymes ainsi que la cascade de phosphorylation mise en jeu lors de la perméation sont présentées dans la figure 2.

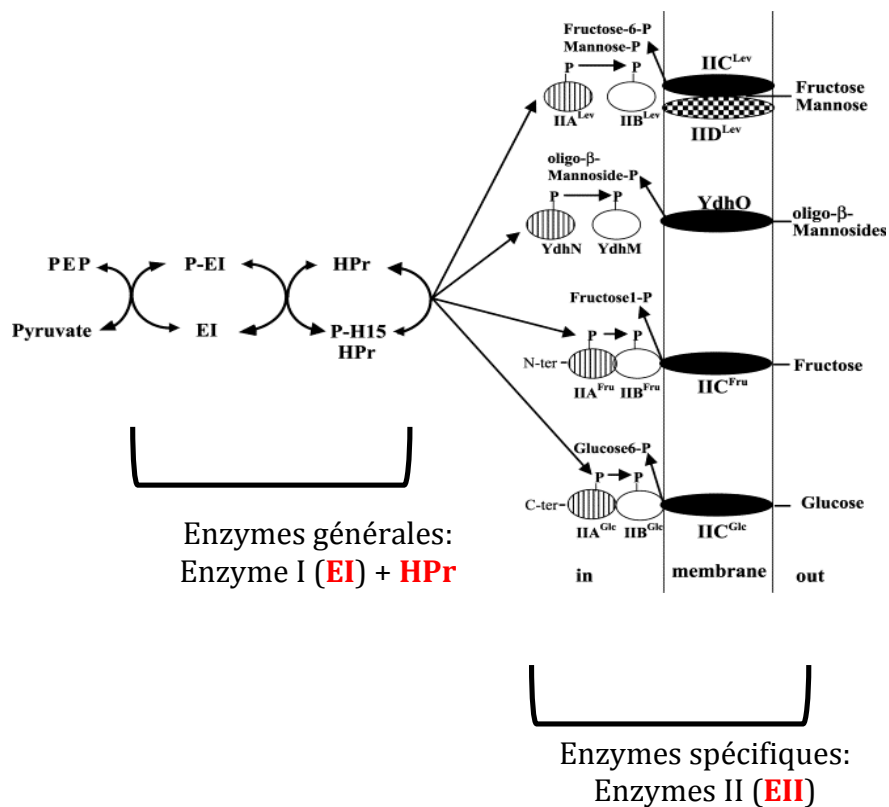


Figure 2 : Perméation des sucres par le PTS -d'après (17)

Les études génétiques antérieures avaient montré l'implication du PTS et d'un antiterminateur transcriptionnel, SacY, dans l'induction du gène codant la lévane-

saccharase (11). Je me suis d'abord attaché à étudier la régulation de l'expression du gène *sacY* (18), puis j'ai mis en évidence la cascade de phosphorylations *in vitro* à partir de protéines recombinantes. J'ai cloné puis surexprimé dans *E. coli* les gènes codant SacY et les enzymes générales (EI et HPr) du PTS. Ces protéines ont ensuite été mises dans différentes combinaisons, en présence de ³³PEP que j'ai synthétisé au laboratoire à partir de Pyruvate et d'orthophosphate radio marqué. J'ai pu ainsi montrer que les enzymes générales pouvaient phosphoryler directement l'antitermineur *in vitro*, contrairement à l'idée jusqu'alors reçue d'une phosphorylation requérant une EII phosphorylée (19).

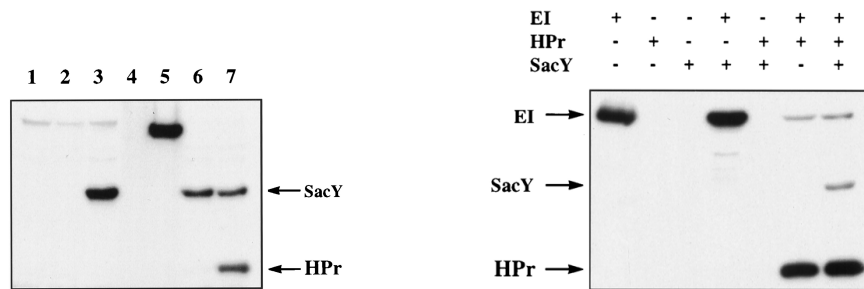


Figure 3 : Phosphorylation PTS-dépendante de l'antitermineur SacY. A : autoradiogramme montrant des protéines radio marquées par incubation du domaine CAT (piste 2) ou de SacY entière (pistes 3-7) en présence d'extraits bruts d'une souche pts+ (pistes 1-3), ptsI (piste 4) ou ptsH (pistes 6-7) supplémentée avec Hpr purifiée. B : Autoradiogramme montrant la phosphorylation de SacY par les enzymes générales du PTS.

La comparaison des structures secondaires de différents antitermineurs homologues à SacY montre une organisation en 3 domaines :

- un domaine effecteur de 55 acides aminés, ou domaine CAT, responsable de l'association au RAT (13);
- un domaine de régulation lui-même composé de la répétition d'un domaine d'environ 100 acides aminés appelé Phosphorylation Regulatory Domain (PRDs 1 & 2) (20).



Figure 4 : Organisation des antitermineurs bactériens

La comparaison des séquences des PRD révèle la présence de 2 histidines conservées sur chacun des PRD. La production et la phosphorylation de protéines SacY mutantes dans ces résidus a montré que SacY pouvait être phosphorylée sur ces 4 résidus Histidine (19). Des études *in vivo* ont permis de progresser dans la fonction de chacune de ces phosphorylations. La mesure des activités antiterminatrices de ces protéines mutantes sur un gène rapporteur montre que l'Histidine 1 est le siège du contrôle négatif de l'antitermineur par les PTS et que la phosphorylation des histidines du PRD2 par HPr-P ont un effet positif sur l'activité de la protéine (21).

Ces travaux se sont ensuite poursuivis dans plusieurs laboratoires étudiant des antitermineurs de la même famille et ont conduit à un paradigme selon lequel ces protéines sont régulées négativement par phosphorylation du PRD1, et positivement par phosphorylation du PRD2 (22, 23).

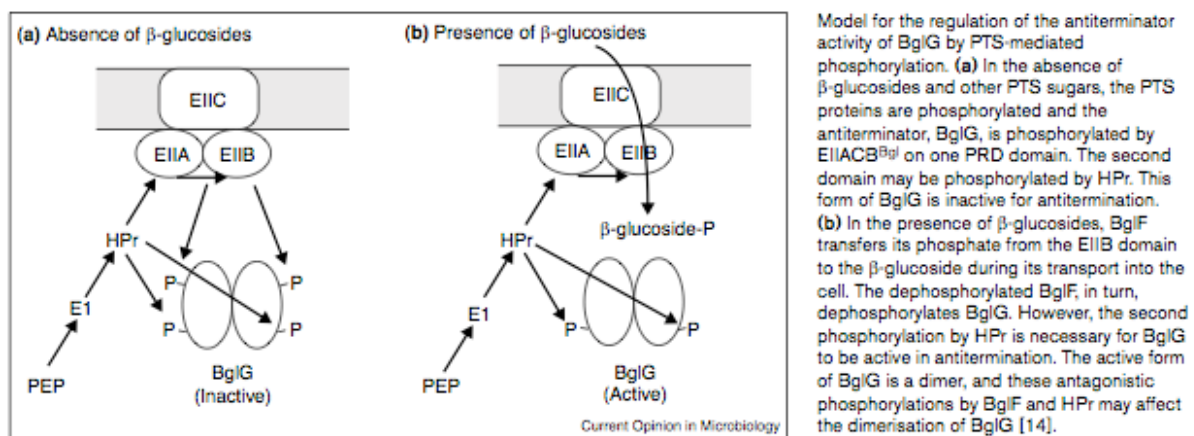


Figure 5 d'après (24)

1-2. Développement de la compétence naturelle et de la sporulation

J'ai poursuivi mon étude des mécanismes adaptatifs au stress chez *B. subtilis* lors d'un post doctorat au sein du groupe de David Dubnau qui s'intéresse plus particulièrement au développement de la compétence naturelle. En fin de phase exponentielle, *B. subtilis* exprime une machinerie protéique lui permettant d'internaliser et d'intégrer dans son génome de l'ADN exogène. L'expression de la compétence, la sécrétion d'enzymes cataboliques de même que le développement de la sporulation sont initialement déclenchés par un système phéromone/récepteur (ComX/ComP) qui rend compte de la densité bactérienne (*quorum sensing*). Les bactéries sécrètent une phéromone de

manière constitutive, celle-ci s'accumule alors dans le milieu jusqu'à atteindre une concentration seuil induisant l'activation du récepteur et le déclenchement en cascade des réponses adaptatives.

Pathways of competence regulation. (a) In *B. subtilis* a precursor pheromone (pre-X) encoded by *comX* is secreted, processed and modified with the participation of ComQ. ComP, a membrane-localized histidine kinase, detects extracellular ComX and activates the transcription factor ComA by phosphorylation. ComA~P activates the promoter that drives transcription of *comS*. ComS binds to a proteolytic apparatus causing the release of ComK, protecting the latter from degradation. ComK initiates the transcription of its own gene as well as that of the late competence genes. (b) In *S. pneumoniae* the pheromone precursor (pre-CSP) is encoded by *comC* and is processed and secreted by the action of the ComAB proteins. The pheromone is detected by the membrane-localized histidine kinase ComD, leading to the phosphorylation of ComE. ComE~P drives the transcription of the *comCDE* and *comAB* operons as well as that of *comX*. ComX is a minor sigma factor that appears to activate the transcription of the late competence proteins.

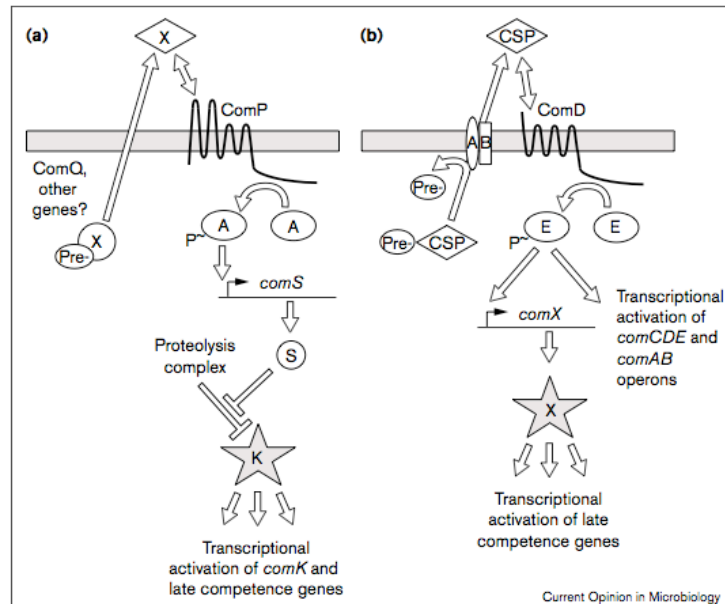


Figure 6 : contrôle de la compétence par quorum sensing (25).

Je me suis attaché à déterminer les niveaux de spécificité de ce système hormone/récepteur. En effet, ce système contrôle plusieurs processus dont la synthèse d'enzymes cataboliques, permettant à une communauté bactérienne de métaboliser des sucres complexes, et le développement de la compétence naturelle, qui va favoriser l'acquisition de caractères nouveaux. On peut postuler qu'une certaine spécificité est requise, déclenchant la sécrétion d'enzymes cataboliques en présence d'une certaine densité de bactéries *B. subtilis* et non en présence d'autres espèces. A l'inverse, le développement de la compétence naturelle n'a de sens que si les bactéries peuvent être transformées par de l'ADN différent de leur génome. J'ai étudié ce système phéromone/récepteur en établissant la topologie du censeur membranaire par expression *in vivo* de protéines hybrides (26) et en clonant les gènes codant la phéromone chez plusieurs espèces du genre *Bacillus*. J'ai pu montrer que chacune des phéromones était spécifique de son censeur ainsi que d'une enzyme de maturation, codée par *comQ* et dont la fonction n'est pas à ce jour élucidée. Par ailleurs, l'expression dans *Escherichia coli* des gènes codant la phéromone et son enzyme de maturation s'est révélée nécessaire et suffisante pour la production de phéromone biologiquement active

(27). Ce système de phéromones spécifiques constitue une barrière au flux de gènes car la compétence naturelle n'est déclenchée qu'en présence d'une forte densité de bactéries apparentées. Il s'ajoute à un deuxième frein au flux de gène constitué par le niveau d'homologie entre ADN transformant et ADN de l'hôte qui influence l'efficacité de la recombinaison homologue. Au-delà de la compréhension des phénomènes adaptatifs chez *B. subtilis*, l'ensemble de ces travaux a fourni des données permettant de mieux appréhender la nature des relations entre les micro-organismes apparentés ou non dans une même niche écologique (25).

Parallèlement à mon sujet de post-doctorat qui se focalisait sur l'étude du quorum sensing, Dave Dubnau m'avait proposé de cloner une banque de mutants stockée au laboratoire depuis plusieurs années. Le clonage de plusieurs mutants a permis de mettre en évidence l'existence de nouveaux gènes impliqués dans des régulations croisées des voies de développement de la compétence, de la sporulation et de la formation de biofilms (28, 29). A partir d'une banque de mutants de compétence et de sporulation obtenus par transposition et caractérisés par un phénotype spo- (colonies translucides après quelques jours d'incubation à température ambiante); j'ai cloné par la stratégie de « plasmid rescue » et caractérisé l'un des gènes qui bloque, par interaction protéine-protéine, le développement de la compétence et de la sporulation à un stade précoce. J'ai ensuite obtenu un mutant suppresseur en utilisant un transposon modifié (Mini Tn10). Parmi les gènes ainsi identifiés, certains jouent un rôle central dans le contrôle de la compétence et de la sporulation ainsi que dans d'autres processus tels que la formation de bio-films. Ils ont fait l'objet d'études ultérieures dans l'équipe de Dave Dubnau comme dans d'autres laboratoires (28, 30–32). L'un de ces gènes, Rok (répresseur of comK), joue un rôle central en contrôlant le niveau d'expression de ce régulateur clef dont le rôle dans le destin cellulaire a été élucidé par la suite: des expériences en immunofluorescence menées après mon départ ont montré qu'une fraction seulement de la population cellulaire entre en développement de la compétence. Ainsi, 10% des cellules expriment massivement ComK, l'activateur de la compétence, tandis que celui-ci reste indétectable chez la majorité des cellules (Fig 7) (33).

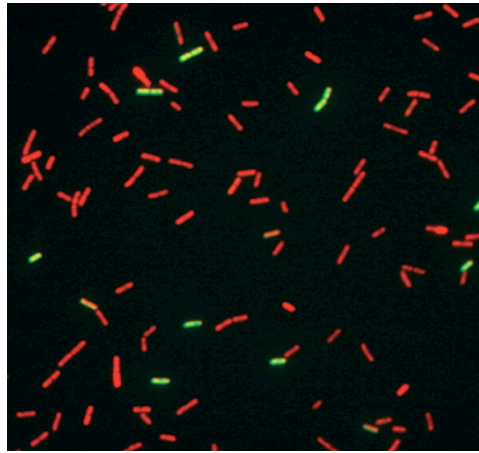


Figure 7 : distribution stochastique des destins cellulaires chez *Bacillus subtilis* d'après (33). Les cellules compétentes expriment massivement le régulateur ComK (en fusion -GFP) tandis qu'il reste indétectable chez 90% des cellules.

Il semble qu'il y ait une concentration seuil de ComK au delà de laquelle cet activateur transcriptionnel, via une loupe de rétro contrôle positif, engage la cellule vers une production massive d'activateur et le développement subséquent de la compétence. Le mutant *rok* se caractérise par une production massive de ComK dans l'ensemble de la population bactérienne. Chez les bactéries sauvages, ce gène code une protéine qui dirige ComK vers sa dégradation (28). Au delà du mécanisme de contrôle complexe mis en jeu et que mon travail de post-doctorat a permis de mettre en évidence, ce corpus de données a permis de montrer qu'une population d'origine clonale et cultivée dans un erlenmeyer explorait simultanément différentes voies de développement en condition de stress. Ce constat appelle une autre question qui a récemment trouvé sa réponse : les différentes voies sont elles mécaniquement exclusives ou y a-t-il une course qui conduit de manière aléatoire à un point de décision au delà duquel les voies alternatives sont alors, et alors seulement, irréversiblement bloquées ? Ces contrôles complexes participent à ce que David Dubnau a appelé une course moléculaire élégamment mise en évidence par imagerie cellulaire et montrant comment le gagnant verrouille le destin cellulaire après que la cellule ait basculé dans l'une ou l'autre des 2 voies de développement (34). Cette stochasticité dans le développement cellulaire a été comparé au développement d'organes sensoriels de certains insectes chez qui un déterminisme comparable est impliqué dans le développement des ommatidies ou des tissus olfactifs constitués de cellules sensorielles distribuées aléatoirement mais respectant la part de chaque type cellulaire dans l'organe. Une telle stratégie de développement implique qu'il

y ait génération et amplification de bruit (production de ComK chez *B. subtilis*) puis basculement vers l'une ou l'autre des deux directions, de manière irréversible. Chez les organismes unicellulaires, cette stochasticité permet une plasticité des cellules dans une population et des réponses multiples à des conditions de croissances changeantes. Chez les métazoaires, une interprétation consiste à dire qu'il s'agit d'un moyen parcimonieux d'organisation des tissus sensoriels dont le développement met en jeu un très grand nombre de gènes (33).

2. Interactions Bactéries-Insectes

J'ai découvert l'entomologie de manière ludique, en piégeant à travers les îles isolées du Pacifique Sud le papillon tropical *Hypolimnas bolina*. L'objet de l'étude était de répondre à des questions évolutives en caractérisant les infections *Wolbachia* des populations insulaires. J'ai ensuite rejoint le Bénin pour y suivre le Master International d'Entomologie Médicale et Vétérinaire et compléter ma culture entomologique, puis j'ai intégré l'équipe de Mylène Weill à l'Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier qui m'a accueilli à l'occasion de ce stage de master. Mon inscription au master a été financée par le Conseil Régional de La Réunion suite à l'épidémie de Chikungunya ayant sévi en 2005 et 2006 dans l'Océan Indien.

Les bactéries *Wolbachia* ont un mode de transmission trans-ovarien. Les mâles constituant des impasses évolutives, ces bactéries ont développé différentes stratégies qui ont en commun de favoriser la survie ou la reproduction des femelles infectées. Les *Wolbachia* infectant les arthropodes sont qualifiées de parasites sexuels car elles peuvent manipuler la reproduction de leur hôte de manière à favoriser la survie ou la fécondité des seules femelles infectées, ce qui facilite ainsi leur invasion dans les populations naturelles (35). Parmi ces manipulations, les *Wolbachia* peuvent provoquer l'arrêt du développement des embryons mâles (Male Killing ou MK). Un autre phénotype bien connu est l'Incompatibilité Cytoplasmique (IC), très répandu chez les moustiques et les mouches drosophiles. Dans son mode le plus simple, un mâle infecté va stériliser une femelle non infectée, mais deux individus infectés par des *Wolbachia* différentes peuvent également produire des croisements incompatibles *i.e.* présentant une forte mortalité embryonnaire (5).

2.1. Compétition entre IC et MK.

Hypolimnas bolina est un papillon à distribution Indo Pacifique, connu pour héberger une souche de *Wolbachia* conférant un phénotype MK et nommée le male killer *wBol1*. Les fréquences d'infection sont très variables entre des îles mêmes proches géographiquement (36). La rareté des mâles dans des îles à forte prévalence MK est corrélée avec une augmentation des taux de copulation des mâles et une diminution de leur investissement reproducteur. En d'autres termes, si l'on compare à une situation de sex ratio équilibré, les mâles dans les populations MK copulent plus fréquemment mais investissent une quantité de sperme moindre à chaque copulation. Un échantillonnage à l'échelle des îles de l'Océan Pacifique a permis également de mettre en évidence une deuxième infection, *wBol2*, conférant une IC, ces deux infections étant mutuellement exclusives sur le terrain (36).

2.2. Etude de l'infection *Wolbachia* chez les Culicidae.

Dans le cadre de mon stage de master réalisé à l'Institut des Sciences de l'Évolution de Montpellier, sous la direction de Mylène Weill, je me suis intéressé à différents aspects de l'infection par *Wolbachia* chez les moustiques. Ce travail visait (i) à caractériser l'infection *Wolbachia* chez *Aedes albopictus* et (ii) à mesurer l'effet du virus Chikungunya (CHIKV) sur la réplication de ces symbiotes. La première partie de mon travail a consisté à mettre au point les typages *Wolbachia* et à séquencer plusieurs gènes portés par WO, un prophage hébergé par la bactérie. Des études antérieures menées au laboratoire ont montré qu'il existe chez *Cx. pipiens* un polymorphisme très important sur les séquences WO (37). Nous avons donc séquencé plusieurs gènes WO chez plusieurs populations d'*Ae. albopictus* provenant de d'Afrique de l'Ouest et de différentes îles de l'Océan Indien. Il ressort que :

1-Le polymorphisme des gènes WO est très faible chez *Ae. albopictus* car une séquence identique a été observée chez tous les individus quelle que soit l'origine de la population. Ceci est en contraste avec les résultats observés chez *Cx. pipiens*.

2-Les moustiques sont co infectés par deux *Wolbachia* distinctes, *wAlbA* et *wAlbB*, dont les densités sont dépendantes du sexe et l'âge chez les mâles uniquement.

Ce dernier résultat rend compte des contraintes évolutives différentes imposées aux deux sexes. En effet, la perte d'une des 2 souches de *Wolbachia* chez une femelle a un coût élevé puisque cette femelle mono infectée sera stérilisée par les mâles majoritairement

bi infectés. En revanche, lorsqu'une des souches est perdue chez le mâle, un mâle mono infecté produira autant de descendants qu'un mâle bi infecté lors des croisements avec des femelles bi infectées (38).

3- L'infection des femelles par le CHIKV diminue les densités bactériennes, suggérant qu'il existe chez *Ae. albopictus* une compétition entre ces 2 parasites (39).

Je poursuis ce travail aujourd'hui au CRVOI au travers de collaborations initiées durant ce Master, et je pense en particulier à Mylène Weill et à Sylvain Charlat.

II-Travaux en cours

Introduction

J'ai rejoint le CRVOI en 2008. Ce centre de recherche a été créé à la suite de la crise du Chikungunya qui a durement touché les îles du Sud Ouest de l'Océan Indien. D'un point de vue de stratégie scientifique, la situation était originale : si l'objectif affiché était de s'intéresser aux pathogènes émergents, les sujets à développer et les méthodologies restaient à définir et couvraient potentiellement de nombreuses approches de la biologie, cellulaire ou évolutive. Prof. Koussay Dellagi, Directeur du CRVOI, a prôné le développement de thématiques pour lesquelles notre situation géographique était non pas un handicap mais un atout. L'écologie particulière de notre région découle de l'isolement géographique propre aux systèmes insulaires : endémisme élevé, richesse spécifique limitée et échanges inter îles ou entre îles et continent Africain limités.

Les travaux que je conduis au CRVOI s'appuient sur les caractéristiques des systèmes insulaires (40) et s'articulent autour de 2 axes thématiques: (i) le développement d'un outil innovant de lutte anti vectorielle et (ii) l'analyse phylogéographique des agents infectieux dans l'Océan Indien. L'équipe SIAVe (Systèmes Insulaires et Arthropodes Vecteurs) que j'anime, s'intéresse donc à la dynamique des microorganismes infectieux à transmission vectorielle et non vectorielle en systèmes insulaires. Ces thématiques tirent bénéfice de la situation insulaire régionale :

-La stratégie de lutte anti-vectorielle (LAV) contre *Cx. quinquefasciatus* utilisant *Wolbachia* est facilitée par la présence d'un seul groupe génétique de *Wolbachia* dans la région et par l'isolement géographique de ces îles océaniques qui limitent la colonisation par des *Wolbachia* génétiquement différentes provenant d'autres régions. En effet, il est possible de construire une lignée dont les mâles sont incompatibles avec l'ensemble des populations de l'Océan Indien. Par ailleurs, la colonisation par des moustiques exprimant un cytotype compatible avec notre lignée incompatible est limitée par l'isolement géographique de nos îles océaniques.

-La richesse spécifique faible, un endémisme élevé et une structuration des populations élevée entre les îles facilitent l'investigation de patho-systèmes originaux.

1. Utilisation des bactéries *Wolbachia* en Lutte Anti Vectorielle

Après la crise du Chikungunya et alors que le virus de la fièvre de la vallée du Rift circule encore activement à Madagascar, à Mayotte et aux Comores, les îles du Sud Ouest de l'Océan

Indien restent vulnérables à des arbovirus à fort potentiel épidémique tels que les virus de la Dengue (épidémique en 2011 sur l'île de Grande Comore) ou de l'encéphalite japonaise (41). Ces virus rencontreraient, notamment à La Réunion, une population humaine naïve et des vecteurs compétents pour leur transmission (i.e. *Aedes albopictus*, *Culex pipiens quinquefasciatus* et *Culex tritaenoryncus*). Face à ces risques, les services de Lutte Anti Vectorielle (LAV) de l'ARS-OI adoptent des mesures préventives de LAV basées notamment sur l'utilisation d'insecticides dont nous avons montré qu'ils ont favorisé la sélection de niveaux de résistance particulièrement élevés à La Réunion (2). Ces problèmes récurrents ont stimulé le développement de stratégies alternatives, tout au moins complémentaires de contrôle vectoriel. L'une de ces stratégies est la Technique de l'Insecte Stérile (TIS), développée au CRVOI depuis 2008 et ciblant le moustique *Ae. albopictus* a pour objectif de diminuer les densités des populations de moustiques via des lâchers de mâles préalablement stérilisés par irradiation (42). L'autre stratégie envisagée est l'utilisation des bactéries *Wolbachia* et en particulier le phénotype d'Incompatibilité Cytoplasmique (IC), largement répandu chez les culicidés. Cette incompatibilité peut être utilisée dans le développement de la Technique de l'Insecte Incompatible (ou T2I), technique dérivée de la TIS et consistant à lâcher des grandes quantités de mâles infectés par une souche incompatible de *Wolbachia* (appelés mâles incompatibles) afin de stériliser les femelles en populations naturelles (43). L'espèce *Cx. quinquefasciatus* est particulièrement adaptée au développement de la T2I car tous les moustiques appartenant à cette espèce sont naturellement infectés par diverses souches de *Wolbachia*, nommées souches *wPip*, pouvant induire des incompatibilités fortes entre populations naturelles. Célestine Atyame a construit une lignée infectée par *Wolbachia*, nommée *Attila* (anciennement LR[*wPip*(Is)]), dont les mâles induisent une stérilisation quasi-complète lorsqu'ils sont croisés en laboratoire avec des femelles de La Réunion, de l'île Maurice, de Madagascar, de Mayotte et de l'île Grande Glorieuse (6). Elle a montré par ailleurs qu'il n'existe aucun effet de l'infection *Wolbachia* sur la longévité et la compétitivité sexuelle des mâles *Attila*. Ces résultats encourageants ont stimulé la mise en place de tests en conditions semi naturelles qui ont confirmé la pertinence de cette approche pour le contrôle de *Cx. quinquefasciatus* (Atyame *et al*, en préparation). Parallèlement, nous développons la même stratégie chez *Ae. albopictus*, vecteur d'importance majeure dans les îles de l'Océan Indien, installé en Italie et actuellement en expansion en France métropolitaine mais également présent sur le continent Nord et Sud-américain et donc à risque d'introduction élevée aux Antilles françaises et en Guyane. L'utilisation de *Wolbachia* pour contrôler les populations d'*Ae. albopictus* reste un défi dans la mesure où, contrairement à *Cx. p.*

quinquefasciatus, l'IC n'est pas observée *in natura* chez cette espèce mais est générée via des transferts artificiels de *Wolbachia* provenant d'autres espèces hôtes. Afin de développer la T2I sur l'espèce *Ae. albopictus*, nous avons établi une collaboration avec Maurizio Calvitti de l'ENEA, qui a construit par injection d'une *Wolbachia* provenant de *Cx. pipiens* (44, 45), une lignée potentiellement incompatible avec les populations naturelles de l'Océan indien. Nous avons par rétro croisements successifs construit une lignée *Ae. albopictus* dont le fond génétique nucléaire est issu des populations naturelles de La Réunion, tout en étant infectée avec *wPip*, conférant une incompatibilité cytoplasmique avec les moustiques de l'Océan Indien. Nous comparons actuellement en laboratoire les performances des mâles *Ae. albopictus* incompatibles avec celle de mâles sauvages irradiés.

2. Histoire naturelle des agents infectieux dans les îles du Sud Ouest de l'Océan Indien.

La région Sud Ouest Océan Indien étant un hotspot de biodiversité, la plupart des espèces arthropodes hématophages et des agents microbiens infectieux qu'elle héberge est mal ou non décrite. Cette situation est intéressante d'un point de vue épidémiologique car elle permet l'investigation de pathosystèmes constitués en partie d'espèces endémiques (40), mais nécessite une description préalable des taxons d'intérêt. Nous nous sommes d'une part intéressés aux arthropodes vecteurs potentiels et à leur cortège bactérien, ainsi qu'à des bactéries pathogènes à transmission non vectorielle, les leptospires, en raison du problème de santé publique majeur que ces bactéries constituent dans la région.

2-1 Vecteurs arthropodes et cortèges bactériens

Nous nous sommes concentrés d'une part sur les ectoparasites hématophages (tiques, puces et mouches aptères de la famille des Nycteribiidae) des chiroptères qui constituent un réservoir largement étudié au laboratoire ainsi que sur les tiques inféodées à la faune sauvage et domestique. L'approche que nous menons sur ces différents taxons est comparable, à savoir (i) une caractérisation morphologique et moléculaire de ces arthropodes lorsque les données sont absentes dans la littérature, (ii) une analyse phylogénétique permettant de compléter les données morphologiques et d'éclairer l'histoire évolutive de ces vecteurs dans la région, et enfin (iii) une investigation des bactéries infectant ces arthropodes.

Notre démarche a consisté d'une part à développer des outils de diagnose morphologique et moléculaire lorsqu'ils étaient absents, puis à décrire les pathogènes bactériens transmis par ces arthropodes par des approches de séquençage de nouvelle génération. Nous avons associé

à ces travaux un spécialiste du groupe taxonomique considéré, à savoir Frédéric Stachurski (CIRAD, Antananarivo) et Karen McCoy (IRD-Montpellier) pour les tiques collectées sur le bétail et sur les oiseaux marins, et Carl Dick (Université du Kentucky, USA) pour les Nycteribiidae.

Principaux résultats

Nycteribiidae: Cette famille de mouches aptères hématophages est inféodée aux chauves-souris d'où leur appellation de "bat flies". Nous avons étudié la phylogénie des mouches inféodées aux espèces hôtes frugivores du genre *Rousettus* et aux espèces insectivores appartenant au genre *Miniopterus*, à Madagascar et aux Comores. Dans un premier temps, une collaboration établie avec Carl W. Dick (Western Kentucky University/Field Museum of Natural History of Chicago) nous a permis d'identifier les différentes espèces sur un plan morphologique. L'analyse moléculaire révèle que les phylogénies des parasites et de leurs hôtes est congruente. Il apparaît que chaque espèce hôte frugivore est infestée par une espèce ectoparasite propre, tandis que les espèces du complexe *Miniopterus* partagent des espèces d'ectoparasites, certains ectoparasites des Comores et de Madagascar étant génétiquement très proches. Ce patron est en accord avec les données publiées sur les hôtes vertébrés et montrant des flux de gènes importants entre les espèces *Miniopterus* malgaches et comoriennes, et au contraire une structuration forte des espèces de roussettes présentes sur les différentes îles (3, 46).

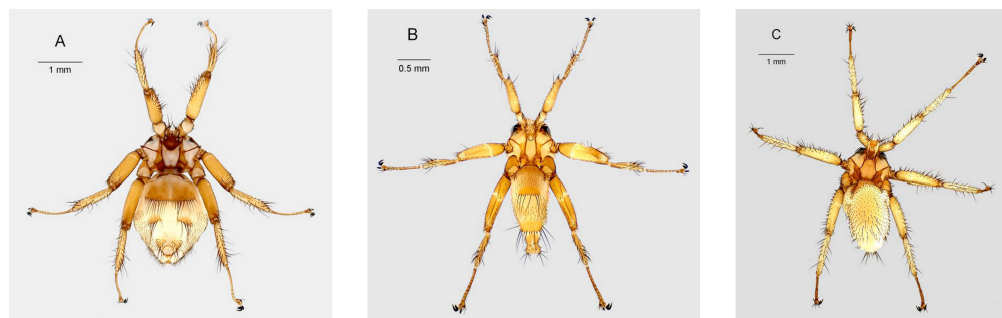


Figure 8 : Nycteribiidae inféodés aux chiroptères malgaches. A) *Penicillidia leptothrinax*, B) *Nycteribia styliidiopsis*, C) *Eucampsipoda madagascariensis*, d'après (3).

Tiques d'oiseaux marins. Les oiseaux marins occupent une place particulière dans la dynamique des agents infectieux dans la mesure où ils peuvent disperser des ectoparasites, et en particulier des tiques, sur de grandes distances. Nous travaillons avec l'équipe de virologie du CRVOI (Hervé Pascalis, Camille Lebarbançon) et en étroite

collaboration avec Matthieu Le Corre et Audrey Jaegger (Ecomar-Université de La Réunion) qui établissent par géolocalisation les routes de migrations des oiseaux marins. Nous avons échantillonné des tiques d'oiseaux marins (*Ornitodoros capensis* et *Amblyomma loculosum*, tiques molle et dure, respectivement) et recherché des pathogènes bactériens par PCR ciblée ou par séquençage de nouvelle génération (meta barcoding). Ces espèces sont infectées par les Rickettsies du groupe boutonneux, notamment *R. africae* (Dietrich M et al., en préparation). Une analyse par metabarcoding a confirmé la présence de Rickettsies pathogènes et révélé la présence d'autres bactéries potentiellement pathogènes dont des bactéries proches de *Coxiella burnetii*, présentant de fortes prévalences sur toutes les îles testées dans l'Ouest de l'Océan Indien et représentant jusqu'à 60% des lectures ARNr 16S bactériennes (Wilkinson *et al.*, en préparation).

Tiques du bétail. Considérées comme des tiques d'intérêt vétérinaire, ces tiques dures sont caractérisées par un large spectre d'hôte vertébré et peuvent se gorger sur des reptiles et petits mammifères introduits ou endémiques. Les Comores ayant été touchées par une épidémie de Theilériose en 2007, nous avons décrit la diversité et la distribution des tiques du bétail en Union des Comores. Ce travail, réalisé par Amina Yssouf dans le cadre de son Master 2 a permis de montrer que le vecteur supposé, *Rhipicephalus appendiculatus*, était présent uniquement sur l'île de Gde Comore et non sur les îles voisines d'Anjouan et de Mohéli, ce qui correspond à la distribution de la theilériose dans le pays. Nous avons par ailleurs montré que la plus grande diversité de tiques est présente autour du port de Moroni et que cette diversité diminue lorsque l'on s'éloigne du port. L'ensemble de ces données souligne que l'importation de bétail sur pied en provenance de Tanzanie est associé à des introductions répétées de tiques infectées par des pathogènes à potentiel d'émergence (1, 48). Amina Yssouf réalise actuellement son Doctorat à l'Université de Méditerranée, sous la direction de Philippe Parola, et a mis notamment en évidence une prévalence d'infection à *Rickettsia africae* importante chez les tiques importées et les tiques comoriennes (Yssouf *et al.*, en préparation).

2-2 Investigation de la leptospirose

La leptospirose est la plus fréquente des zoonoses au niveau mondial. C'est une infection bactérienne liée à un pathogène du groupe des spirochètes (groupe auquel appartiennent les agents de la borréliose de Lyme et de la Syphilis). Cette maladie, émergente en raison de l'augmentation de son incidence annuelle dans de nombreux pays y compris dans les territoires ultramarins européens, est affichée par l'Agence Régionale de la Santé de l'Océan Indien comme une des quatre priorités sanitaires. Les incidences annuelles les plus élevées sont rapportées dans les systèmes insulaires tropicaux, en particulier aux Seychelles qui occupent le premier rang mondial (49). De fortes disparités dans les incidences annuelles sont cependant rapportées entre les îles de l'Océan Indien: il n'y a officiellement pas de leptospirose humaine à Madagascar et en Union des Comores alors que le niveau de séroprévalence en population humaine à La Réunion est de l'ordre de 1% (50) et que les Seychelles occupent le premier rang mondial en termes d'incidence annuelle (49). Ces écarts sont au moins en partie attribuables à la disparité des systèmes de soin et de surveillance (les symptômes associés à la leptospirose peuvent être confondus avec de nombreuses autres pathologies) ainsi qu'aux difficultés du diagnostic biologique. La nature indirecte de la transmission (via l'environnement contaminé par les urines des réservoirs disséminateurs) rend difficile la détermination exacte des lieux de contamination et justifie un recours à l'analyse spatiale pour identifier des profils environnementaux (*i.e.* paysages) en lien avec l'écologie de l'agent pathogène et/ou de ses réservoirs. L'homme n'est qu'un hôte accidentel et ne peut être considéré comme un maillon dans la chaîne de transmission. En revanche, il intervient dans cette chaîne en transformant les paysages et les écosystèmes, modifiant ainsi les aires de distribution des espèces animales réservoirs et favorisant avec ces dernières des contacts inédits.

Les systèmes insulaires sont particulièrement vulnérables aux espèces envahissantes (dont les rats) et sont l'objet de modifications anthropiques rapides et de grande ampleur (dynamique démographique, urbanisation, expansion de l'agriculture, transformation des milieux naturels). Par ailleurs, dans un contexte de mondialisation des échanges, les îles sont plus exposées à de nouveaux agents infectieux et à leurs vecteurs, vertébrés ou invertébrés. Une investigation épidémiologique axée uniquement sur les cas cliniques n'est donc pas suffisante. Seule une approche intégrant des données

épidémiologiques sur la faune domestique, sauvage ou commensale, et couplant analyses spatiales et phylogéographiques apportera des informations originales contribuant à une meilleure compréhension du cycle de transmission des leptospires.

Dans ce contexte, nous avons mis en place le programme de recherche Feder LeptOI qui se propose d'aborder l'analyse du risque de leptospirose humaine dans les îles du SOOI par l'investigation : (i) des facteurs de risque associés aux cas humains émergents, (ii) de la distribution spatiale des animaux réservoirs (espèces, habitats et proximité avec l'homme), (iii) de la variabilité génétique des leptospires qu'ils multiplient et dispersent et (iv) l'intégration de ces informations au sein d'un modèle spatial (distribution des cas humains incidents, des prévalences dans les réservoirs, et diversité des génotypes bactériens).

Principaux résultats

Nous abordons l'étude de cette zoonose à 3 échelles, d'une part (i) localement par le suivi longitudinal d'une colonie de maternité de chiroptères sur la commune de Trois Bassins à La Réunion, par ailleurs (ii) à l'échelle de Madagascar qui constitue un des 5 hotspots de biodiversité majeurs à l'échelle de la planète (51) et donc un terrain idéal pour l'étude de l'évolution de ce pathogène dans un contexte d'endémisme élevé des espèces réservoirs, et enfin (iii) à l'échelle régionale par une étude intégrant l'ensemble des données générées par les programmes LeptOI et Faune Sauvage Océan Indien, et dont l'objectif est de proposer des scénarios concernant l'histoire évolutive de ce pathogène émergent dans la région Sud Ouest de l'Océan Indien.

Dynamique de l'infection à Leptospire dans une maternité de chauves souris à 3 Bassins

Dans le cadre de son Master 2, Aude Benlali, encadrée par les Post Doctorants Muriel Dietrich et David Wilkinson, a développé une méthode d'investigation non invasive permettant de suivre les prévalences et diversités d'infection dans une colonie de chauves souris située sur la commune de 3 Bassins. Cette maternité héberge des dizaines de milliers de chauves souris de l'espèce *Mormopterus francoimoutoui* durant la période de reproduction. Elle a fait l'objet d'un suivi longitudinal durant les 8 mois pendant lesquels les femelles se regroupent, mettent bas, élèvent les nouveaux nés jusqu'au stade pré adulte avant de quitter la maternité. Ce suivi, dont les données sont

représentées sur la figure 9 a montré que la prévalence d'infection pour un pathogènes viral (paramyxovirus) et bactérien, n'est pas stable dans le temps mais au contraire extrêmement variable. Ces données portent à croire qu'un réservoir ne peut être considéré comme un individu infecté hébergeant un pathogène de manière chronique, mais plutôt comme une communauté d'individus dans laquelle l'infection est dynamique tout en se maintenant dans le temps. Enfin, la superposition des courbes d'infection, inattendue s'agissant de microbes aussi différents que sont les paramyxovirus et les leptospires, suggère que la physiologie et le système immunitaire de l'hôte joue un rôle majeur dans cette dynamique. Nous poursuivons le suivi de cette colonie dans le temps et cherchons aujourd'hui à développer des outils sérologiques qui permettraient d'analyser la réponse immune de ces animaux au cours de la période de reproduction.

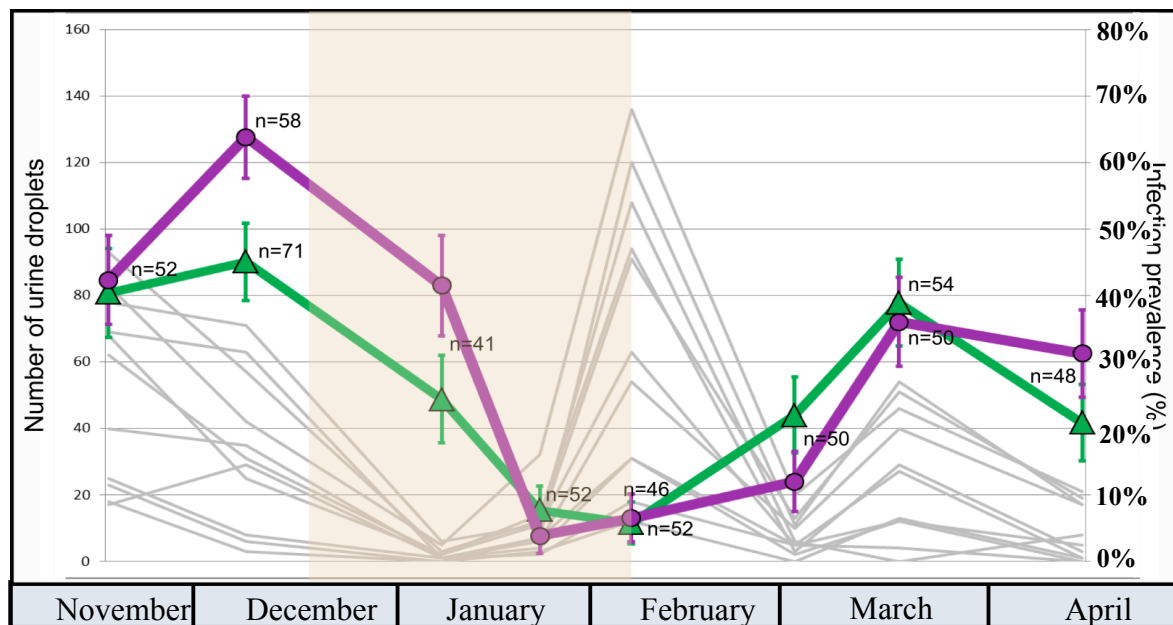


Figure 9, Dynamique d'infection aux Leptospires (vert) et Paramyxovirus (mauve) au sein d'une colonie de maternité de *M. francoimoutoui*. La période de parturition est indiquée en beige, le nombre d'échantillons testés est indiqué pour chaque point d'échantillonnage.

Diversification d'un pathogène émergent dans un hotspot de biodiversité.

Si Madagascar est considérée comme l'un des 5 hotspots de biodiversité majeurs de la planète (51), elle doit ce statut à la diversité de ses macro organismes végétaux et animaux, la diversité microbienne étant elle à peu près totalement oubliée. Nous faisons

le postulat que le niveau d'endémisme élevé des vertébrés à Madagascar est associé à un endémisme élevé des micro organismes que ces espèces vertébrées hébergent. Nous avons pu commencer à tester ce postulat en décrivant les patrons de diversification des leptospires pathogènes chez les petits mammifères volants et terrestres endémiques de Madagascar.

Muriel Dietrich, dans le cadre de son Post doctorat a montré que les leptospires infectant les petits mammifères endémiques et les chauves souris malgaches sont majoritairement infectées par *Leptospira borgpetersenii*, dont une sous espèce *L. borgpetersenii* clade B proche des leptospires retrouvés chez les cas cliniques de Mayotte (52), et par *Leptospira kirchnerii*. Par ailleurs :

- a. La diversité est importante à l'intérieur de ces espèces bactériennes, particulièrement chez les mammifères insectivores (Tenrecidae) malgaches.
- b. Il apparait qu'il existe une spécificité hôte-parasite importante puisque un clade est spécifique des chiroptères, un clade aux rongeurs endémiques et deux clades aux Tenrecidae .
- c. Une étude de structuration génétique menée sur l'espèce *L. borgpetersenii*, commun aux 3 taxons mammifères étudiés ici, montre que les leptospires infectant les chiroptères et les insectivores sont proches, et en revanche plus distants des bactéries infectant les rongeurs endémiques.

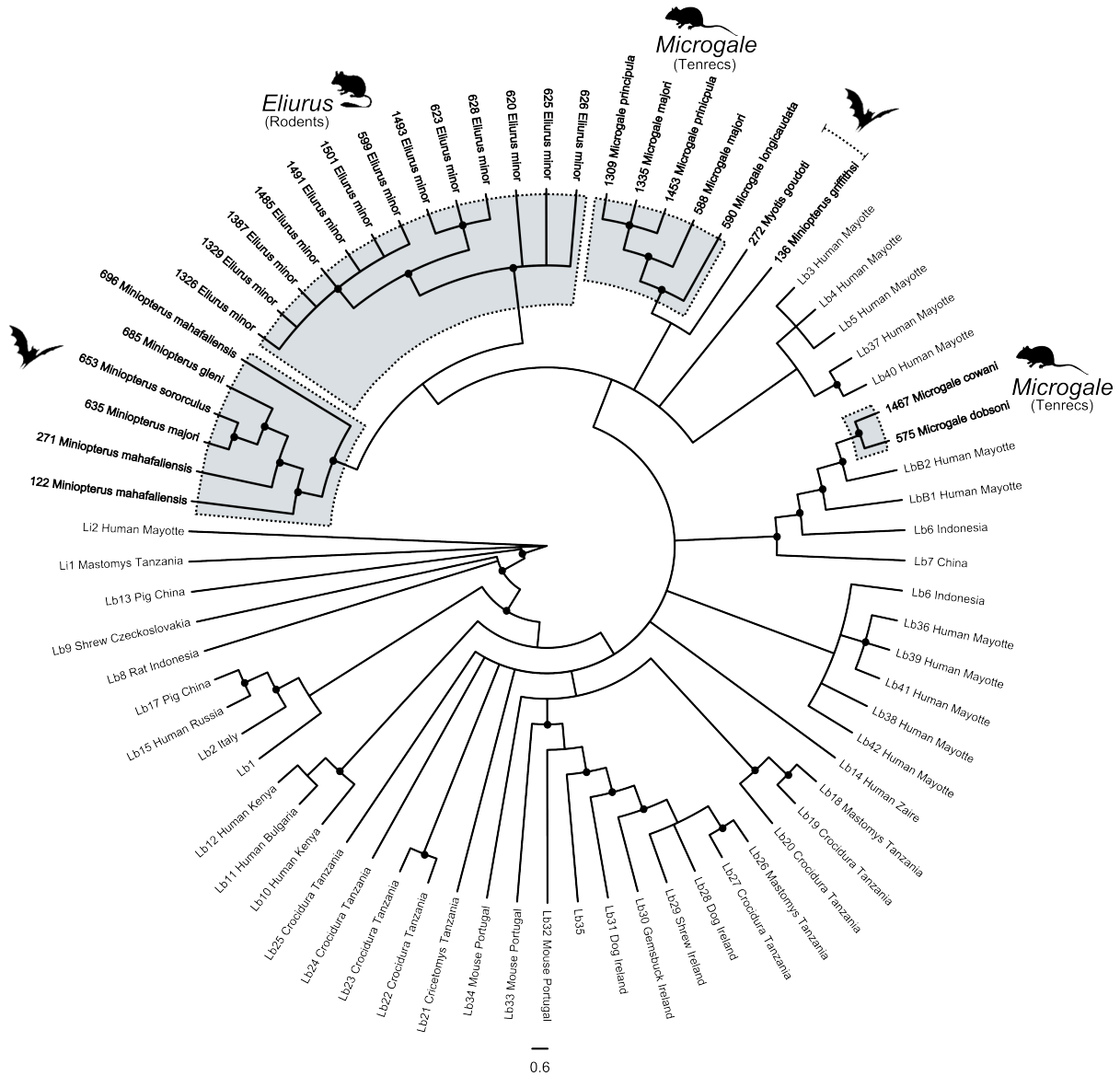


Figure 9 : Diversité des leptospires pathogènes au sein de l'espèce *L. borgpetersenii* chez les petits mammifères volants et terrestres de Madagascar, d'après Dietrich et al (en préparation).

Cette situation est clairement différente du patron d'infection rapporté chez les rongeurs introduits de Madagascar infectés par un haplotype unique appartenant à l'espèce *L. interrogans* (53). Cette importante spécificité entre leptospires pathogènes et petits mammifères endémiques associée à une diversité bactérienne importante retrouvée chez les petits mammifères endémiques alors qu'elle est inexistante chez les rongeurs introduits est cohérente avec une origine introduite de *L. interrogans*, et endémique pour *L. borgpetersenii*, probablement le résultat d'un processus de co-évolution durant l'extraordinaire radiation des petits mammifères malgaches.

Biogéographie des leptospires pathogènes dans l'Océan Indien.

A l'échelle régionale et d'un point de vue de l'épidémiologie humaine, il apparaît que les leptospires infectant l'homme à La Réunion sont différents à Mayotte et à La Réunion. Les cas cliniques à La Réunion sont tous infectés par 1 seul et unique haplotype *L. interrogans*, tandis que les cas cliniques à Mayotte sont infectés par une grande diversité de leptospires, en particulier par les espèces *L. borgpetersenii* et *L. borgpetersenii* clade B. Nous sommes donc en présence de deux situations radicalement différentes, qui peut être interprétée par une infection humaine à *L. interrogans* introduite à La Réunion (absence de diversité cohérente avec un effet fondateur lors de l'introduction de *Rattus* spp.) et par des infections à leptospires endémiques à Mayotte. C'est en tous les cas une hypothèse séduisante qu'il s'agit maintenant d'investiguer dans le détail.

III-Perspectives de Recherche

Lutte anti vectorielle. A notre connaissance, le CRVOI est à ce jour le seul laboratoire au monde à développer des compétences dans l'utilisation des bactéries endosymbiotiques *Wolbachia* et dans la stérilisation par irradiation des mâles. Les études en laboratoire ou en conditions semi naturelles devront être complétées par des essais en phase pilote qui permettront d'évaluer *in natura* l'efficacité de ces 2 approches. Des lâchers massifs de mâles *Ae. albopictus* sont en cours à l'île Maurice, un programme comparable a été déposé pour financement à La Réunion. L'évaluation simultanée de la stratégie *Wolbachia* en phase pilote doit être mise en place. Cette stratégie constitue une alternative à l'irradiation dont on ne pourra faire l'économie en cas de résultats peu encourageants de la TIS en conditions opérationnelles. En effet, la stratégie TIS, telle qu'elle a été testée en conditions semi naturelles, pourrait nécessiter des lâcher d'adultes âgés de 3 à 5 jours (42), et rien aujourd'hui ne permet d'affirmer que de tels lâchers soient réalisables dans des conditions opérationnelles. Quelle que soit la stratégie utilisée, et il n'est pas interdit de penser que ces 2 approches soient finalement complémentaires, le passage en phase opérationnelle nécessite la construction préalable d'une lignée de sexage génétique permettant la production en masse de mâles. Nous avons été intégré à un programme de recherche coordonnée (Coordinated Research Program) par l'AIEA qui s'étendra jusqu'en 2017, et auquel participent des scientifiques développant des approches transgéniques, *Wolbachia* (T2I) ou TIS « classique ». Le CRVOI est donc clairement intégré dans ce réseau international et il s'agira dans le futur de de participer à

l'effort commun qui mettra à disposition une lignée de sexage *Ae. albopictus* aujourd'hui non disponible et pourtant indispensable au passage en phase opérationnelle.

Epidémiologie de la leptospirose. Le programme Faune sauvage, clôturé, et le programme LeptOI, en cours, nous ont permis, par des approches phylogéographiques, de décrypter l'histoire évolutive des leptospires pathogènes dans les îles de l'Océan indien. Il s'agit maintenant de comprendre pourquoi *L. borgpeterseni*, excrétée par les petits mammifères endémiques dans la région, est l'espèce clinique majoritaire à Mayotte alors qu'elle n'est pas retrouvée chez l'homme à La Réunion. Nous n'avons aujourd'hui apporté qu'une partie de la réponse à cette question clef et une compréhension globale de cette épidémiologie contrastée requière le développement d'approches complémentaires.

Nous devons d'une part investiguer à un niveau génomique la diversité des leptospires de la région. Pour cela nous devons mettre ces bactéries en culture et en séquencer les génomes complets. Nous profiterons d'un vaste programme de séquençage complet d'une centaine de souche de leptospires de référence, actuellement en cours, qui fournira des indications sur les niveaux de diversité des différentes espèces de leptospires pathogènes. Ces données nous permettront de vérifier en particulier que l'absence de diversité mesurée chez *L. interrogans* à La Réunion n'est pas liée à une absence globale de diversité chez cette espèce, mais plutôt à un « effet fondateur » associé à une introduction récente de cette bactérie, vraisemblablement concomitante à l'introduction de *Rattus* spp. D'autre part, si nous arrivons à montrer que la leptospirose humaine est d'origine endémique à Mayotte et introduite à La Réunion, il nous faudra répondre à une dernière question triviale : pourquoi ces bactéries ne se retrouvent pas chez l'Homme à La Réunion qui abrite des chiroptères massivement infectés par *L. borgpetersenii*? Nous pouvons ici fournir plusieurs hypothèse : (i) l'infection à *L. borgpetersenii* est pauci- ou asymptomatique, ou (ii) la transmission de *L. borgpetersenii* à l'homme est facilitée à Mayotte par une persistance dans l'environnement, significativement moindre à La Réunion pour des raisons environnementales (notamment en raisons de variables abiotiques telles que le pH de l'eau) ou génomiques (les haplotypes des *L. borgpetersenii* à Mayotte et à La Réunion sont clairement différents, Dietrich *et al.*, en préparation). La réponse à ces questions passe par une mise en culture de ces bactéries, par leur séquençage complet et par des approches expérimentales de maintenance dans l'environnement. Des souches *L. borgpetersenii* isolées chez des cas cliniques à Mayotte sont disponibles au Centre National de Référence. Il s'agit donc maintenant d'isoler des *L. borgpetersenii* de La Réunion à partir de nos chauves souris endémiques.

Conclusion

Lors de sa création, l'objectif principal du CRVOI était de développer des thématiques de recherche pour lesquelles notre situation géographique serait un atout plutôt qu'un frein. Nous avons axé nos thématiques de recherche sur la biodiversité et la santé, dont on peut dire aujourd'hui qu'elles fédèrent un nombre grandissant de chercheurs dans la région. L'île Maurice développe un projet TIS, il nous appartient de renforcer nos collaborations déjà existantes avec ces partenaires (je pense en particulier à Ambicadutt Bhecarry, responsable du service de LAV de Maurice) et de pérenniser notre expertise reconnue sur l'outil *Wolbachia*. Il convient également aujourd'hui de maximiser l'adéquation entre nos thématiques de recherche et le tissu universitaire réunionnais, il nous faut pouvoir présenter nos travaux dans le cadre d'un enseignement cohérent et permettre aux étudiants de s'emparer de ces sujets. La Réunion est située dans un hotspot de biodiversité sur lequel s'appuie largement le Master BEST (Biodiversité des Eco Systèmes Tropicaux) de l'université de La Réunion, un des rares Masters de l'Université dont la réputation s'étend à la France métropolitaine (la majorité des étudiants est métropolitaine). Ce master, en cours de modification profonde, a été jusqu'aujourd'hui axé sur l'étude de la diversité et de la dynamique des macro organismes. Nous avons fait le pari que la diversité animale unique de la région, et en particulier de Madagascar, était associée à une diversité microbienne comparable, ce que confirment les résultats de Muriel Dietrich. Une Unité d'Enseignement entièrement dédiée à la biodiversité microbienne et plus généralement à l'écologie de la Santé pourrait accompagner le développement du CRVOI. Cette UE, dont nous comptons proposer une maquette à l'AERES pour évaluation en Mars 2015, serait en outre parfaitement dans l'aire du temps, le CNRS-INEE n'a t il pas décrété que 2014 serait l'année de l'Ecologie de la Santé ? A nous maintenant de saisir cette opportunité et de poursuivre nos efforts afin de proposer à La Réunion un enseignement et une recherche de qualité dans une discipline manifestement en plein essor.

Références bibliographiques

1. **Yssouf A, Lagadec E, Bakari A, Foray C, Stachurski F, Cardinale E, Plantard O, Tortosa P.** 2011. Colonization of Grande Comore Island by a lineage of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *Parasites & Vectors* **4**:38.
2. **Tantely ML, Tortosa P, Alout H, Berticat C, Berthomieu A, Rutee A, Dehecq J-S, Makoundou P, Labbé P, Pasteur N, Weill M.** 2010. Insecticide resistance in *Culex pipiens quinquefasciatus* and *Aedes albopictus* mosquitoes from La Réunion Island. *Insect Biochem. Mol. Biol* **40**:317–324.
3. **Tortosa P, Dsouli N, Gomard Y, Ramasindrazana B, Dick CW, Goodman SM.** sous presse. Evolutionary history of Indian Ocean nycteribiid bat flies mirroring the ecology of their hosts. *PLoS One*.
4. **Pascalis H, Temmam S, Wilkinson DA, Dsouli N, Turpin M, de Lamballerie X, Dellagi K.** 2012. Molecular evolutionary analysis of pH1N1 2009 influenza virus in Reunion Island, South West Indian Ocean region: a cohort study. *PLoS ONE* **7**:e43742.
5. **Atyame CM, Duron O, Tortosa P, Pasteur N, Fort P, Weill M.** 2011. Multiple *Wolbachia* determinants control the evolution of cytoplasmic incompatibilities in *Culex pipiens* mosquito populations. *Mol. Ecol* **20**:286–298.
6. **Atyame CM, Pasteur N, Dumas E, Tortosa P, Tantely ML, Pocquet N, Licciardi S, Bheecarry A, Zumbo B, Weill M, Duron O.** 2011. Cytoplasmic Incompatibility as a Means of Controlling *Culex pipiens quinquefasciatus* Mosquito in the Islands of the South-Western Indian Ocean. *PLoS Negl Trop Dis* **5**:e1440.
7. **Dietrich M, Gómez-Díaz E, McCoy KD.** 2011. Worldwide distribution and diversity of seabird ticks: implications for the ecology and epidemiology of tick-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **11**:453–470.
8. **Msadek T.** 1999. When the going gets tough: survival strategies and environmental signaling networks in *Bacillus subtilis*. *Trends in Microbiology* **7**:201–207.
9. **Belas R.** 2013. When the swimming gets tough, the tough form a biofilm. *Mol. Microbiol.*
10. **Stewart PS, William Costerton J.** 2001. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *The Lancet* **358**:135–138.
11. **Crutz AM, Steinmetz M, Aymerich S, Richter R, Le Coq D.** 1990. Induction of levansucrase in *Bacillus subtilis*: an antitermination mechanism negatively controlled by the phosphotransferase system. *J. Bacteriol.* **172**:1043–1050.
12. **Steinmetz M, Le Coq D, Aymerich S.** 1989. Induction of saccharolytic enzymes by sucrose in *Bacillus subtilis*: evidence for two partially interchangeable regulatory pathways. *J. Bacteriol.* **171**:1519–1523.
13. **Aymerich S, Steinmetz M.** 1992. Specificity determinants and structural features in the RNA target of the bacterial antiterminator proteins of the BglG/SacY family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**:10410–10414.
14. **Gollnick P, Babitzke P.** 2002. Transcription attenuation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* **1577**:240–250.
15. **Postma P, Lengeler J.** 1985. Phosphoenolpyruvate - Carbohydrate Phosphotransferase System of Bacteria. *Microbiol. Rev.* **49**:232–269.
16. **Deutscher J, Francke C, Postma PW.** 2006. How phosphotransferase system-related protein phosphorylation regulates carbohydrate metabolism in bacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **70**:939–1031.
17. **Poncet S, Mijakovic I, Nessler S, Gueguen-Chaignon V, Chaptal V, Galinier A, Boël G, Mazé A, Deutscher J.** 2004. HPr kinase/phosphorylase, a Walker motif A-containing

- bifunctional sensor enzyme controlling catabolite repression in Gram-positive bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics* **1697**:123–135.
18. **Tortosa P, Le Coq D.** 1995. A ribonucleic antiterminator sequence (RAT) and a distant palindrome are both involved in sucrose induction of the *Bacillus subtilis* *sacXY* regulatory operon. *Microbiology (Reading, Engl.)* **141 (Pt 11)**:2921–2927.
 19. **Tortosa P, Aymerich S, Lindner C, Saier MH Jr, Reizer J, Le Coq D.** 1997. Multiple phosphorylation of *SacY*, a *Bacillus subtilis* transcriptional antiterminator negatively controlled by the phosphotransferase system. *J. Biol. Chem* **272**:17230–17237.
 20. **Stulke J, Arnaud M, Rapoport G, Martin-Verstraete I.** 1998. PRD - a protein domain involved in PTS-dependent induction and carbon catabolite repression of catabolic operons in bacteria. *Mol. Microbiol.* **28**:865–874.
 21. **Tortosa P, Declerck N, Dutartre H, Lindner C, Deutscher J, Le Coq D.** 2001. Sites of positive and negative regulation in the *Bacillus subtilis* antiterminators *LicT* and *SacY*. *Mol. Microbiol* **41**:1381–1393.
 22. **Rothe FM, Bahr T, Stülke J, Rak B, Görke B.** 2012. Activation of *Escherichia coli* antiterminator *BglG* requires its phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**:15906–15911.
 23. **Schmalisch MH, Bachem S, Stülke J.** 2003. Control of the *Bacillus subtilis* antiterminator protein *GlcT* by phosphorylation. Elucidation of the phosphorylation chain leading to inactivation of *GlcT*. *J. Biol. Chem.* **278**:51108–51115.
 24. **Plumbridge J.** 2002. Regulation of gene expression in the PTS in *Escherichia coli*: the role and interactions of *Mlc*. *Current Opinion in Microbiology* **5**:187–193.
 25. **Tortosa P, Dubnau D.** 1999. Competence for transformation: a matter of taste. *Curr. Opin. Microbiol* **2**:588–592.
 26. **Piazza F, Tortosa P, Dubnau D.** 1999. Mutational analysis and membrane topology of *ComP*, a quorum-sensing histidine kinase of *Bacillus subtilis* controlling competence development. *J. Bacteriol* **181**:4540–4548.
 27. **Tortosa P, Logsdon L, Kraigher B, Itoh Y, Mandic-Mulec I, Dubnau D.** 2001. Specificity and genetic polymorphism of the *Bacillus* competence quorum-sensing system. *J. Bacteriol* **183**:451–460.
 28. **Hoa TT, Tortosa P, Albano M, Dubnau D.** 2002. *Rok* (*YkuW*) regulates genetic competence in *Bacillus subtilis* by directly repressing *comK*. *Mol. Microbiol* **43**:15–26.
 29. **Tortosa P, Albano M, Dubnau D.** 2000. Characterization of *ylbF*, a new gene involved in competence development and sporulation in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol* **35**:1110–1119.
 30. **Dubnau D.** 2010. Swim or chill: lifestyles of a bacillus. *Genes Dev.* **24**:735–737.
 31. **Maamar H, Raj A, Dubnau D.** 2007. Noise in gene expression determines cell fate in *Bacillus subtilis*. *Science* **317**:526–529.
 32. **Mirouze N, Desai Y, Raj A, Dubnau D.** 2012. *Spo0A~P* imposes a temporal gate for the bimodal expression of competence in *Bacillus subtilis*. *PLoS Genet.* **8**:e1002586.
 33. **Losick R, Desplan C.** 2008. Stochasticity and Cell Fate. *Science* **320**:65–68.
 34. **Dubnau D.** 2011. Winner takes all in a race for cell fate. *Mol. Syst. Biol.* **7**:558.
 35. **O'Neill SL, Hoffmann AA, Werren JH.** 1997. Influential passengers: inherited microorganisms and arthropod reproduction. Oxford University Press.
 36. **Charlat S, Engelstädter J, Dyson EA, Hornett EA, Duploux A, Tortosa P, Davies N, Roderick GK, Wedell N, Hurst GDD.** 2006. Competing selfish genetic elements in the butterfly *Hypolimnas bolina*. *Curr. Biol* **16**:2453–2458.
 37. **Duron O, Bernard C, Unal S, Berthomieu A, Berticat C, Weill M.** 2006. Tracking factors modulating cytoplasmic incompatibilities in the mosquito *Culex pipiens*. *Mol. Ecol* **15**:3061–3071.

38. **Tortosa P, Charlat S, Labbé P, Dehecq J-S, Barré H, Weill M.** 2010. Wolbachia age-sex-specific density in *Aedes albopictus*: a host evolutionary response to cytoplasmic incompatibility? *PLoS ONE* **5**:e9700.
39. **Tortosa P, Courtiol A, Moutailler S, Failloux A-B, Weill M.** 2008. Chikungunya-Wolbachia interplay in *Aedes albopictus*. *Insect Mol. Biol* **17**:677–684.
40. **Tortosa P, Pascalis H, Guernier V, Cardinale E, Le Corre M, Goodman SM, Dellagi K.** 2012. Deciphering arboviral emergence within insular ecosystems. *Infection, Genetics and Evolution* **12**:1333–1339.
41. **Zeller HG.** 1998. [Dengue, arbovirus and migrations in the Indian Ocean]. *Bull Soc Pathol Exot* **91**:56–60.
42. **Oliva CF, Jacquet M, Gilles J, Lemperiere G, Maquart P-O, Quilici S, Schooneman F, Vreysen MJB, Boyer S.** 2012. The sterile insect technique for controlling populations of *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) on Reunion Island: mating vigour of sterilized males. *PLoS ONE* **7**:e49414.
43. **Zabalou S, Apostolaki A, Livadaras I, Franz G, Robinson AS, Savakis C, Bourtzis K.** 2009. Incompatible insect technique: incompatible males from a *Ceratitis capitata* genetic sexing strain. *Entomologia Experimentalis et Applicata* **132**:232–240.
44. **Calvitti M, Moretti R, Lampazzi E, Bellini R, Dobson SL.** 2010. Characterization of a new *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae)-*Wolbachia pipientis* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) symbiotic association generated by artificial transfer of the wPip strain from *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *J. Med. Entomol.* **47**:179–187.
45. **Moretti R, Calvitti M.** 2012. Male mating performance and cytoplasmic incompatibility in a wPip *Wolbachia* trans-infected line of *Aedes albopictus* (*Stegomyia albopicta*). *Med. Vet. Entomol.*
46. **Duron O, Schnepapat UE, Berthomieu A, Goodman SM, Droz B, Nkoghe JO, Rahola N, Tortosa P.** soumis. Origin, acquisition and diversification of bacterial endosymbionts in louse and bat flies. soumis à ISME J.
47. **Dietrich M, Lebarbenchon C, Jaeger A, Le Rouzic C, Bastien M, Lagadec E, McCoy K, Pascalis H, Le Corre M, Dellagi K, Tortosa P.** 2013. *Rickettsia* species in seabird ticks of the southwestern Indian Ocean: distribution and investigation of host specificity. soumis à Emerging Infectious Diseases.
48. **Stachurski F, Tortosa P, Rahajarison P, Jacquet S, Yssouf A, Huber K.** 2013. New data regarding distribution of cattle ticks in the south-western Indian Ocean islands. *Veterinary Research* **44**:79.
49. **Pappas G, Papadimitriou P, Siozopoulou V, Christou L, Akritidis N.** 2008. The globalization of leptospirosis: worldwide incidence trends. *Int. J. Infect. Dis.* **12**:351–357.
50. **Desvars A, Gigan J, Hoarau G, Gérardin P, Favier F, Michault A.** 2011. Seroprevalence of Human Leptospirosis in Reunion Island (Indian Ocean) Assessed by Microscopic Agglutination Test on Paper Disc-Absorbed Whole Blood. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **85**:1097–1099.
51. **Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J.** 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**:853–858.
52. **Bourhy P, Collet L, Lernout T, Zinini F, Hartskeerl RA, van der Linden H, Thiberge JM, Diancourt L, Brisse S, Giry C, Pettinelli F, Picardeau M.** 2011. Human *Leptospira* isolates circulating in Mayotte (Indian Ocean) have unique serological and molecular features. *Journal of Clinical Microbiology*.
53. **Rahelinirina S, Léon A, Harstskeerl RA, Sertour N, Ahmed A, Raharimanana C, Ferquel E, Garnier M, Chartier L, Duplantier J-M, Rahalison L, Cornet M.** 2010. First isolation and direct evidence for the existence of large small-mammal reservoirs of *Leptospira* sp. in Madagascar. *PLoS ONE* **5**:e14111.

