



HAL
open science

ORIGINE, EVOLUTION ET EPIDEMIOLOGIE DES PARASITES INTRACELLULAIRES VIRAUX ET BACTERIENS

Laurent Gavotte

► **To cite this version:**

Laurent Gavotte. ORIGINE, EVOLUTION ET EPIDEMIOLOGIE DES PARASITES INTRACELLULAIRES VIRAUX ET BACTERIENS. Microbiologie et Parasitologie. Muséum National d'Histoire Naturelle, 2018. tel-02303297

HAL Id: tel-02303297

<https://hal.science/tel-02303297>

Submitted on 2 Oct 2019

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.



Habilitation à diriger des Recherches

Spécialités :

Pluri sciences de la vie

Sciences de la vie

ORIGINE, EVOLUTION ET EPIDEMIOLOGIE DES PARASITES INTRACELLULAIRES VIRAUX ET BACTERIENS

Laurent GAVOTTE

Soutenue publiquement le 21/12/2018 devant Mesdames/Messieurs les membres du jury

Mme BONNAUD-PONTICELLI, Laure
M. BOUCHON, Didier
M. MILON, Geneviève
M. WIRTH, Thierry
M. FRUTOS, Roger
M. MARTIN, Coralie
M. MOULIA, Catherine

Muséum National d'Histoires Naturelles
Université de Poitiers
Institut Pasteur Paris
Muséum National d'Histoires Naturelles
CIRAD
Muséum National d'Histoires Naturelles
Université de Montpellier

Président
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Examineur

Une fois c'est un exercice, trois fois c'est une méthode, cent fois c'est un réflexe...

adapté du Dr Vincent Lafage, 1997, Université de Savoie

SOMMAIRE

Sommaire	- 3 -
Avant Propos	- 5 -
Chapitre 1 : Cadre, Concepts et Modèles Biologiques	- 9 -
I - L'évolution : étude des organismes parasites en <i>Temps Long</i>	- 10 -
II - L'Epidémiologie : étude des organismes parasites en <i>Temps Court</i>	- 12 -
III - Des modèles biologiques divers mais pas si variés.....	- 14 -
1 - <i>Wolbachia</i>	- 14 -
2 - <i>Orientia tsutsugamushi</i> : le typhus des broussailles.....	- 19 -
3 - <i>Ehrlichia ruminantium</i>	- 20 -
4 - Les arbovirus, des modèles à fort potentiel.....	- 21 -
5 - Hand Foot Mouth Disease (HFMD)- Entérovirus EV71	- 23 -
Chapitre 2 - En quête des Origines : d'où vient <i>Wolbachia</i> ?.....	- 24 -
I - Les <i>Wolbachia</i> de nématodes : clef ou serrure ?.....	- 24 -
a - Les hôtes filaires.....	- 24 -
b - Refondation de la phylogénie des Filaires	- 25 -
II - L'Origine évolutive de <i>Wolbachia</i>	- 27 -
a - Le sens de l'évolution de <i>Wolbachia</i>	- 27 -
b - Pourquoi le sens est important ?	- 32 -
Chapitre 3 - Co-évolution :	- 33 -
I - La diversification des clades chez <i>Wolbachia</i>	- 33 -
a - Diversité et spéciation des <i>Wolbachia</i> de filaires	- 33 -
b - Le clade E : où sont les collemboles ?.....	- 36 -
c - L'histoire du clade F.....	- 39 -
II - La co-évolution chez les bactéries pathogènes.....	- 42 -
a - <i>Ehrlichia ruminantium</i> : le mauvais gène ne donne pas la bonne réponse	- 42 -
b - Des gènes, des histoires : L'exemple de <i>Orientia tsutsugamushi</i>	- 45 -

Chapitre 4 - Epidémiologie :	- 50 -
I - Scruter les maladies : les arboviroses	- 50 -
II - L'importance de la fonction du gène : l'exemple du HFMD	- 54 -
III - Perspectives épidémiologiques.....	- 58 -
Curriculum Vitae	- 60 -
Travaux Scientifiques	- 62 -
<i>Participation à des congrès scientifiques</i>	- 62 -
<i>Articles publiés dans des revues à comité de lecture</i>	- 65 -
<i>Chapitres d'ouvrages</i>	- 68 -
<i>Ouvrages</i>	- 68 -
Encadrement De Recherche (Master, Thèses et Post-Doctorats)	- 68 -
Responsabilités	- 69 -
<i>Responsabilités collectives</i>	- 69 -
<i>Responsabilités en enseignement</i>	- 69 -
<i>Responsabilités scientifiques</i>	- 70 -
Références Bibliographiques	- 71 -

AVANT PROPOS

Ce document sera composé de 4 chapitres. Le premier chapitre présentera rapidement l'ensemble des organismes parasites qui illustreront la suite de ce manuscrit. Les trois chapitres suivants auront pour objet de synthétiser mes travaux de recherche selon deux axes majeurs : un fondamental qui s'intéresse à **l'évolution des bactéries intracellulaires du genre *Wolbachia*** et un second qui a pour vocation de se rapprocher un peu de la recherche appliquée en travaillant sur **l'épidémiologie moléculaire appliquée à l'écologie et l'évolution de divers organismes pathogènes** (bactéries et virus) humains.

Je voudrai préciser dans cet avant-propos deux éléments sémantiques qui pourront paraître triviaux, mais qui posent de nombreux problèmes lors de discussions avec des collègues vétérinaires et médecins, mais aussi encore parfois scientifiques. Ainsi les termes *parasite* et *symbiose* seront utilisés dans leur sens scientifique, excluant le (ou les) sens commun ou le jargon de spécialiste.

La *symbiose* se référera donc au sens étymologique du grec *sumbiôsis* (vivre ensemble), cette notion, telle que définie par Anton de Bary en 1879, implique une vie commune s'installant dans la durée entre organismes d'espèces différentes. Outre son sens premier, symbiose est quelque fois utilisée à tort, en français, comme synonyme de mutualisme ce qui pose de nombreux problèmes de compréhension tant avec le grand public, nos étudiants que nos propres collègues dont la symbiose n'est pas une thématique de recherche.

Le *parasitisme* représente lui un mode d'interaction spécifique d'une symbiose dans laquelle un des deux organismes, le *parasite*, vit au dépend du second, l'*hôte*. Il s'agit donc d'une symbiose à intérêts non mutuels, contrairement au mutualisme. Cette définition générale est de très grande portée et elle englobe tous les organismes y répondant (i.e. vivant en interaction forte s'installant dans la durée avec un autre organisme et en retirant des avantages tout en causant des dégâts à son hôte). Le problème ici est historique, le terme ayant été forgé bien avant les découvertes des micro-organismes, il est resté affecté principalement aux parasites pluricellulaires et, dans une acception plus large en médecine actuelle, aux unicellulaires eucaryotes. Cependant le *parasitisme*, tant dans sa définition que dans son acception moderne, n'est pas un qualificatif taxonomique et ne peut donc être limité à un ou des groupes d'organismes restreints, il doit s'appliquer à l'ensemble des organismes qui répondent à sa définition. Les procaryotes pathogènes et, encore plus, les virus dans leur ensemble répondent parfaitement à celle-ci et sont donc des *parasites* au sens scientifique.

C'est cette définition qui sera utilisée ici et qui est utilisée dans tous mes travaux et enseignements.

Il est de tradition pour les chercheurs, dans les avant propos des différents documents synthétiques (Thèse, HDR etc...), de remercier de manière plus ou moins originale les différentes personnes qui leur ont permis, tout au long de leur vie, de réussir à finaliser ces étapes importantes. Bien que ne dérogeant pas à cette règle, ce déroulé de ma vie de chercheur sera synthétique et ses messages et son originalité ne seront compris que par certains de ceux qui y sont cités. Ils savent que les remerciements les plus sincères ne sont pas ceux qui servent d'introduction à une HDR et que ceux-ci leur ont déjà été manifestés. Je remercie donc par ordre chronologique de leurs interventions dans ma vie d'enseignant chercheur :

- **Ma mère et ma famille**, qui, bien que n'ayant jamais tout compris de ce que je faisais à l'autre bout de la France ou du Monde, a tout fait pour que je puisse le faire.
- Les **Trolls du Lac**, pour le terreau fertile qui servit au développement précoce de certaines idées qui continuent leurs chemins... Notre **Sensei** a déjà été honoré par la citation d'introduction de ce document mais qu'il sache que l'homogénéité ne m'a pas quittée.
- **Stephen** dont j'aurai aimé serrer la main, et qui, quelque part, m'a appris beaucoup de ce que je sais.
- Les amis du Albert's Club (et donc mon **Oncle Albert** par la même occasion) : ma **Marmotte** en premier lieu, **Cédric** et son saké à la rose et **Gwen** si souriante... la **Bretagne** reste si chère à mon cœur et **Extravadance** en garde une chaude nostalgie. Là commença réellement mon sinueux chemin scientifique...
- **Michel, Claude et Fabrice** qui ont encadré la thèse la plus curieuse qui fut...
- **Laurence, Ester et tous les autres** que j'ai croisés durant mes années lyonnaises.
- **Hélène** qui pris le pari de ne pas me tenir rigueur de mon manque de celle-ci... c'est sans doute la scientifique à qui je dois le plus et rien ne saurait exprimer ma reconnaissance.
- **Marion** qui m'a permis, sans le savoir encore aujourd'hui, de continuer ma thèse à un moment particulièrement particulier...
- Les **Strocoeurs** qui seront toujours dans le mien et pour eux il n'y a rien à rajouter qu'ils ne sachent déjà. Parmi eux, **Karine** a pris une place plus que spéciale qui aurait du être dans un autre monde et une autre vie, heureusement ce ne fut pas le cas. Dans le cadre spécifique de cette HDR, sa relecture m'a été indispensable.
- **Stephen**, mais un autre, qui m'offrit *ease, liberty and firefly* suite à une discussion sur la grande barrière de corail.
- **Catherine** sans qui je ne serais pas maître de conférence, et sans qui je m'ennuierai sans doute comme une souris sauvage morte dans le fond d'un placard puisqu'elle a le bon goût de ne pas prendre la vie professionnelle comme étant la vie...
- **Thierry, Sylvie, Bruno, Audrey, Delphine...** bref la 26's Team qui fait qu'on peut quand même rigoler un peu, merde !
- **Coralie, Odile et Emilie** qui rendirent possible, et surtout incroyablement inspirantes et amusantes, mes escapades parisiennes... c'est de leur faute si je passe mon HDR à Paris.
- **Roger** qui m'ouvrit grand les portes de l'Orient.
- **Arnaud**, qui a partagé la lourde charge de mener à bon port un bateau ivre dont certains tonneaux étaient et sont encore des poids morts.
- **Ethan**, mon petit parasite perso, qui a largement contribué au retard la finalisation de ce manuscrit, mais est-ce que c'est vraiment un problème ?

Pour finir j'aimerais remercier le **hasard** et la **nécessité** pour m'avoir conduit jusqu'ici et aussi pour avoir disparus de cette version de mes remerciements.

Bonne lecture à ceux qui iront plus loin que l'avant propos.

CHAPITRE 1 : CADRE, CONCEPTS ET MODELES BIOLOGIQUES

Mes travaux s'inscrivent dans le cadre d'une étude des mécanismes d'évolution et d'adaptation des organismes parasites dans leur ensemble et, pour cela, ils utilisent de **multiples modèles biologiques** (qui seront décrits dans le paragraphe III du présent chapitre) permettant d'explorer les histoires des **interactions hôtes/parasites à différentes échelles de temps**. Aussi bien bactériens que viraux, ces parasites intracellulaires obligatoires subissent des **pressions écologiques et évolutives** similaires aux différentes échelles temporelles. En effet, tous les organismes parasites, quels que soient les niveaux taxonomiques ou les modalités de l'interaction, passent, au cours de leur évolution, par des *étapes* évolutives analogues et sont sous l'influence de mécanismes obligatoires et similaires (Figure 1.1).

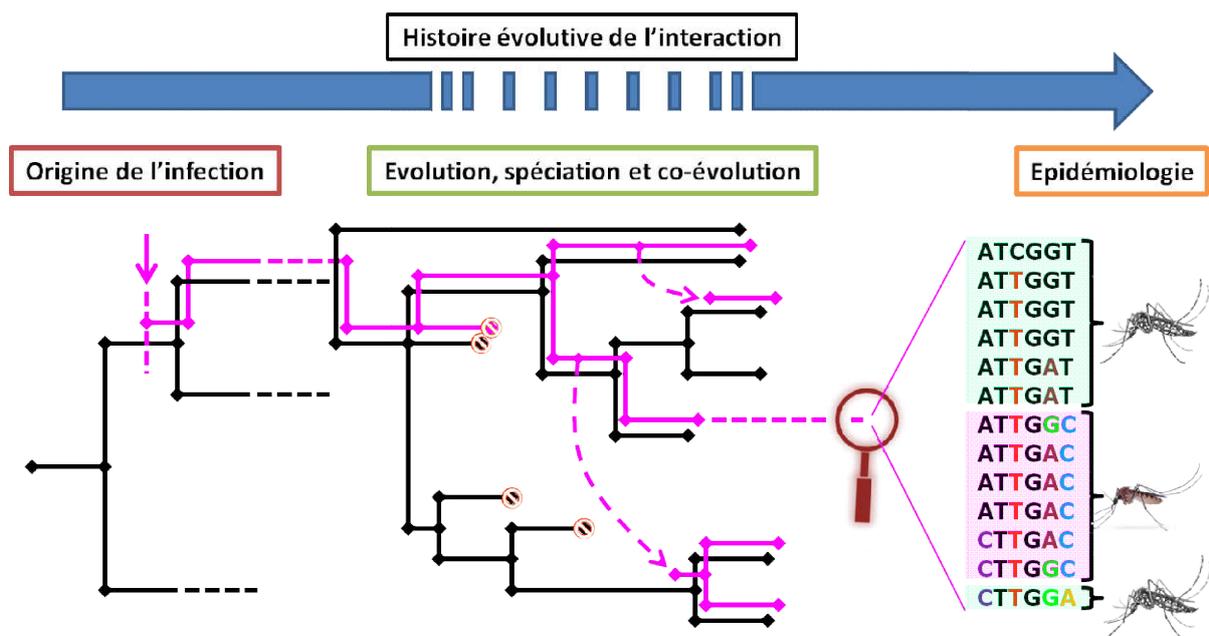


Figure 1.1 - Synthèse des niveaux d'étude de l'histoire évolutive des interactions parasitaires.

i) **L'origine de l'infection** : au départ de tout parasitisme, il y a l'*acquisition* d'un hôte par le parasite. Cet événement n'est bien entendu pas le fait d'une interaction entre deux individus, mais entre deux populations. Deux voies sont possibles : la première met en jeu un organisme qui était déjà symbiotique (parasite ou mutualiste) et qui rentre en interaction durable avec un nouvel hôte, la seconde implique une espèce initialement libre qui entre en symbiose.

ii) **La co-évolution avec son ou ses hôtes** : les mécanismes permettant le maintien des organismes parasites au sein de leurs populations hôtes correspondent à une *course aux armements* qui n'est ni plus ni moins que l'application spécifique aux interactions durables de la théorie de la *Reine rouge* (Van Valen, 1973). Cette co-évolution peut prendre des voies aussi inattendues que complexes et conditionne souvent le devenir des organismes parasites tant en terme de cycle que de spectre d'hôte ou de phénotype.

iii) **La dynamique épidémiologique actuelle** : à une échelle plus courte, la dynamique des organismes parasites va conditionner grandement ses effets populationnels. Il s'agit de l'échelle la plus importante dans le cadre de l'étude et de l'intervention sur des organismes d'intérêt médical ou vétérinaire principalement. Mais, en réalité, elle trouve une importance dans tous les modèles d'interactions durables.

Pour étudier ces trois niveaux, des méthodes d'études adaptées ont été mises en place et appliquées en fonction des organismes étudiés.

I - L'EVOLUTION : ETUDE DES ORGANISMES PARASITES EN *TEMPS LONG*

Tous les organismes évoluent dans le temps : il n'est pas question de redémontrer ici la réalité des travaux de Darwin et de ses héritiers, mais de préciser les méthodes d'étude permettant d'appréhender et de décrire les évolutions des organismes (en particulier ceux impliqués dans des interactions parasitaires) ainsi que d'en expliquer les limites qu'il nous reste encore à surmonter. L'un des principaux problèmes que pose l'étude de l'évolution des organismes parasites est l'absence quasi complète de registre fossile, empêchant de *calibrer* les outils d'étude. Nous ne pouvons donc nous baser uniquement sur les marqueurs phylogénétiques persistant dans les formes actuelles de ces organismes. Pour les bactéries et les virus, seules les études génétiques et génomiques sont donc utilisables. Il faut bien prendre en compte les deux régimes existant de sélection des mutation dans l'information génétique d'un génome.

Le premier implique les **mutations dites codantes**, qui modifient la séquence d'une protéine codée ou de la fonctionnalité d'un ARN (e.g. de transfert) ou de la séquence d'acide nucléique elle-même (e.g. régulatrice). Tout **changement dans le phénotype** de l'organisme, quel qu'il soit, qui résulte d'une mutation entre dans cette catégorie. Ces phénotypes modifiés sont alors soumis aux puissants mécanismes qui régissent l'évolution des espèces : **la sélection**. Le

devenir de chaque mutation est fonction de la mutation et des pressions de sélection environnementales (incluant aussi bien les variables de l'environnement physique que les interactions avec les autres espèces). Il y aura sélection (se traduisant par une augmentation en fréquence dans la population) si cette mutation augmente la valeur sélective des individus qui la portent et donc il y aura contre-sélection si elle la diminue. Ainsi les mutations avantageuses augmentent en fréquence et sont transmises à chaque génération d'organisme puis à chaque espèce descendante par spéciation.

Le seconde régime quant à lui implique des mutations dites **neutres**, qui ne changent pas la séquence d'une protéine codée, la fonctionnalité d'un ARN (e.g. ribosomal) ou la fonctionnalité de la génomique elle-même (e.g. promoteur), ou tout au moins qui ne modifie aucunement le phénotype de l'organisme. La découverte de l'importance de ces mutations est à l'origine de **la théorie neutraliste**, initiée par le généticien japonais Motoo Kimura dans les années 1970 (Kimura, 1968). Il s'agit d'une rupture dans les concepts darwiniens en mettant en avant le rôle central du hasard dans l'évolution au détriment de la sélection naturelle. Cette théorie explique donc la diversité des organismes par un phénomène, nommé **la dérive**, qui décrit le maintien, la fixation ou la disparition d'une mutation par des phénomènes stochastiques (aléatoires). La dérive est d'autant plus forte que la population est petite et isolée. Elle est également plus importante chez les organismes qui ne réalisent pas ou peu de reproduction sexuée.

Les bactéries parasites obligatoires et les virus sont d'autant plus soumis à ces phénomènes qu'ils accumulent certaines particularités biologiques : i) le régime de reproduction de ces organismes est pratiquement exclusivement clonal (les échanges horizontaux existent mais sont limités) ce qui réduit les recombinaisons entre génomes et augmente les forces de la **dérive**; ii) chaque organisme hôte peut être considéré comme hébergeant une population de parasites qui est isolée et puisque les événements d'infections à partir de deux sources différentes étant relativement rares, ces populations se comportent donc, d'un point de vue écologique et évolutif, comme des populations insulaires isolées; iii) les organismes en symbiose obligatoire sont tous sous un régime évolutif particulier qui conduit à des réductions de leurs génomes par élimination successive des gènes codant pour des fonctions redondantes avec leurs hôtes (Martinez-Cano et al., 2014).

II - L'ÉPIDÉMIOLOGIE : ÉTUDE DES ORGANISMES PARASITES EN *TEMPS COURT*

Les organismes parasites sont une constante pour l'ensemble des espèces vivantes (y compris les parasites eux-mêmes). La transmission entre deux hôtes, quel que soit le mécanisme impliqué, est le paramètre fondamental et l'élément le plus important, tant pour la dynamique que pour l'évolution du parasite et, en miroir, de son hôte. Le phénomène d'**épidémie** correspond à l'augmentation rapide de l'incidence d'un parasite dans une population hôte. Les paramètres qui président au déclenchement et au maintien des épidémies sont particulièrement complexes et multifactoriels et dépendent beaucoup du parasite lui-même et de son ou ses hôtes. La science qui s'intéresse à comprendre l'apparition des épidémies et les paramètres qui les contrôlent a été nommée **ÉPIDÉMIOLOGIE**, littéralement le discours (la science) (=logos) de ce qui est parmi (=epi) le peuple (=demos). Même si l'épidémiologie s'applique à l'ensemble des maladies existant potentiellement au sein des organismes vivants, nous nous intéresserons ici uniquement aux maladies transmissibles entre organismes.

Les travaux en épidémiologie répondent à quatre objectifs principaux : **décrire** et **surveiller** les maladies et leurs agents causaux dans toutes les dimensions, **comprendre** la dynamique de ces maladies, **évaluer** les risques d'apparition ou de dissémination d'une maladie en fonction de différents facteurs et, enfin, **proposer** des mesures ou des protocoles d'utilisation des soins en fonction de l'ensemble des données connues. Une étude en épidémiologie peut se placer dans le cadre d'un ou de plusieurs de ces objectifs en fonction de son avancée et des outils mis en action. Quatre «*sous-disciplines* » ont ainsi émergé, répondant à ces quatre objectifs :

i) L'**ÉPIDÉMIOLOGIE DESCRIPTIVE** : il s'agit, comme son nom l'indique, de décrire les caractéristiques d'une épidémie. Elle a pour but de déterminer l'ensemble des facteurs épidémiologiques d'une maladie et de les quantifier. On cherche donc, non exhaustivement, à détecter et à identifier une maladie et/ou son pathogène dans une population, de répertorier les caractéristiques spatiales, temporelles et cliniques d'une maladie et de suivre la dynamique de celle-ci. L'épidémiologie descriptive se base donc sur le recueil d'informations par diverses méthodes au sein même des populations naturelles, soit de manière passive (en étudiant des données statistiques issues le plus souvent des systèmes de santé nationaux), soit de manière active en réalisant des campagnes de terrain (*via* des questionnaires de santé ou en réalisant des échantillonnages biologiques analysés par la suite en laboratoire). Les méthodes mises en place pour réaliser une étude en épidémiologie descriptive sont très variées : elles vont de

l'étude de base de données à la caractérisation génétique d'un pathogène et/ou d'un hôte. C'est par là que l'épidémiologie a historiquement débuté.

ii) **L'ÉPIDÉMIOLOGIE ANALYTIQUE** : l'épidémiologie analytique va se servir de données recueillies en épidémiologie descriptive pour étudier les sources et mécanismes de contamination et les facteurs de risques associés à différents paramètres. Elle a donc pour objectif d'établir l'existence de relations de causalité entre l'exposition à un facteur et la contamination par le pathogène ou l'apparition de la maladie. On peut ainsi déterminer les éléments favorisant la contamination (e.g. la consommation de tabac augmente les capacités d'invasion pulmonaire de *Mycobacterium tuberculosis*) et les facteurs aggravants (e.g. les maladies chroniques comme une insuffisance rénale ou un diabète aggravent les symptômes de la tuberculose).

iii) **L'ÉPIDÉMIOLOGIE EVALUATIVE** : ce domaine de recherche étudie l'efficacité et l'efficience des différentes mesures mises en place contre une épidémie. Cela concerne aussi bien des mesures prophylactiques que curatives mettant en œuvre des vaccins, des médicaments ou même des mesures à caractère social. C'est ainsi que sont étudiés les médicaments autorisés dans le cadre de différentes maladies, ce qui permet de valider leurs effets thérapeutiques mais également de détecter d'éventuels effets secondaires non détectés pendant les phases d'essai clinique. Au final, il s'agit d'une nouvelle étude descriptive pour évaluer le bien-fondé – ou non – d'une mesure prise pour améliorer l'état de santé.

iv) **L'ÉPIDÉMIOLOGIE PROSPECTIVE** : l'épidémiologie prospective est la plus récente sous-discipline de l'épidémiologie ayant émergé des travaux réalisés dans les trois sous-disciplines précédentes. Il s'agit d'utiliser les connaissances recueillies relatives à une maladie dans le cadre d'études descriptives et analytiques (plus rarement évaluatives) afin de prédire les évolutions possibles d'une épidémie. Cela concerne aussi bien les aires géographiques dans lesquelles la maladie est présente que la capacité de transmission des vecteurs impliqués ou des changements dans la virulence d'un pathogène. Bien que restant balbutiante, l'épidémiologie prospective présente un défi majeur d'importance pour la discipline et plus largement pour la gestion des maladies humaines, animales et végétales.

III - DES MODELES BIOLOGIQUES DIVERS MAIS PAS SI VARIES

Les différents modèles biologiques étudiés (Figure 1.2) s'inscrivent tous dans l'étude des histoires évolutives des interactions hôtes/parasites. Chacun présente des spécificités biologiques, écologiques et/ou évolutives qui permettent d'étudier certaines des étapes évolutives de l'interaction.

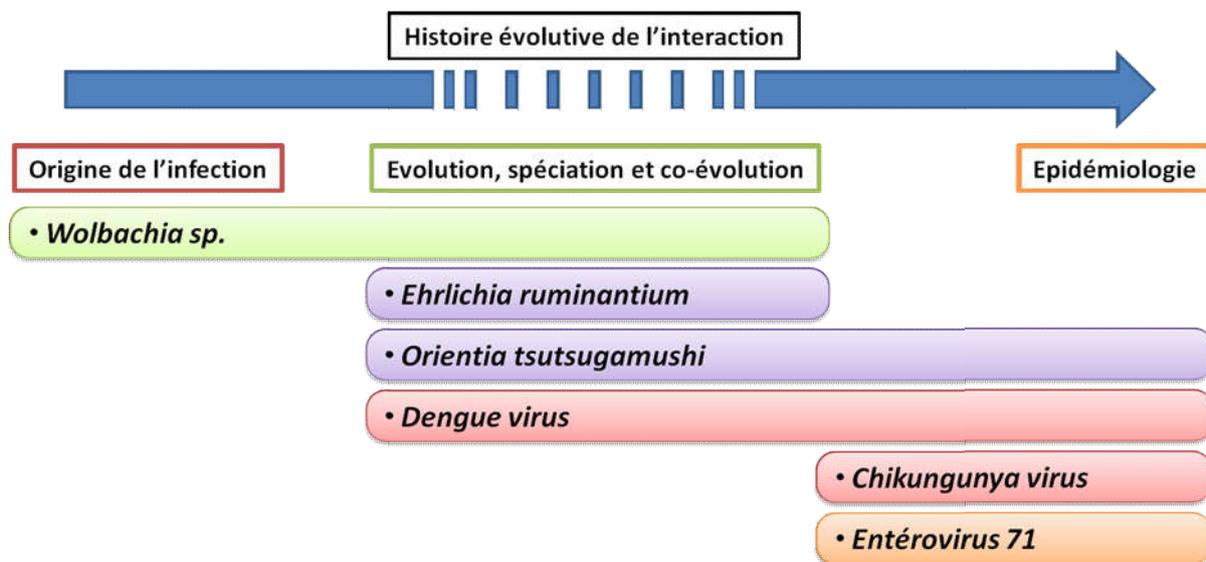


Figure 1.2 - Synthèse des niveaux d'étude de l'histoire évolutive des interactions parasitaires et les modèles biologiques (représentés par les organismes parasites) étudiés.

1 - Wolbachia

a - Un point sur la nomenclature

Les bactéries du genre *Wolbachia sp.* sont des bactéries intracellulaires découvertes par le microbiologiste américain Marshall Hertig et nommées selon son collègue et collaborateur Simeon Burt Wolbach. Au cours du temps, trois groupes de bactéries distinctes ont été désignées comme appartenant à ce genre :

- *Wolbachia pipientis*, Hertig 1936
- *Wolbachia melophagi*, (Nöller 1917) Philip 1956
- *Wolbachia persica*, Sutor and Weiss 1961

Wolbachia pipientis est une α -protéobactérie infectant des hôtes invertébrés. Elle a été nommée selon le moustique *Culex pipiens*, un des premiers hôtes chez qui elle a été

découverte (Hertig and Wolbach, 1924). Il apparaît rapidement que ces bactéries, bien que clairement phylogénétiquement affiliées (Lo et al., 2007), sont en fait très diverses et elles-mêmes structurées en grands clades (Ellegaard et al., 2013). On dénombre aujourd'hui 6 clades confirmés (nommés A, B, C, D, F, et J) et pas moins de 8 autres sont suspectés sur la base de quelques séquences génétiques (Lo et al., 2002; Ferri et al., 2011; Lefoulon et al., 2012). *Wolbachia melophagi* (anciennement *Rickettsia melophagi*, Nöller 1917) est une α -protéobactérie nommée d'après le genre *Melophagus* regroupant des diptères sans ailes (Philip, 1956). Ces bactéries, décrites une seule fois, appartiennent très probablement au genre *Bartonella* (Lo et al., 2007). *Wolbachia persica* est une γ -protéobactérie qui a été nommée selon la tique *Argas persicus* qui parasite des oiseaux, en particulier des volailles (Suitor and Weiss, 1961). Identifiée comme une bactérie proche de *Wolbachia pipientis* sur une base morphologique et de spectre d'hôtes peu probantes, la position phylogénétique de cette bactérie a été remise en question et elle serait plus probablement affiliée au genre *Francisella* (Noda et al., 1997; Lo et al., 2007) (Figure 1.3).

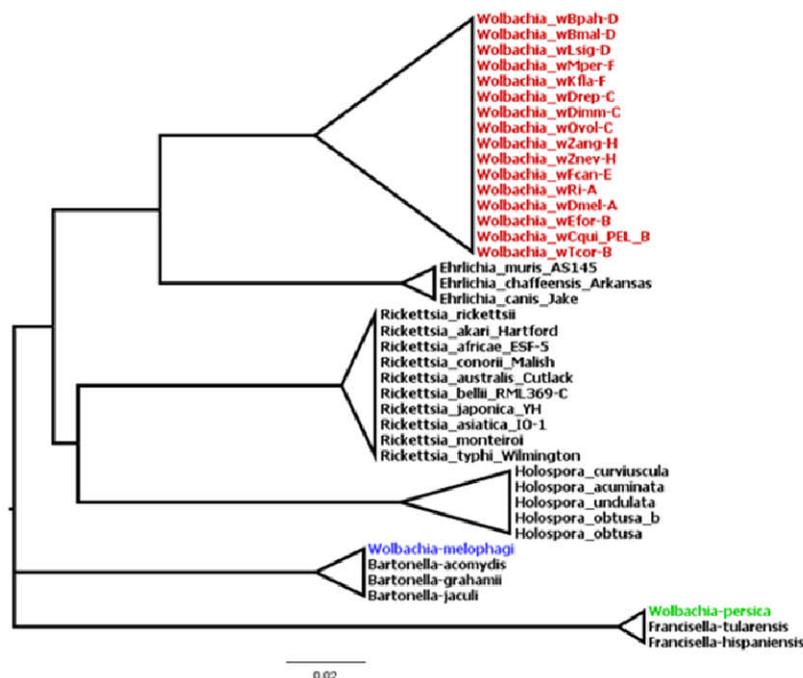


Figure 1.3 - Phylogénie des différentes espèces du genre *Wolbachia* sur la base des séquences 16S, construite par maximum de vraisemblance avec un modèle HKY+I+G. Les séquences de *Wolbachia pipientis* sont indiquées en rouge, celles de *Wolbachia melophagi* en bleu et celles de *Wolbachia persica* en vert. L'absence de regroupement met en évidence l'absence de relations phylogénétiques directes entre ces trois espèces: le genre *Wolbachia* est polyphylétique, mais le clade *Wolbachia pipientis* est cohérent.

Le nombre et la diversité des isolats identifiés à *Wolbachia pipientis* a rapidement mis en évidence des structurations majeures qui devaient être prises en compte par les chercheurs. Dans la littérature, les isolats souvent appelés **souches** (strain) et, bien que ce qualificatif soit impropre, il est largement utilisé et accepté et sera donc utilisé sous cette définition dans ce travail. Deux clades majeurs, aussi appelés **super-groupes** ont d'abord été identifiés chez les symbiotes d'arthropodes. Ainsi, les clades A et B (Werren et al., 1995) ont été rapidement mis en évidence. La découverte de la bactérie chez des hôtes nématodes (Sironi et al., 1995) a permis de définir les super-groupes C et D (Bandi et al., 1998). Ces quatre super-groupes ont constitué pendant très longtemps la structure centrale des connaissances phylogénétiques de *Wolbachia* et le développement de nouveaux marqueurs génétiques n'a jamais mis en défaut cette topologie. Les super-groupes E et F ont été rajoutés plus tard sur la base de quelques souches très divergentes (Lo et al., 2002). Le clade E est retrouvé chez quelques espèces de Collemboles (Vandekerckhove et al., 1999; Czarnetzki and Tebbe, 2004) et est un groupe frère divergent du clade A, tandis que le clade F d'abord identifié chez des termites (Lo et al., 2002) a été retrouvé par la suite chez des nématodes (Casiraghi et al., 2005). Ce dernier groupe, qui a probablement émergé récemment (Lefoulon et al., 2012), est le seul groupe de *Wolbachia* connu infectant à la fois des arthropodes et des nématodes, ce qui en fait un objet d'étude très intéressant. Les clades G, H et I ont été respectivement découverts chez des hôtes arachnides (Goodacre et al., 2006), termites (Lo and Evans, 2007) et siphonaptères (Gorham et al., 2003). Mais ces 3 groupes n'ont aujourd'hui que peu de représentants connus certainement à cause d'une faible étude de ces groupes. Enfin, le clade J est présent chez des nématodes des genres *Dipetalonema*, *Cruofilaria* et *Yatesia* (Lefoulon et al., 2015). Des clades K, L, N, O, P et Q ont été proposés mais sur la base de peu de séquences divergentes (Ros et al., 2009; Augustinos et al., 2011; Bing et al., 2014; Glowska et al., 2015). Ils ne semblent pas aujourd'hui être solidement définis, la plupart n'étant caractérisés que par une seule souche, et sont polyphylétiques pour certains. Finalement, le clade M (qui semble en réalité également inclure la seule séquence assignée au clade L et au clade O) a été détecté chez pas moins de 30 espèces hôtes, de la famille des Aphididae (Augustinos et al., 2011).

Des tentatives de clarification de la nomenclature, prenant acte des différences significatives existant sur le plan génétique et biologique entre les différents clades de *Wolbachia pipientis*, ont été entreprises. La dernière publication dans le domaine (Ramirez-Puebla et al., 2015) pose une base entièrement nouvelle (Figure 1.4) mais malheureusement incomplète à cause des groupes E, H, I, K, M, N, P, Q, L et O qui sont représentés par trop peu de souches et dont le statut est encore incertain et à cause de la non prise en compte du clade J dont la cohérence est pourtant largement confortée (Lefoulon et al., 2016).

Dénomination du clade	Nouvelle nomenclature proposée	Note
A	<i>Candidatus Wolbachia bourtzisii</i>	
B	<i>Candidatus Wolbachia pipientis</i>	
C	<i>Candidatus Wolbachia onchocercicola</i>	Symbiotes des Onchocerca
	<i>Candidatus Wolbachia blaxterii</i>	Symbiotes de Dirofilaria
D	<i>Candidatus Wolbachia brugii</i>	Symbiote des Brugia
	<i>Candidatus Wolbachia taylorii</i>	Symbiote de Litomosoides
E	<i>Candidatus Wolbachia collembolicola</i>	Clade peu certain
F	<i>Candidatus Wolbachia multihospitis</i>	

Figure 1.4 - Proposition de révision de la nomenclature de *Wolbachia*, proposée par Ramirez-Puebla et collaborateurs (2015).

La suite de ce manuscrit considérera uniquement les bactéries formellement identifiées et correspondant uniquement à l'espèce initialement nommée *Wolbachia pipientis*. Comme il est d'usage dans la littérature scientifique, le terme unique de *Wolbachia* sera utilisé.

b - Une bactérie mondialiste

Les bactéries du genre *Wolbachia* sont aujourd'hui reconnues comme étant les symbiotes intracellulaires les plus répandus du monde vivant (Bourtzis and Miller, 2003). En effet, la bactérie infecte souvent 100% des individus de ses espèces hôtes comme, par exemple, chez le moustique *Aedes albopictus*, chez qui des études extensives n'ont jamais mis en évidence d'individus non infectés dans les populations naturelles (Kitrayapong et al., 2002; de Albuquerque et al., 2011; Das et al., 2014; Zhang et al., 2014).

Au sein des arthropodes, on retrouve des espèces infectées par *Wolbachia* dans tous les grands groupes phylogénétiques, chez les insectes bien entendu où la bactérie a été identifiée au sein de tous les ordres (Werren, 1997), mais également chez les arachnides, aussi bien araignées (Rowley et al., 2004) que scorpions (Baldo et al., 2007) ou acariens (Oh et al.,

2000). Enfin, parmi les décapodes, *Wolbachia* a été détectée uniquement chez des isopodes terrestres (Bouchon et al., 1998). De manière plus générale, aucune espèce strictement aquatique, qu'elle soit marine ou dulçaquicole, n'a été trouvée infectée par la bactérie. Ceci peut suggérer une acquisition de la symbiose après l'émergence des espèces terrestres.

Des extrapolations sur la base des cohortes d'espèces déjà étudiées envisagent des taux d'infection chez les arthropodes entre 10 et 66% de toutes les espèces (Hilgenboecker et al., 2008). La très grande incertitude des estimations est due principalement à deux éléments. Le premier relève de l'existence de cas où les infections sont non fixées dans les populations. Ainsi, on a détecté de nombreuses espèces chez qui l'infection n'est que partielle (Pannebakker et al., 2004) et des espèces déterminées comme non infectées pourraient présenter en réalité une infection en mosaïque. La seconde explication tient au fait que certains groupes taxonomiques ont été particulièrement étudiés et peuvent biaiser les données en fonction du statut de l'infection dans ces groupes. Ainsi, les drosophiles (diptères) ou les trichogrammes (hyménoptères) ont été étudiés de manière extensive tandis qu'aucune étude n'a encore été publiée sur les plécoptères, les mécoptères ou les trichoptères. Chez les filaires, le taux d'infection par *Wolbachia* a tout d'abord été considéré comme très élevé puisque les premières études montraient que 100% des espèces de filaires étudiées étaient infectées (Bandi et al., 1998). Cependant l'étude quasi exclusive d'espèces d'intérêt médical ou vétérinaire induisait un biais évident. L'extension de la recherche de la bactérie chez des espèces représentant mieux la diversité des filaires a mis en évidence l'existence d'espèces non infectées pour aboutir à une estimation actuelle de 58% d'infection sur 64 espèces étudiées (Lefoulon et al., 2015), ce qui se rapproche de la fourchette haute estimée pour les arthropodes. Enfin, chez les arachnides, le nombre d'espèces étudiées reste extrêmement limité, ne permettant aucune extrapolation pertinente.

Quoi qu'il en soit et même en considérant les fourchettes basses, le nombre d'espèces infectées par *Wolbachia* est de plusieurs millions, ce qui fait de cette bactérie le symbiote connu le plus répandu du monde vivant.

c - Une histoire évolutive compliquée

Le nombre et la diversité des espèces de bactéries et d'hôtes rendent très compliquées les études sur l'évolution des *Wolbachia*. De plus, les **infections multiples** (i.e. présence de plusieurs souches en co-infection au sein d'un même individu) résultent de **transferts**

horizontaux successifs entre espèces hôtes parfois très éloignées, tant géographiquement que phylogénétiquement (Werren, 1997; Vavre et al., 1999; Bourtzis and Miller, 2003).

A ce jour, aucune étude n'a permis de définir avec précision la branche phylogénétique d'origine. Vingt articles publiés présentent des arbres phylogénétiques clairement enracinés avec une indication de l'origine évolutive évaluée de *Wolbachia* avec des méthodes différentes et une variété de jeux de données (gènes, multi-gènes ou génomes), mais les conclusions sont contradictoires. L'origine évolutive de *Wolbachia* n'est cependant pas seulement une question qui intéresse uniquement les phylogénéticiens. La biologie des bactéries est en effet très différentes entre les symbiotes de nématodes (mutualisme, co-spéciation générale, génome réduit...) et ceux d'arthropodes (principalement parasites, aucune co-spéciation, génome contenant des éléments répétés...) et selon l'origine des bactéries, les processus évolutifs menant d'un phénotype à l'autre se retrouvent totalement inversés et donc implique des mécanismes fondamentalement opposés.

2 - *Orientia tsutsugamushi* : le typhus des broussailles

Orientia tsutsugamushi est une α -protéobactérie qui est à l'origine du **typhus des broussailles**, une rickettsiose endémique d'Asie du Sud-Est où la bactérie est vectée par des acariens trombiculidés du genre *Leptotrombidium*. Présente principalement dans les zones rurales (les vecteurs vivent dans les zones broussailleuses, d'où le nom de la maladie), la bactérie provoque des accès fiévreux, des affections pulmonaires et des douleurs musculaires. *O. tsutsugamushi* est capable d'infecter de nombreuses espèces de vertébrés, principalement des rongeurs, et provoque près d'un million de cas de typhus des broussailles chaque année. Il n'existe pas à ce jour de vaccins et les traitements sont uniquement à base d'antibiotiques (tétracycline). Il reste beaucoup de questions en suspens concernant la **dynamique épidémiologique de cette maladie** et de son agent causal (Paris et al., 2013) : i) quel est le réel impact du typhus des broussailles en terme de santé publique et de dispersion géographique ? ii) quels sont les facteurs importants menant au maintien de *O. tsutsugamushi* dans l'environnement pouvant expliquer la diversité de la bactérie ? et iii) pourquoi les épidémies de typhus des broussailles ré-émergent périodiquement dans certaines régions après de longues périodes marquées par une absence d'infection chez l'homme ?

3 - *Ehrlichia ruminantium*

La bactérie *Ehrlichia ruminantium* est une α -protéobactérie intracellulaire obligatoire de la famille des Rickettsies. Elle est capable de se maintenir et de se multiplier aussi bien au sein de cellules d'insectes (son vecteur est une tique du genre *Amblyomma*) qu'au sein de cellules de mammifères (elle touche principalement des ruminants domestiqués ou sauvages). Ce pathogène est endémique de la zone sub-saharienne et de Madagascar mais est également présent dans des îles de l'arc Caraïbe où elle a été introduite par des importations de bétail depuis l'Afrique dans le cadre du commerce triangulaire au cours du XVIII^{ème} siècle (Maillard et al., 1993). Dans les zones d'endémie, l'impact de la maladie est très important sur l'élevage souvent vivrier. Plusieurs programmes internationaux ont tenté de limiter son impact, tant par une détiqation préventive (mise en place par l'Organisation des Nations Unies pour l'Alimentation et l'Agriculture (FAO) en Afrique et dans les Caraïbes - programme PAC), que par la mise au point de vaccins dès les années 90 (Rikihisa, 1991). Ces derniers ont cependant rapidement montré un effet très limité dans leur utilisation en conditions réelles alors qu'ils présentent une bonne efficacité en laboratoire (Dutta et al., 1998; Mahan et al., 1999; Zweygarth et al., 2005). Ces échecs relatifs sont très probablement liés à l'incroyable diversité des souches naturelles de *E. ruminantium* et leurs co-circulation au sein d'une même zone géographique (Yu et al., 2007; Rar et al., 2010; Ferreira et al., 2014). De nombreuses méthodes ont été développées pour caractériser cette diversité génétique et essayer de la mettre en relation avec les échecs des vaccins. Cependant, aucune de ces approches n'a démontré de corrélation entre la protection vaccinale et les génotypes identifiés. La protéine MAP-1 (Major Antigenic Protein) qui a été très largement utilisée pour le typage de ces bactéries (Mahan et al., 1998; Yu et al., 2007; Raliniaina et al., 2010) présente un très haut polymorphisme. Mais sa forte implication dans le contournement de la réponse immunitaire (la glycoprotéine produite est impliquée dans l'évasion immunitaire de la bactérie), le fait qu'elle appartienne à une famille multi-génique et son haut taux de recombinaison (Raliniaina et al., 2010) expliquent cet échec. En dehors de ces éléments, *E. ruminantium* présente quelques particularités rendant particulièrement difficile son étude. Outre de multiples signatures de recombinaisons anciennes et récentes (Adakal et al., 2009), le génome de *E. ruminantium* est particulièrement plastique (Collins et al., 2005) et contient de nombreux pseudogènes (Frutos et al., 2007).

4 - Les arbovirus, des modèles à fort potentiel

Les arbovirus, littéralement virus à vecteur arthropode, sont parmi les pathogènes les plus importants à l'heure actuelle en terme de santé humaine et animale. Les très récentes explosions épidémiques du virus Chikungunya (depuis 2005) et du virus Zika (2016) ont démontré tout le **potentiel épidémique** de ces organismes dans un contexte d'échanges planétaires et de changement écologique global. Les arbovirus regroupent cinq familles distinctes : Bunyaviridae, Flaviviridae, Rhabdoviridae, Reoviridae et Togaviridae. Il s'agit d'un groupe polyphylétique qui est réuni uniquement sur la base de leur écologie : un cycle à deux hôtes incluant un vecteur arthropode hématophage et un hôte mammifère. Les arbovirus sont, dans leur ensemble, des virus d'arthropodes qui se sont adaptés secondairement à des hôtes vertébrés (Marklewitz et al., 2015; Shi et al., 2015; Junglen, 2016).

a - La dengue

Le virus de la dengue est un Flaviviridae transmis principalement par les moustiques *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus* et est potentiellement présent dans toutes les zones intertropicales. Le virus est capable de se maintenir au sein du vecteur à travers les générations par une transmission trans-ovocytaire ou par cannibalisme (Grunnill and Boots, 2016). Son origine et son histoire évolutive restent très parcellaires à ce jour (Dwivedi et al., 2017). Cinq sérotypes (nommés DENV-1, -2, -3, -4 et -5) sont aujourd'hui connus (Mustafa et al., 2015). Leur infection chez l'être humain est à l'origine d'une pathologie aux multiples symptômes, parmi lesquels on retrouve le plus souvent de fortes fièvres, des céphalées, des douleurs musculaires, des douleurs articulaires et des éruptions cutanées (Guzman et al., 2016). Les formes sévères, qui ne semblent pas liées à un sérotype spécifique, incluent des formes hémorragiques et des syndromes de choc parfois mortels. Cette maladie, même si elle est identifiée depuis plusieurs siècles, a connu une forte expansion au cours des cinquante dernières années pour atteindre entre 50 et 200 millions de cas par an, avec une population exposée de l'ordre de 2,5 milliards d'individus dont les $\frac{3}{4}$ sont présents dans le sud-est asiatique et la région Pacifique (Gyawali et al., 2016).

Comme tous les Flaviviridae, le génome du virus de la Dengue est composé d'un ARN simple brin positif codant pour un ORF d'une polyprotéine permettant la fabrication de 3 protéines structurales (C : capsid, M : incluses dans la membrane et E : enveloppe) ainsi que 7 protéines non structurales (NS1, NS2A et B, NS3, NS4A et B et NS5) qui sont les éléments

fonctionnels du virus (Guzman et al., 2010). L'épidémiologie et la génétique des populations du virus sont particulièrement complexes avec notamment de multiples remplacements de populations (y compris dans les mêmes sérotypes). Cette dynamique a probablement pour origine les alternances de régimes de sélection auxquels sont soumis les virus lors de leurs passages entre les différents hôtes de leur cycle, en raison de leur physiologie, réponses immunitaires ainsi que les goulots d'étranglement fréquents lors de la transmission du virus (Duong et al., 2013c; Duong et al., 2013b).

b - Le chikungunya

Le virus du chikungunya est un Alphavirus transmis principalement par les moustiques du genre *Aedes*. Décrit pour la première fois en 1952 en Tanzanie, le virus circulait vraisemblablement depuis beaucoup plus longtemps sur les continents africain et asiatique (Weaver and Forrester, 2015). Présent à *bas bruit* depuis des décennies, une explosion épidémique dans l'Océan Indien l'a mis sur le devant de la scène en 2005 et il continue sa dispersion depuis cette date (Renault et al., 2012). Depuis 2007, il a été détecté plusieurs fois sur le continent européen induisant de petites épidémies locales.

Le génome du chikungunya est un ARN simple brin positif codant deux ORF de polyprotéines, l'ORF1 code pour quatre protéines non structurales, l'ORF2 code lui pour une protéine de capsid et deux protéines d'enveloppe (Pietila et al., 2017).

La réémergence depuis 2005 est caractérisée par une mutation spécifique (Tsetsarkin et al., 2007) dans le gène d'enveloppe E1 en position 226 (E1-A226V). Tous les virus endémiques africains et asiatiques (présents avant 2005 et circulant encore dans tous ces pays) présentent une Alanine à cette position tandis que les virus épidémiques émergeant depuis 2005 présentent une Valine. Ce changement présente bien entendu un intérêt pour le suivi épidémiologique, mais il est surtout à l'origine d'un changement d'affinités pour les vecteurs. Ainsi, les virus présentant le phénotype Alanine-226 ont une affinité importante pour les moustiques *A. aegypti* tandis que le phénotype Valine-226 lui est plus adapté à l'infection de *A. albopictus*. De plus, le virus émergeant a profité de la dynamique de ce vecteur pour se disperser à travers le monde (Tsetsarkin et al., 2007). A la suite de cette mutation, d'autres adaptations virales ont été mises en évidence et la souche *épidémique* s'éloigne de plus en plus, par adaptations successives à son hôte vecteur, de la souche *endémique* (Tsetsarkin et al., 2009).

5 - Hand Foot Mouth Disease (HFMD)- Entérovirus EV71

Le **syndrome *Hand Foot Mouth Disease*** (ou maladie pied-main-bouche) est une maladie qui atteint principalement les enfants en bas âge, caractérisée par des pics fébriles et des éruptions cutanées limitées aux pieds et aux mains avec parfois des ulcères buccaux. En de rares cas, des complications sévères peuvent engager le pronostic vital avec des méningites, des œdèmes pulmonaires ou des myocardites. Plusieurs virus du groupe des **entérovirus** peuvent être à l'origine de la maladie. Le plus souvent les souches incriminées appartiennent aux groupes Coxsackievirus A et des Entérovirus humains sérotype 71 (EV71) (Sinha et al., 2014). Ces deux groupes de virus sont apparentés et le EV71 semble avoir divergé des autres Coxsackievirus depuis peu de temps. Par ailleurs, certaines études indiquent une divergence possible au cours des années 1940 (Tee et al., 2010). La première description formelle du HFMD date seulement de 1958, suite à une épidémie à Toronto au Canada (Robinson et al., 1958), bien que ce syndrome existe sans doute depuis beaucoup plus longtemps.

Les entérovirus présentent quatre protéines structurales (gènes VP) : la capsid interne est composée de protéines VP4, la capsid externe des protéines VP1, VP2 et VP3. VP1 est la protéine la plus externe, elle est impliquée dans la virulence du virus, constitue une cible pour le système immunitaire de l'hôte (Yang et al., 2011; Kataoka et al., 2015) et est utilisée pour classifier les entérovirus. Une variation dans la séquence de VP1 a été démontrée comme facteur contribuant à la sévérité de la maladie chez l'homme (McMinn et al., 2001; Sanders et al., 2006). Au sein de la protéine, plusieurs positions ont été identifiées comme impliquées dans la virulence comme les résidus G/Q/R en position 145 et 164 de la protéine (Li et al., 2011; Huang et al., 2015; Caine et al., 2016). Il existe ainsi trois génogroupes reconnus au sein de EV71 nommés A, B et C, les deux derniers étant eux-mêmes divisés en cinq génotypes de B1 à B5 et C1 à C5 (Brown et al., 1999).

CHAPITRE 2 - EN QUETE DES ORIGINES : D'OU VIENT *WOLBACHIA* ?

I - LES *WOLBACHIA* DE NEMATODES : CLEF OU SERRURE ?

a - Les hôtes filaires

Bien que ma thèse ait été focalisée sur les bactériophages de *Wolbachia*, le choix du *modèle* filaire résulte, comme beaucoup de choix dans nos disciplines, d'une conjonction entre un intérêt scientifique et une rencontre. Le travail entrepris voilà 6 ans avec **Coralie Martin**, immunologiste au MNHN, et **Odile Bain**, spécialiste mondialement reconnue des filaires au MNHN et scientifique insatiable, qui nous a malheureusement quitté en 2012, m'a permis de développer une thématique de recherche ciblée sur la **diversité et l'évolution des *Wolbachia* au sein des filaires**. Bien que de nombreuses études aient été menées sur ce modèle, elles restaient jusque là très limitées en terme de diversité des hôtes filaires pour deux raisons principales : i) un effort particulièrement important a naturellement été réalisé sur des filaires humaines ou de modèles murins et ii) l'accès au matériel biologique est très difficile pour une large partie de la diversité des filaires qui ont des hôtes rarement étudiés. La collaboration avec le Muséum, l'accès à sa collection de parasites et son réseau de collaborateurs parasitologistes nous a permis de rassembler un ensemble d'échantillons inégalé. Ceci nous a permis de réviser entièrement la phylogénie des filaires elles-mêmes, mais également de réaliser une analyse phylogénétique et co-phylogénétique des *Wolbachia* de filaires les plus complètes à ce jour. Ce travail s'est concrétisé dans la réalisation du stage de Master puis de la thèse d'**Emilie Lefoulon** et du stage de Master de **Jérôme Bourret**.

Les filaires regroupent l'ensemble des espèces de nématodes de la famille des Onchocercidae. Elles sont caractérisées par un large spectre d'hôtes aussi bien des squamates, que des crocodiliens, des amphibiens, des mammifères ou des oiseaux. Certaines espèces ont fait l'objet de nombreuses études du fait de leur intérêt médical ou vétérinaire, mais la grande majorité des taxons n'a été que peu étudiée et, aujourd'hui, on connaît peu de choses sur la réelle diversité biologique de ces espèces (Bain, 2002). Jusqu'à notre révision de la phylogénie, 8 sous familles comprenant 88 genres étaient décrites (Bain et al., 2013). Les convergences morphologiques dues à leur style de vie parasite, aussi bien que l'absence de fossiles, rendent cependant très difficile l'étude de l'évolution de ces espèces (Chabaud and

Bain, 1994). Ainsi, l'origine de l'évolution et la structuration même de la phylogénie des Onchocercidae restaient peu sûres. De nombreuses études morphologiques et biologiques ont essayé de clarifier l'évolution des Onchocercidae. Depuis les travaux pionniers de Wehr en 1935 (Wehr, 1935), la phylogénie de la famille a été reconstruite plusieurs fois (Chabaud and Choquet, 1953; Chabaud and Bain, 1994). De plus, le développement des méthodes moléculaires a permis la mise en place des premières phylogénies moléculaires dans les années 90 (Xie et al., 1994). Les études successives n'ont cependant pas permis la résolution des nœuds profonds de la phylogénie des Onchocercidae du fait de la rareté chronique des échantillons, et donc d'une couverture faible de la diversité des filaires. De plus, l'utilisation de marqueurs différents entre les études ne permet pas une comparaison entre les différentes phylogénies (Casiraghi et al., 2001a; Ferri et al., 2009; Lefoulon et al., 2012).

Les faiblesses des données phylogénétiques et cladistiques des filaires rendent impossible les études co-phylogénétiques avec leurs symbiotes *Wolbachia*. Il a donc fallu réaliser une première étude visant à établir une phylogénie la plus complète possible de ce groupe.

b - Refondation de la phylogénie des Filaires

- *Collaborateurs : Coralie Martin, Odile Bain[†], Cyrille d'Haese*
- *Etudiant : Emilie Lefoulon (PhD)*
- *Publication : Lefoulon et al., 2016*

Afin de réaliser une étude phylogénétique plus complète de la famille des Onchocercidae, nous avons réuni un échantillonnage couvrant 48 espèces de 25 genres différents, représentant 7 des 8 sous-familles connues. Nous n'avons pu avoir accès à des échantillons de la huitième sous-famille, les Lemdaninae, en raison de la rareté de ces espèces. Pas moins de huit gènes ont été séquencés pour chacune des espèces : deux mitochondriaux (12S et coxI) et cinq gènes nucléaires (18S, 28S, MyoHC, rbp1 et hsp70). L'analyse phylogénétique a été réalisée sur la base d'un jeu de données partitionnées, analysées par inférence bayésienne. Les résultats obtenus pour cette étude nous ont permis de réaliser la phylogénie la plus complète à ce jour des Onchocercidae mais également d'enraciner cet arbre en utilisant deux espèces de la famille des Filariidae précédemment identifiées comme proche des Onchocercidae (Lefoulon et al., 2015).

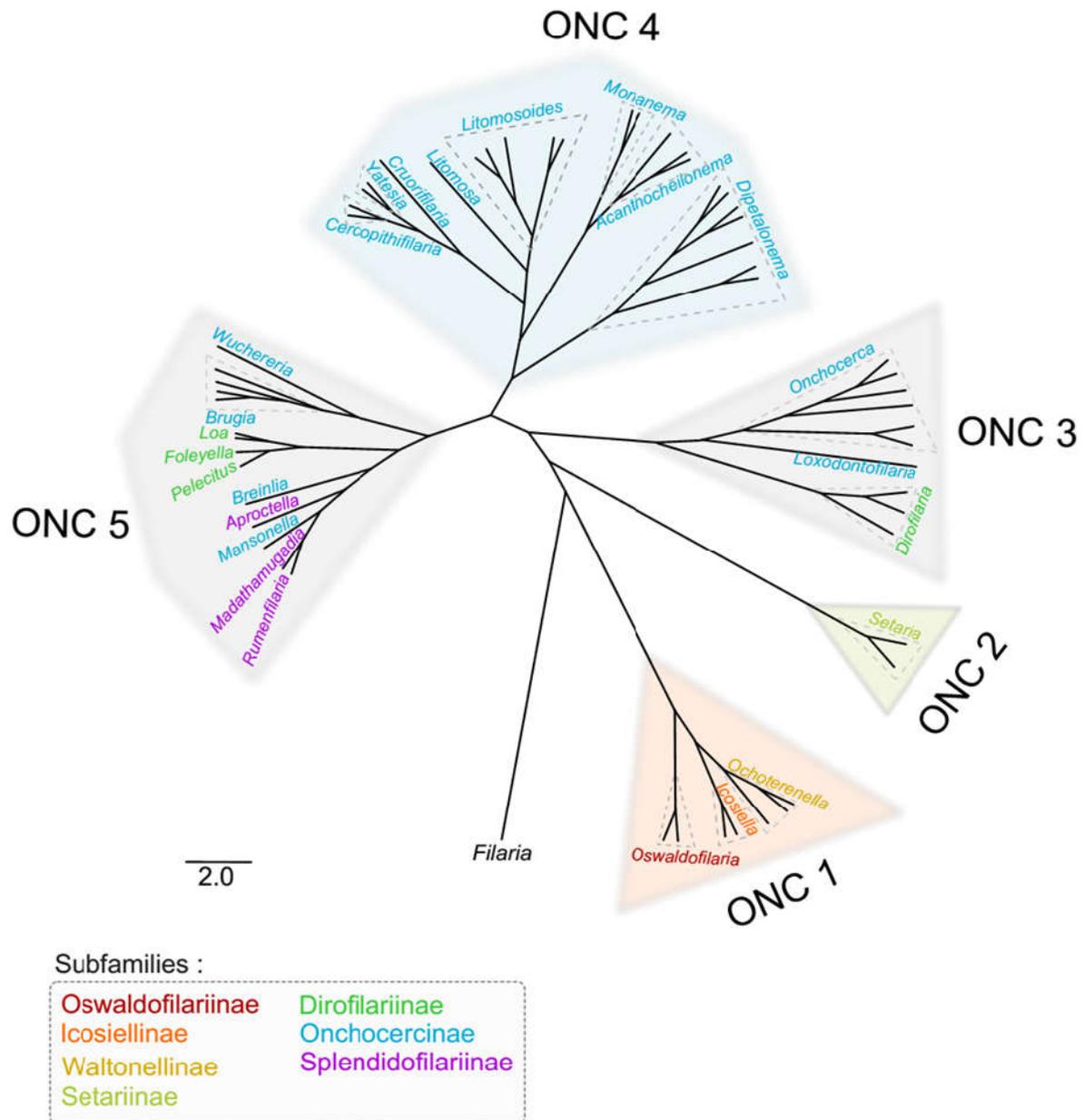


Figure 2.1 - Phylogénie des filaires incluant 48 espèces de 25 genres différents représentant 7 des 8 sous-familles connues, réalisée par maximum de vraisemblance sur deux gènes mitochondriaux (12S et *cox1*) et cinq gènes nucléaires (18S, 28S, MyoHC, *rbp1* et *hsp70*) (Lefoulon et al., 2015). L'assignation aux différentes sous-familles est donnée par le code couleur de la légende.

Ces résultats (Figure 2.1) confirment que les quatre sous-familles considérées préalablement comme ancestrales (Oswaldofilariidae, Icosiellae, Ochoterenellae et Setarinae) émergent bien à la base de la phylogénie des Onchocercidae et sont chacune monophylétiques. Ces espèces se regroupent en deux clades indépendants nommés ONC1 et ONC2. Les trois autres sous-familles regroupent la majorité des espèces connues, à savoir : Dirofiliariinae, Onchocercinae

et Splendidofilariinae. Ce nouvel arbre phylogénétique décrit une histoire originale redistribuant complètement les espèces dans trois clades (ONC 3, 4 et 5) ne recoupant pas les anciennes sous-familles. Ainsi, les espèces de la sous-famille des Onchocercinae se répartissent sur les trois clades. Les espèces de la sous-famille des Dirofilariinae se retrouvent répartis entre les clades ONC3 et 5. Les espèces de la sous-famille des Splendidofilariinae se retrouvent dans le clade ONC5 mais intercalées avec des espèces de la sous-famille des Onchocercinae. Ces résultats remettent donc complètement en question la systématique classique de ces espèces. De manière très intéressante, l'ensemble des espèces pathogènes de l'homme, en dehors des espèces du genre *Onchocerca*, se retrouve lié phylogénétiquement au sein du même clade ONC 5 (*Wuchereria bancrofti*, *Brugia spp.*, *Loa loa*, *Mansonella perforata*) marquant potentiellement un trait évolutif.

Ces résultats novateurs, de part la portée du jeu de données et de l'analyse que nous avons réalisée, confirment que la taxonomie des Onchocercidae doit être profondément révisée. De nouvelles questions émergent quant aux relations évolutives des différentes espèces de filaires. De nouveaux travaux devront donc être menés en collaboration avec des taxonomistes et en incluant, autant que possible, la sous-famille des Lemdaninae. Ils nous permettent cependant de reprendre correctement l'étude de la co-évolution des filaires et de leurs symbiotes *Wolbachia*.

II - L'ORIGINE EVOLUTIVE DE *WOLBACHIA*

a - Le sens de l'évolution de *Wolbachia*

- *Collaborateurs* : Coralie Martin, Odile Bain[†], Cyrille d'Haese
- *Etudiant* : Emilie Lefoulon (PhD)
- *Publication* : Lefoulon et al., 2016

L'origine évolutive des *Wolbachia* a toujours été un mystère pour les chercheurs. Elle appartient au groupe particulièrement diversifié des Rickettsies, qui comptent de nombreuses bactéries intracellulaires pathogènes pour différents organismes. Cependant, l'âge estimé de la divergence entre les *Wolbachia* et les autres rickettsies est situé entre 50 et 100 millions d'années (Bourtzis and Miller, 2003).

Les tentatives pour résoudre cette question en réalisant des phylogénies se sont heurtées à la difficulté d'enraciner les arbres produits de manière adéquate. En effet, les rickettsies les plus

proches des *Wolbachia* (les genres *Ehrlichia* et *Anaplasma*) restent très divergentes de ces dernières et il apparaît qu'un phénomène d'attraction des longues branches fausse toute reconstruction. Ainsi, les différentes études publiées aboutissent à des conclusions divergentes, quel que soit le jeu de données ou la fiabilité des analyses qui sont parfois faibles. Sur les 19 phylogénies enracinées publiées à cette date :

- i) 5 indiquent une origine des *Wolbachia*, au sein des clades infectant les arthropodes (A ou B) (Giordano et al., 1995; Anderson and Karr, 2001; Bordenstein and Rosengaus, 2005; Bordenstein et al., 2009; Koutsovoulos et al., 2014);
- ii) 9 trouvent une origine entre les clades infectant les arthropodes (A et B) et ceux infectant les nématodes (C, D, et J) (Bandi et al., 1998; Taylor and Hoerauf, 1999; Dumler et al., 2001; Unver et al., 2003; Fenn et al., 2006; Ferri et al., 2011; Comandatore et al., 2013; Baldini et al., 2014; Gerth et al., 2014);
- iii) 4 indiquent une origine au sein des nématodes infectant les filaires (clades C et D) (Casiraghi et al., 2004; Czarnetzki and Tebbe, 2004; Luchetti et al., 2004; Haegeman et al., 2009);
- iv) finalement une dernière étude conclut à l'impossibilité de déterminer correctement un enracinement et donc une origine des *Wolbachia* à l'aide des méthodes classiques (Lo et al., 2002), ce qui est probablement la conclusion la plus raisonnable possible.

Les difficultés pour enraciner correctement l'arbre phylogénétique des *Wolbachia*, nous a amené à employer une méthode alternative indirecte afin d'estimer l'origine de l'acquisition des bactéries. Nous avons donc utilisé le logiciel JANE (Conow et al., 2010) qui permet d'estimer par parcimonie un « coût évolutif » du positionnement des différentes racines possibles (Figure 2.2).

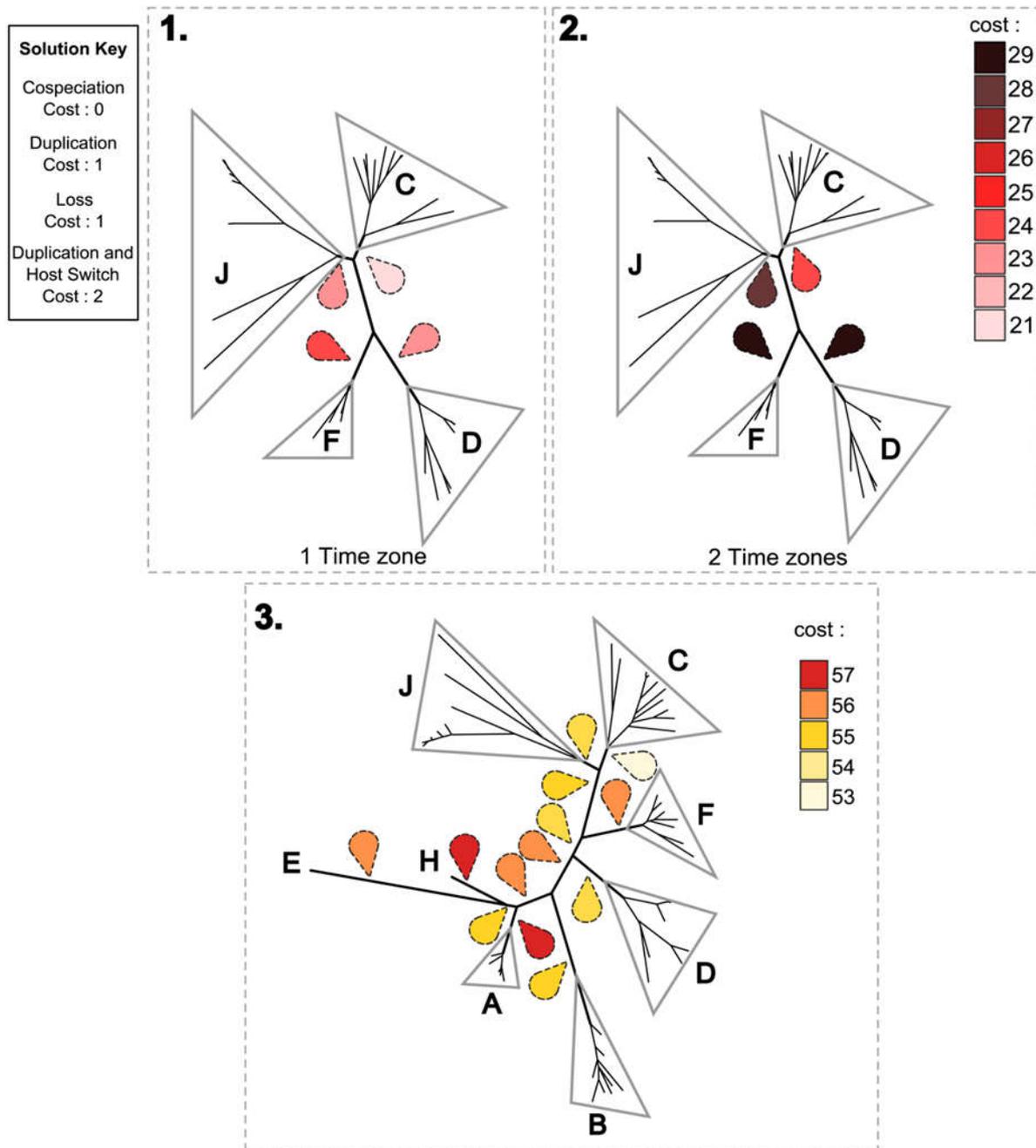


Figure 2.2 - Estimation du coût des scénarios de co-évolution basés sur les différentes racines possibles de la phylogénie des *Wolbachia*. La représentation des scénarios les moins coûteux sont déterminés en utilisant les coûts suivants : co-spéciation = 0; duplication = 1; perte = 1; et duplication et changement d'hôtes = 2. Les gouttes colorées indiquent le coût associé au scénario si la racine est placée à l'endroit indiqué. 1) reconstruction co-évolutive entre *Wolbachia* et ses hôtes filaires sans contraintes de temps; 2) reconstruction co-évolutive entre *Wolbachia* et ses hôtes filaires avec contraintes de temps et 3) reconstruction co-évolutive entre *Wolbachia* et ses hôtes filaires et arthropodes sans contraintes de temps (Lefoulon et al., 2016).

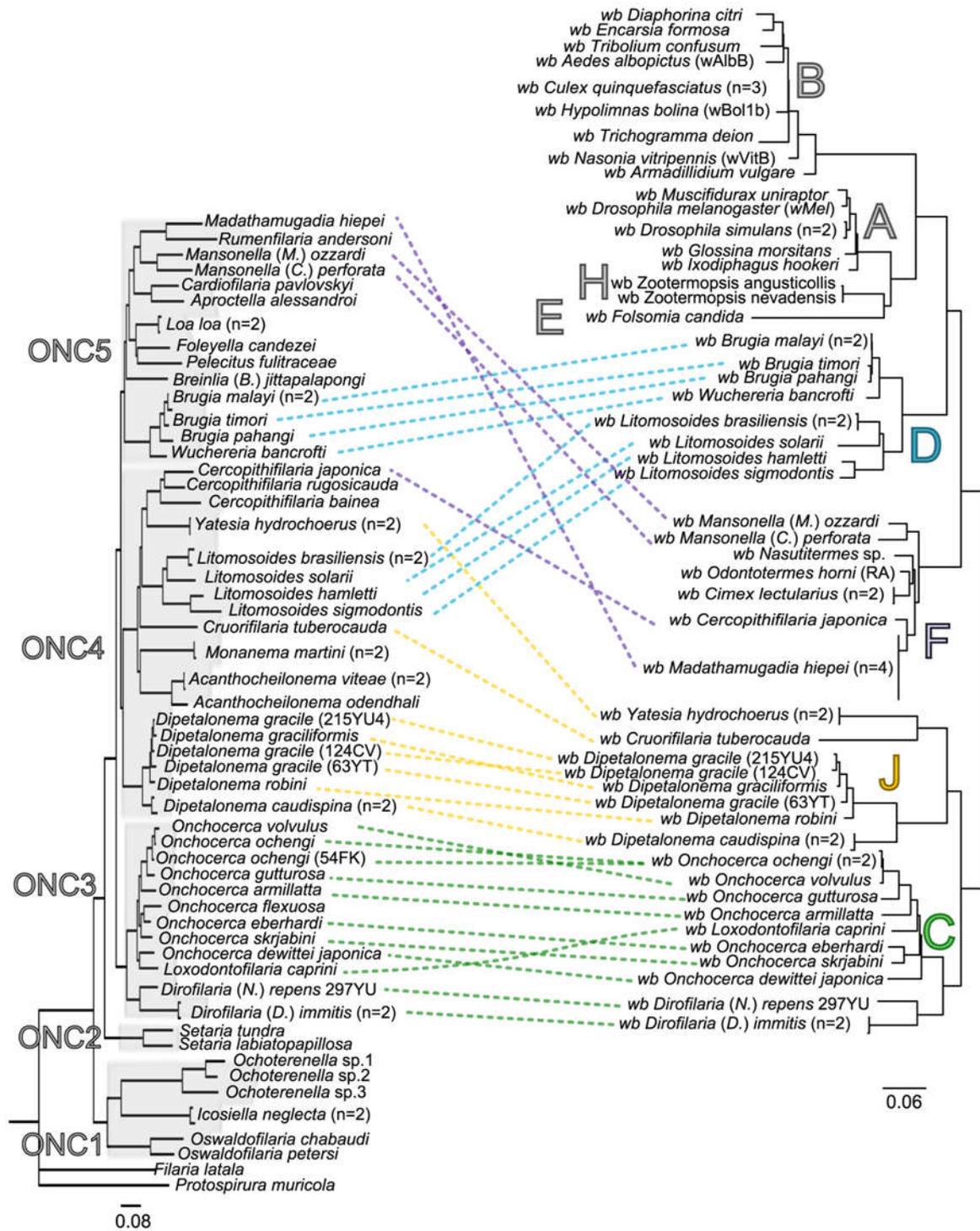


Figure 2.3 - Co-phylogénie des *Wolbachia* et de leurs hôtes filaires (Lefoulon et al., 2016).

Les résultats de nos analyses co-phylogénétiques suggèrent une lecture différente de l'histoire évolutive actuellement admise de *Wolbachia*. Les deux méthodes employées indiquent toutes deux que la spéciation qui a conduit aux *Wolbachia* du type C (et parfois à l'ensemble C et J) semble plus ancienne que la spéciation ayant conduit à l'émergence des autres *Wolbachia* infectants les filaires. Cela nous conduit à émettre la conclusion que les super-groupes F et D sont les clades les plus dérivés des *Wolbachia* de filaires. Par extension, cela implique que les *Wolbachia* d'arthropodes seraient apparues secondairement.

L'analyse par la méthode d'estimation du coût des événements est complexe à interpréter (Figure 2.2). En effet, cette méthode se fonde sur un régime de coût simple (co-spéciation : 0, duplication : 1, duplication + changement d'hôte : 2, perte : 1) (Charleston, 1998) et un certain nombre de contraintes évolutives ne peuvent pas être prises en compte. Les différences de coût observées entre les scénarios sont faibles et il n'est pas possible de conclure à une différence significative entre ces derniers. Les résultats varient en fonction des échantillonnages utilisés : plus le nombre de souches analysées est grand, moins les différences de coût sont importantes entre les scénarios les plus parcimonieux. Toutefois, un enracinement avec les *Wolbachia* des super-groupes C et/ou J comme groupe frère de l'ensemble des *Wolbachia* induit le scénario au plus faible coût évolutif pour toutes analyses. L'analyse restreinte aux souches infectant les filaires met en avant l'importance d'imposer des zones de temps à la méthode. Cependant, imposer des zones de temps sur la topologie des hôtes incluant les nématodes et les arthropodes introduit de nombreux biais du fait des temps évolutifs différents qu'il existe entre les deux groupes comparés à ceux existant au sein de chacun d'eux. Nos résultats suggèrent toutefois que les *Wolbachia* pourraient avoir infectées dans un premier temps des hôtes filaires (Figure 2.3). Ces *Wolbachia* hypothétiques auraient divergées dans un premier temps en symbiotes infectant les clades de filaire ONC3 puis ONC4 et seraient caractérisées par une forte coévolution donnant les super-groupes C et J. Ainsi, les *Wolbachia* des super-groupes A et B, qui incluent la plupart des *Wolbachia* d'arthropodes, pourraient avoir émergées secondairement des *Wolbachia* de filaires. Cette hypothèse est en contradiction avec 74% des phylogénies enracinées de *Wolbachia* produites jusqu'à maintenant, mais elle tente justement de dépasser le problème d'attraction de longues branches qui réduisent leurs pertinences.

Toutes ces données nous ont permis de remettre en perspective l'ensemble des connaissances acquises sur *Wolbachia* au cours des précédentes décennies. Ces changements seront explicités dans le chapitre suivant.

b - Pourquoi le sens est important ?

Nos études sur la phylogénie de *Wolbachia* ne sont pas juste une recherche de l'origine de la bactérie pour simplement répondre à cette question fondamentale. En effet, le sens de lecture de l'évolution de *Wolbachia* ne change pas seulement l'interprétation d'un arbre phylogénétique mais il modifie profondément toute l'histoire évolutive et co-évolutive de la bactérie. La bactérie *Wolbachia* est transmise verticalement bien que de nombreux événements de transmission horizontale semblent avoir eu lieu à l'échelle évolutive (Raychoudhury et al., 2009; Gerth et al., 2013). Des modélisations prédisent que les modes de transmission des bactéries entre les hôtes constituent une forte pression de sélection et que la transmission verticale tend à sélectionner des interactions mutualistes (Stewart et al., 2005; Pagan et al., 2014). Toutefois des études portant sur *Wolbachia* ont déjà suggéré que la transmission verticale ne constitue pas, à elle seule, une condition pour une évolution vers le mutualisme (Vavre et al., 2001). L'hypothèse d'une acquisition chez les arthropodes sous-entend donc qu'il y a une interaction originelle de type parasitaire et que le transfert plus tardif chez les filaires se serait accompagné d'une transition vers une interaction mutualiste. Au contraire, si le sens évolutif correspond au scénario que nous suggèrent nos données avec une origine de la symbiose chez les filaires, cela implique que les relations entre hôte et symbiote seraient, à l'origine, mutualiste et que la bactérie acquise secondairement chez les arthropodes aurait évolué du mutualisme vers le parasitisme.

D'un point de vue plus fonctionnel, des comparaisons génomiques mettent en évidence un certain nombre de différences entre souches de *Wolbachia* (Tableau 2.4).

	Hôtes				
	Arthropodes		Nématodes	Mixte	
Super-groupe	A	B	C	D	F
Nombre de génomes séquencés	9	6	2	1	1 (arthropode)
Taille des génomes (Mb)	1,02 - 1,44	1,11 - 1,48	0,95 - 0,96	1,08	1,25
G+C content (%)	34 - 35,7	33,8 - 34,3	32,1	34	36,3
ORF	761-1240	881-1317	680-682	844	1194
Pseudogènes	75-543	71-336	39-42	98	130
IS (%)	6,1-11	11	0,5-1	2,6	10
Phage	Oui (100%)	Oui (100%)	Non	Non	Oui

Tableau 2.4 Caractéristiques des génomes séquencés complets de *Wolbachia* (en 2016).

Super groupe A : *Glossina morsitans*, *Operophtera brumata*, *Drosophila melanogaster*, *Drosophila simulans*, *Nomada flava*, *Nomada panzeri*, *Nomada ferruginata*, *Drosophila suzukii*, *Drosophila annanassae*. **Super groupe B** : *Nasonia vitripennis*, *Trichogramma pretiosum*, *Laodelphax striatellus*, *Diaphorina citri*, *Culex quiquefasciatus*, *Culex pipiens molestus*. **Super groupe C** : *Onchocerca ochengi*, *Onchocerca volvulus*. **Super groupe D** : *Brugia malayi*. **Super groupe F** : *Cimex lectarius*.

Les génomes séquencés des *Wolbachia* infectant les filaires sont en moyenne plus petits que ceux infectant les arthropodes. Il existe également un grand nombre d'éléments insérés, mobiles ou dupliqués dans les génomes de *Wolbachia* d'arthropodes, contrairement à ceux des symbiotes de filaires. De même, la présence de prophages semble propre aux *Wolbachia* du super-groupe A, du super-groupe B et aux bactéries des hôtes arthropodes du super-groupe F. Ces éléments indiquent que les *Wolbachia* du super-groupe A ou B présentent une plus grande acquisition de plasticité et une invasion de leur génome par des éléments mobiles. Les génomes des bactéries infectant les arthropodes présentent ainsi une augmentation sensible de leur *fluidité* et sont soumis à des recombinaisons constantes (Brownlie and O'Neill, 2005). Cette caractéristique unique chez les bactéries intracellulaires obligatoires pourrait être liée à leur très grande diversité et aux multiples transferts horizontaux (Vavre et al., 1999) et donc à la très haute adaptabilité qui caractérise ces souches (Martin and Gavotte, 2010). Au contraire, les génomes des bactéries infectant les filaires présentent les caractéristiques classiques des symbiotes intracellulaires obligatoires, suivant les règles de réduction des génomes (Darby et al., 2007) : réduction de la taille des génomes, diminution des ORF, élimination des pseudogènes et purge des ADN *parasites* (IS, transposons, phages etc.).

Ainsi, selon le sens évolutif de la bactérie, les mécanismes impliqués dans les caractéristiques de la structure de ses génomes sont radicalement opposés. Le sens généralement admis, avec une origine de l'infection chez les arthropodes et une transmission tardive aux nématodes, implique donc deux régimes évolutifs parallèles drastiquement différents.

CHAPITRE 3 - CO-EVOLUTION :

I - LA DIVERSIFICATION DES CLADES CHEZ *WOLBACHIA*

a - Diversité et spéciation des *Wolbachia* de filaires

- *Collaborateurs* : Coralie Martin, Odile Bain[†]
- *Etudiants* : Emilie Lefoulon (PhD)
- *Publications* : (Lefoulon et al., 2016)

L'étude des Onchocercidae nous a apporté un ensemble de nouvelles informations concernant les *Wolbachia* qui infectent les filaires en nous permettant, d'une part, de déterminer l'infection chez de nouvelles espèces et, d'autre part, d'étudier l'histoire évolutive et la co-

évolution entre les bactéries et leurs hôtes sur des bases nouvelles. L'ensemble de ces analyses a été concrétisé par la publication d'un article particulièrement important (Lefoulon et al., 2016).

Pour ce travail, nous avons réalisé la phylogénie la plus complète à ce jour des *Wolbachia* infectant les filaires. L'arbre phylogénétique a été construit sur la base de la concaténation de sept gènes étudiés (16 rDNA, groEL, ftsZ, dnaA, gatB, fbpA et coxA), comprenant un total de 63 souches *Wolbachia* issues des sept super-groupes précédemment découverts (A, B, H, D, F, C, J) plus la souche infectant le collembole *Folsomia candida* (Figure 3.1).

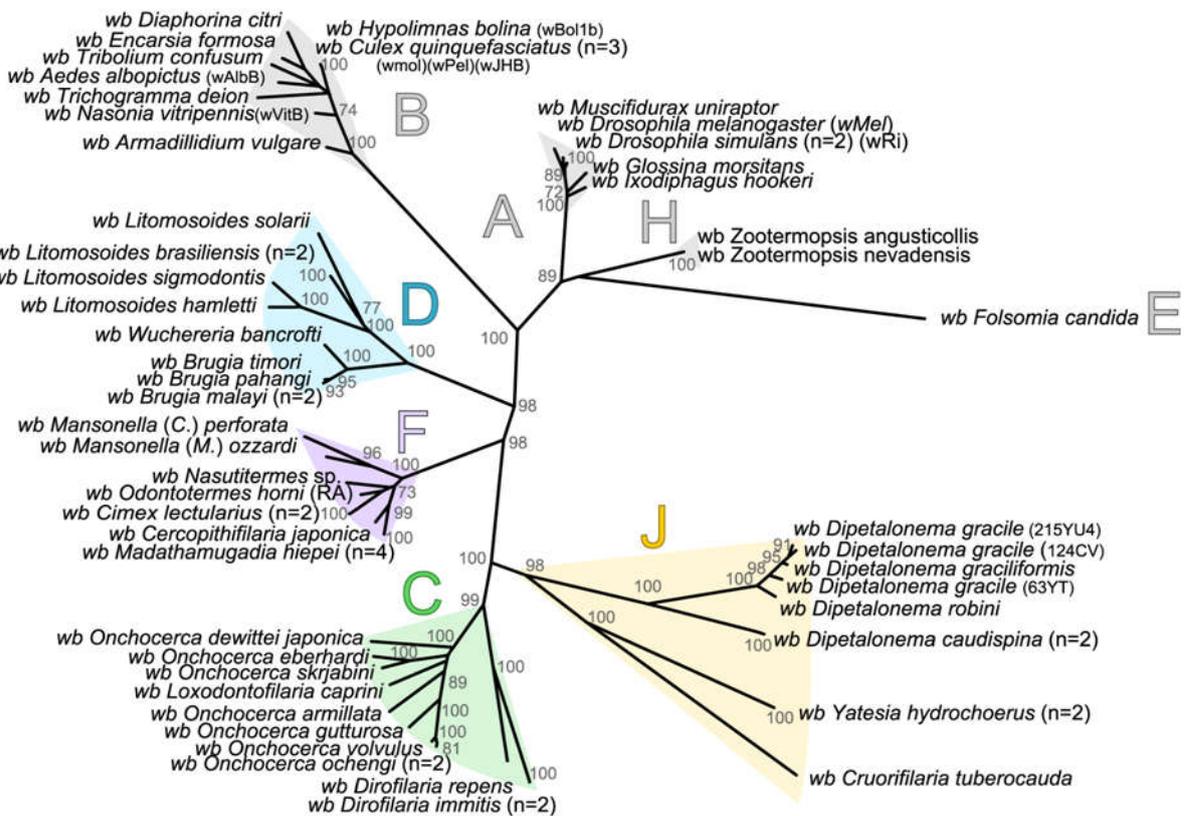


Figure 3.1 - Phylogénie des *Wolbachia* reconstruite sur la base de 7 gènes (16 rDNA, groEL, ftsZ, dnaA, gatB, fbpA et coxA) (Lefoulon et al., 2016).

Ce travail, le plus complet à ce jour, nous a permis de tirer un nombre important de nouvelles informations concernant la bactérie et son évolution. Il apparaît que la souche infectant *Folsomia candida* est isolée des autres groupes, comme précédemment (Vandekerckhove et al., 1999), mais surtout qu'elle constitue un groupe frère des super-groupes A et H. Ces trois

super-groupes pourraient même être considérés comme un seul clade, mais de nouvelles analyses sont nécessaires.

Nous avons également mis en évidence une unicité phylogénétique des *Wolbachia* infectant les espèces du genre *Litomosoides* au sein du super-groupe D. De la même manière, les souches infectant les espèces du genre *Dipetalonema* forment un clade fortement soutenu au sein du super-groupe J. La réalité du super-groupe J a d'ailleurs été confirmée par nos travaux et nous avons démontré qu'il est un groupe frère du super-groupe C. Enfin, le groupe F est confirmé comme groupe raciné parmi les autres super-groupes de *Wolbachia* infectant les filaires.

Des événements de recombinaison ont été détectés dans les gènes 16S rDNA, *fbpA* et *groEL* mais uniquement entre des souches des clades A et B, comme précédemment décrit (Baldo et al., 2006). Cependant, les phylogénies individuelles issues de ces gènes présentent des topologies identiques aux données concaténées.

Afin de déterminer les événements de co-évolution et de transferts horizontaux, nous avons utilisé la méthode PACo (Balbuena et al., 2013) qui permet de comparer, à l'aide de méthodes géométriques, les topologies des arbres phylogénétiques des hôtes et des symbiotes pour en identifier les éléments incompatibles en les indiquant à l'aide d'une représentation vectorielle. Ces travaux ont permis de mettre en évidence un régime global de co-phylogénie entre les bactéries et leurs hôtes filaires, identifié préalablement sur un jeu de données plus réduit (Bandi et al., 1998). Mais, pour la première fois chez les filaires, en dehors du super-groupe F, nous avons identifié de multiples transferts horizontaux (Figure 3.2).

Ainsi, le super-groupe D présente deux clades (d'un côté les espèces de *Brugia* et *Wuchereria* et de l'autre les *Litomosoides*) clairement co-évolués avec leurs hôtes au sein des clades mais avec un hiatus évolutif tout aussi clair entre les deux groupes d'hôtes. De la même manière, pour le super-groupe J, si les symbiotes des espèces du genre *Dipetalonema* ont co-évolués avec leurs hôtes, ceux de l'espèce *Cruofilaria tubero cauda* et *Yatesia hydrochoerus* sont en revanche très éloignés au sein de la phylogénie des hôtes indiquant deux transferts horizontaux indépendants. Enfin, le super-groupe C, même s'il est celui qui est le plus co-évolué avec ses hôtes, présente tout de même deux inconsistances avec les espèces *Onchocerca volvulus* et *Loxodontofilaria caprini*. Donc, bien que la co-phylogénie soit

globalement respectée, il existe des preuves de plusieurs transferts horizontaux à l'échelle évolutive chez les *Wolbachia* de filaires.

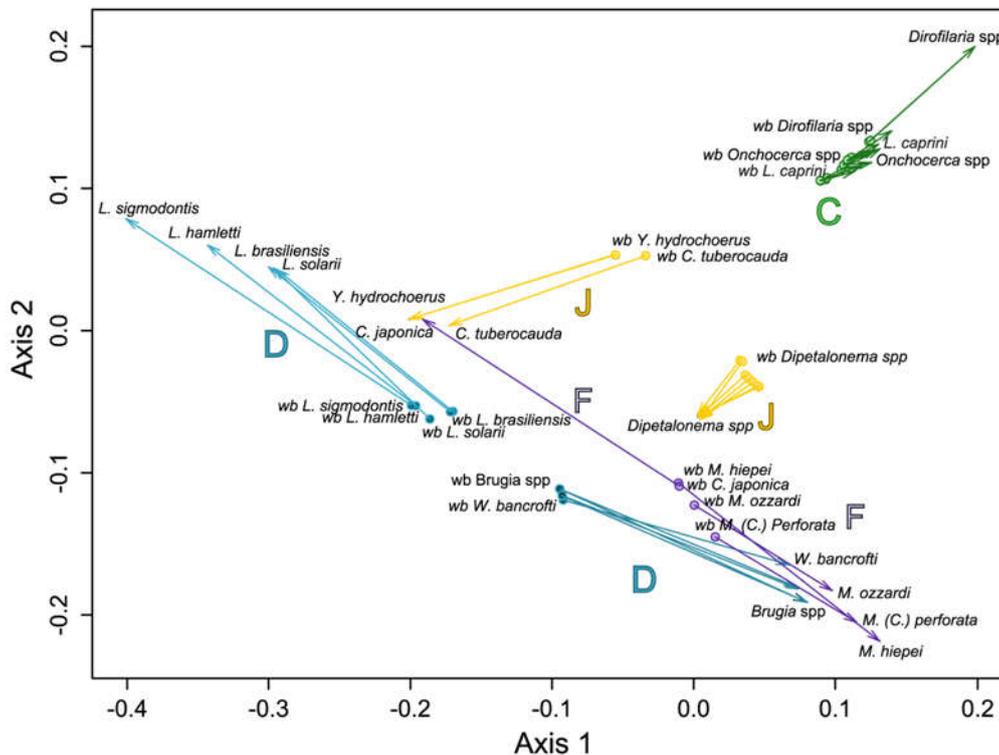


Figure 3.2 - Analyse PACo des phylogénies de *Wolbachia* et de ses hôtes filaires. Représentation d'une analyse procrustéenne par superposition minimisant les différences entre les deux partenaires. Pour chaque vecteur, le point de départ représente la configuration de la bactérie et la flèche celle de l'hôte filaire associé. La longueur du vecteur représente l'ajustement global entre les deux phylogénies. Abréviation: *wb*= *Wolbachia* (Lefoulon et al., 2016).

Ces travaux nous ont donc permis de remettre à plat l'ensemble de la phylogénie des *Wolbachia* infectant les filaires et surtout de remettre en cause le "dogme" de la co-évolution complète entre les filaires et leurs bactéries. Ces expérimentations doivent maintenant être poursuivies, mais restent malheureusement limitées par la disponibilité du matériel biologique.

b - Le clade E : où sont les collembolés ?

- *Collaborateurs* : Coralie Martin, Cyrille d'Haese, Emilie Lefoulon.
- *Etudiant* : Jules Rodrigues (M1-M2) - M1 prévu pour 2017

Nos études sur les filaires nous ont confortés dans la conviction que les clefs de l'évolution de ces bactéries si particulières se trouvent dans les groupes de taxons hôtes jusque là peu étudiés dans leurs dimensions évolutives et co-évolutives. C'est pour cela que depuis le début de l'année 2016 nous avons entrepris l'étude, sur la même base de ce que nous avons réalisé sur les filaires, d'un autre groupe d'organismes : **les Collemboles**. Parmi les très nombreux groupes taxonomiques infectés par *Wolbachia*, la classe des Collemboles est à la fois particulièrement intéressant et très peu étudié. Au sein de ces organismes, structurés en 4 ordres pour environ 7000 espèces décrites, la bactérie a été typée sur un gène chez 5 espèces seulement sur 7 testées, ce qui ne représente que 2 des ordres de la classe. Le génome de la souche de bactérie présente chez *Folsomia candida* a depuis été séquencé en raison de l'importance de cette espèce qui est un modèle d'écotoxicologie particulièrement utilisé. Nous avons donc jeté notre dévolu sur ce groupe pour deux raisons principales. Tout d'abord la particularité du super-groupe E, dont on ne connaît que 4 représentants infectant les collemboles *Folsomia candida*, *Mesaphorura macrochaeta*, *Mesaphorura italica* et *Paratullbergia callipygos* (Czarnetzki and Tebbe, 2004) et qui apparaît comme groupe frère des super-groupes A et H (Figure 2.3 et 3.1). Le statut exact de ce clade est questionné en raison du très faible échantillonnage réalisé chez les Collemboles mais aussi car seul le symbiote de *F. candida* a été correctement typé via une analyse multi-locus servant de *standard* accepté aujourd'hui dans la détermination des positions phylogénétiques des *Wolbachia*.

Ces arthropodes ont émergé au Dévonien, il y a plus de 400 millions d'années, avant les insectes et les nématodes filaires, ce qui en fait un sujet d'étude très intéressant concernant la diversité et l'origine évolutive de *Wolbachia*. L'histoire de l'infection de ces organismes par *Wolbachia* revêt donc un intérêt particulier pour savoir si elle est antérieure ou postérieure à celle des arthropodes (et des filaires) et quelles en ont été les modalités.

Les premiers résultats, non encore publiés, sont présentés ici. Ils ne sont pas encore suffisants pour en tirer quelque conclusion que ce soit, mais ils nous donnent d'intéressantes pistes de travail. Un ensemble de 25 espèces issues des 4 ordres des Collemboles ont été échantillonnées (Figure 3.2) et pour chaque espèce entre 2 et 9 individus ont été étudiés.

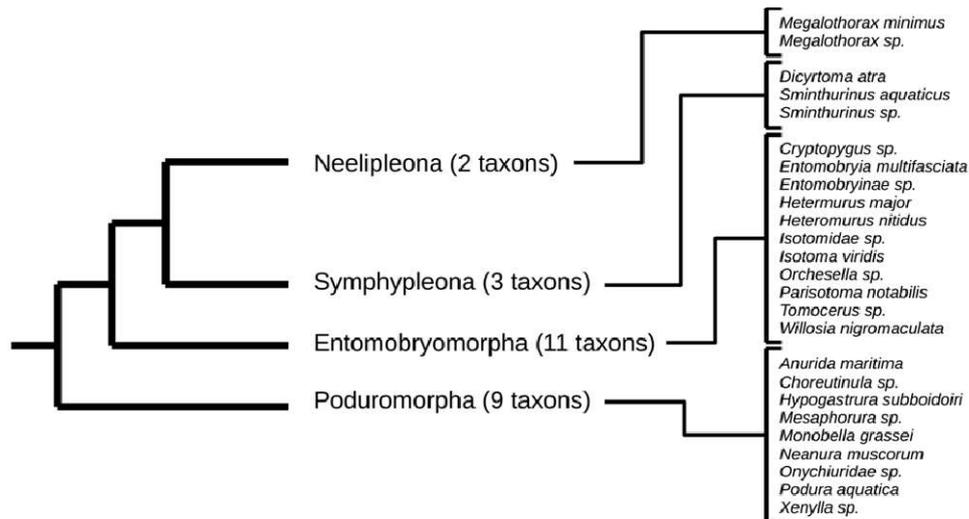


Figure 3.3 - Liste des espèces de collemboles étudiées et leurs appartenances aux différents ordres (données non publiées).

La première étape, tout comme pour le travail que nous avons mené sur les Filaires, consiste à réaliser une phylogénie solide des hôtes. En effet, il existe beaucoup de lacunes dans les connaissances des Collemboles et, en particulier, les données de génétique moléculaire sont très parcellaires. Le gène mitochondrial *CoxI* a été séquencé avec succès chez 18 espèces, nous permettant de réaliser une première phylogénie des Collemboles. Le gène *DnaA* de la bactérie a également été séquencé pour déterminer la position phylogénétique des *Wolbachia* (Figure 3.4).

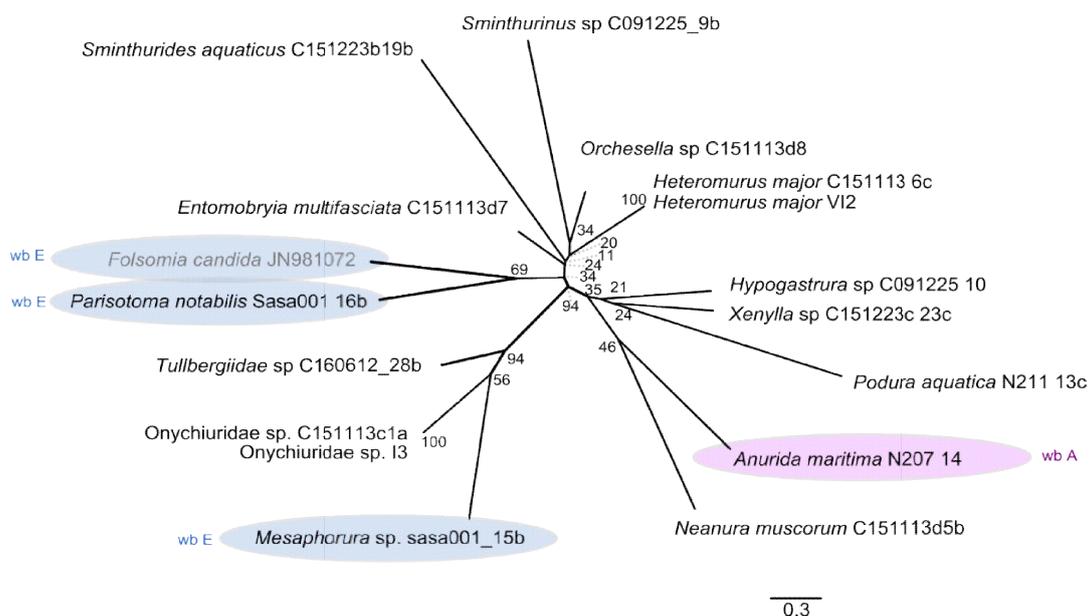


Figure 3.4 - Phylogénie des 18 espèces de *Collemboles* étudiées, arbre réalisé par Maximum de Vraisemblance sur la séquence du gène *CoxI*. Les espèces infectées par *Wolbachia* sont colorées et le clade des souches infectantes est indiqué (données non publiées).

Les principaux résultats obtenus peuvent être résumés en 3 points :

i) Les trois ordres Poduromorpha, Entomobryomorpha et Neelipleiona comportent des espèces infectées.

ii) Les 3 espèces de l'ordre des Symphypleona (*Dicyrtoma atra*, *Sminthurinus aquaticus* and *Sminthurinus sp.*) ne sont pas infectées par *Wolbachia*.

iii) La plupart des espèces infectées le sont par des bactéries du super-groupe E et il existe des transferts horizontaux de bactéries entre les différentes espèces de Collemboles.

iv) L'espèce *Anurida maritima* est infectée par une bactérie qui semblent émerger à la base du super-groupe A.

La poursuite de ces travaux est en cours et a pour but de : i) finaliser le typage de ces nouvelles souches de bactéries identifiées par séquençage de plusieurs gènes ; ii) déterminer la position phylogénétique des nouvelles souches au sein de la diversité connue des *Wolbachia* ; iii) rechercher d'autres marqueurs moléculaires pour réaliser la phylogénie des collemboles ; iv) analyser les scénarios de co-évolution entre les hôtes collemboles et leurs bactéries ; v) évaluer le ratio *Wolbachia*/collemboles par PCR quantitative et enfin vi) localiser *Wolbachia* au niveau tissulaire dans les collemboles infectées par immuno-marquage.

c - L'histoire du clade F

- Collaborateurs : Coralie Martin, Odile Bain[†]
- Etudiants : Emilie Lefoulon (PhD)
- Publications : (Lefoulon et al., 2012; Lefoulon et al., 2016)

Une attention particulière a également été portée au seul clade qui infecte aussi bien des hôtes arthropodes que des hôtes nématodes : **le clade F**. Il a été initialement découvert chez la filaire *Mansonella ozzardi* (Casiraghi et al., 2001b) avec un statut phylogénétique incertain. C'est l'identification de souches de *Wolbachia* très proches génétiquement au sein de deux espèces de fourmi (*Kaloterme flavicollis* et *Microcerotermes sp.*) (Lo et al., 2002), puis chez la punaise de lit *Cimex lectularius* (Rasgon and Scott, 2004), qui ont mis en évidence la particularité du clade F qui infecte donc les deux groupes d'hôtes nématodes et arthropodes. Aujourd'hui, une douzaine d'espèces hôtes ont été identifiées et elles sont aussi bien des

filaires (que l'on retrouve dans les clades ONC4 et ONC5), des fourmis, des termites, des hyménoptères, un hémiptère et un odonate (Lefoulon et al., 2016). L'hypothèse d'existence d'un ou plusieurs transferts horizontaux de *Wolbachia* récents entre nématodes et arthropodes a rapidement émergé de ces découvertes.

Les précédentes études sur les filaires avaient mis en évidence une absence d'infection par *Wolbachia* au sein de la famille des Splendidofilariinae (Ferri et al., 2011; McNulty et al., 2012), correspondant à une partie clade ONC5 des Onchocercidae. Les espèces étudiées étaient toutes des parasites d'oiseau. Nous avons travaillé sur des espèces de Splendidofilariinae qui parasitent d'autres vertébrés afin d'élargir le screening de ce groupe (Lefoulon et al., 2012) : *Rumenfilaria andersoni* parasite d'une espèce de rennes de Finlande (*Rangifer tarandus*) et *Madathamugadia hiepei* parasite d'un gecko d'Afrique du Sud (*Chondrodactylus (=Pachydactylus) turneri*). Cette étude complète, combinant des approches de PCR/séquençage et d'immuno-histochimie fluorescente, nous a permis de mettre en évidence la présence de *Wolbachia* chez *Madathamugadia hiepei* (*Rumenfilaria andersoni* s'étant avérée non infectée). Nous avons également pu en préciser la position phylogénétique et la localisation cellulaire chez cette espèce. Ainsi, la *Wolbachia* infectant *Madathamugadia hiepei* s'est avérée appartenir au clade F proche de la souche bactérienne infectant une autre filaire, *Cercopithifilaria japonica*, parasite d'un ours de l'archipel du Japon (Ferri et al., 2011), appartenant à un clade de filaire différent (ONC4) (Figure. 1.5).



Figure 3.5 - Phylogénie des Onchocercidae du clade ONC5 et les types de *Wolbachia* les infectant. L'absence d'information indique une absence de l'infection bactérienne (Lefoulon et al., 2012; Lefoulon et al., 2016).

A la lumière de la reconstitution de la phylogénie des filaires réalisée en 2016 (Lefoulon et al., 2016), la présence du clade F chez *Madathamugadia hiepei* est à rapprocher des bactéries infectant le genre des Mansonella (*Mansonella ozzardi* et *Mansonella perforata*), qui sont proches phylogénétiquement de *Madathamugadia hiepei*, bien que précédemment décrites comme appartenant à une sous-famille différente, celle des Onchocercinae (Figure 3.5). Les analyses phylogénétiques suggèrent que le clade F (souches arthropodes et nématodes) résulte d'une émergence plus récente que les autres clades de *Wolbachia* (Lefoulon et al., 2012). Nous avons mis en évidence que non seulement il existe des transferts horizontaux entre arthropodes et nématodes hébergeant des *Wolbachia* du super-groupe F (ce qui en fait sa particularité), mais également entre les hôtes nématodes avec un transfert horizontal clairement identifié (entre *Madathamugadia hiepei* et *Cercopithifilaria japonica*) et un second suspecté (entre *Madathamugadia hiepei* et le genre *Mansonella*) (Lefoulon et al., 2016). La question de l'origine évolutive du super-groupe F reste cependant posée, nos résultats indiquent clairement une position au sein des clades infectant les nématodes et les espèces structurant la base du clade F sont toutes des symbiotes de nématodes, suggérant que les bactéries d'arthropodes sont issues d'évènements de transferts horizontaux "tardifs" (Lefoulon et al., 2016).

Il est à noter que chez ces espèces, on retrouve la bactérie dans les cellules de lignée germinale (ce qui est observé chez toutes les espèces étudiées), également dans les cellules intestinales (ce qui en fait le premier cas chez les filaires), mais pas dans les cordes latérales (faisceaux musculaires), alors que les autres espèces de filaires présentent la bactérie dans ces tissus (Lefoulon et al., 2012).

Une étude récente a montré que les bactéries des super-groupes C et D suivent le même modèle de ségrégation embryonnaire, commençant avec la ségrégation mitotique asymétrique pour atteindre un sous-ensemble de cellules hypodermiques (Landmann et al., 2010; Landmann et al., 2012). De là, *Wolbachia* pourrait envahir les cellules des ovaires et par la suite la lignée germinale (Fischer et al., 2011; Landmann et al., 2012). Il a été suggéré que la présence de *Wolbachia* dans les cellules hypodermiques de leurs hôtes filaires peut représenter une préférence tissulaire somatique héréditaire, reflétant leur mécanisme de transmission horizontale (Landmann et al., 2012). Ainsi, l'absence de *Wolbachia* dans les cordes latérales des filaires infectées par le type F, combinée avec sa présence dans les cellules intestinales, comme trouvé chez *Madathamugadia hiepei*, pourrait refléter un

tropisme différent des bactéries dans ses hôtes et soulève la question de la ségrégation des symbiontes pendant l'embryogénèse.

Finalement, reste la question des phénotypes associés aux *Wolbachia* du super-groupe F chez leurs filaires hôtes. Une étude sur *Mansonella (Esslingeria) perstans* a mis en évidence une association mutualiste, comme dans les super-groupes C et D (Hoerauf et al., 2008). En effet, l'élimination de *Wolbachia* par un antibiotique entraîne un retard de croissance chez les larves de la filaire et une stérilité des femelles (Coulibaly et al., 2009). Jusqu'à présent, l'analyse des deux génomes complets disponibles de *Wolbachia* de *Brugia malayi* et *Onchocerca ochengi* a suggéré que la bactérie peut contribuer à la biosynthèse de la riboflavine et/ou de l'hème (Foster et al., 2005; Strubing et al., 2010; Darby et al., 2012). En ce qui concerne les hôtes arthropodes des *Wolbachia* du groupe F chez la punaise *Cimex lectularius*, les effets délétères de l'élimination de la bactérie peuvent être neutralisés par une supplémentation en vitamines B, indiquant un rôle essentiel du symbiote dans la nutrition de son hôte (Hosokawa et al., 2010)

On voit que, malgré les difficultés méthodologiques liées à la biologie des espèces et le peu de modèles de laboratoire, les avancées scientifiques qui concerne le super-groupe F de *Wolbachia* nous permettent aujourd'hui de comprendre un peu mieux leur place dans l'histoire générale de la bactérie. Il reste cependant beaucoup de travaux à mener au sein du super-groupe F pour notamment : i) comprendre s'il existe des différences évolutives entre symbiotes d'arthropodes et de nématodes; ii) comprendre quelles sont les spécificités biologiques et écologiques qui président aux transferts horizontaux entre les deux grands groupes d'hôtes; iii) et enfin comprendre la place exacte de ce clade dans l'histoire évolutive des *Wolbachia*.

Les résultats obtenus nous ont apporté une vue nouvelle et inattendue de la position phylogénétique du si atypique super-groupe F. Nous avons précisé son origine, sa position et une partie de l'histoire co-évolutive entre les bactéries et leurs hôtes.

II - LA CO-EVOLUTION CHEZ LES BACTERIES PATHOGENES.

a - *Ehrlichia ruminantium* : le mauvais gène ne donne pas la bonne réponse

- Collaborateurs : Roger Frutos.

- *Etudiants : Hassane Adakal (PhD)*
- *Publications : Adakal et al., 2010*

Pour essayer d'appréhender la diversité réelle de ce pathogène dans des conditions naturelles, nous avons adapté une méthode de typage génomique des bactéries à *E. ruminantium*. La technique de *Multi-Locus Sequence Typing* ou MLST (Maiden et al., 1998) consiste à séquencer plusieurs gènes de ménage dispersés physiquement sur le chromosome bactérien et à réaliser des analyses cladistiques, permettant de typer finement des souches en s'exonérant des problématiques liées aux changements rapides des gènes impliqués dans l'évitement de la réponse immunitaire de l'hôte, et des analyses phylogénétiques, permettant d'étudier les liens évolutifs qui existent entre les différentes souches. Le but est de développer des outils permettant de caractériser et de suivre la structure et la dynamique des populations de *E. ruminantium* sur le terrain. Le schéma MLST utilisé est issu des études préalables (Adakal et al., 2009) et consiste en l'étude de huit gènes chromosomiques : *gltA*, *groEL*, *lepA*, *lipA*, *lipB*, *secY*, *sodB* et *sucA*. La population bactérienne étudiée est issue d'un programme de détiqation du bétail réalisé en 2007 et 2008 dans 3 villages du Burkina Faso: *Bekuy* (3.918W, 11.608N), *Sara* (3.838W, 11.718N) et *Lamba* (4.058W, 11.668N).

Un total de 2192 tiques de l'espèce vectrice *Amblyomma variegatum* a été récoltée et testé individuellement par PCR (Waghela et al., 1991; Martinez et al., 2004) pour détecter la présence de *E. ruminantium* (Figure 3.6).

Lieu	Nombre de tiques	Prévalence (N)
Bekuy	750	4,7% (35)
Sara	743	2,5% (18)
Lamba	699	3,9% (27)
Total	2192	3,7% (80)

Figure 3.6 - données épidémiologiques de *E. ruminantium* chez les tiques *A. variegatum* dans trois localités du Burkina Faso.

Un total de 37 souches différentes a pu être séquencé pour l'ensemble des huit marqueurs génétiques. Nous avons ajouté deux souches de référence à ce jeu de données : ERWO provenant d'Afrique du Sud et ERGA isolée en Guadeloupe. Nous avons identifié plusieurs haplotypes pour chacun des gènes séquencés : 4 pour *gltA*, 5 pour *groEL*, 12 pour *lepA*, 5 pour *lipA*, 11 pour *lipB*, 14 pour *secY*, 8 pour *sodB* et 8 *sucA*.

Les résultats obtenus dessinent une structuration très originale et inattendue des populations de *E. ruminantium* (Figure 3.7). Deux groupes de souches se séparent très nettement : le premier contient les deux souches de référence ERWO et ERGA qui ségrégent avec 12 souches et présente une diversité importante tandis que le second réunit 25 autres souches et présente une divergence entre souches beaucoup plus faible. Les analyses populationnelles menées sur nos données indiquent clairement une unicité et une origine clonale des souches du second clade (analyse eBURST non présentées ici).

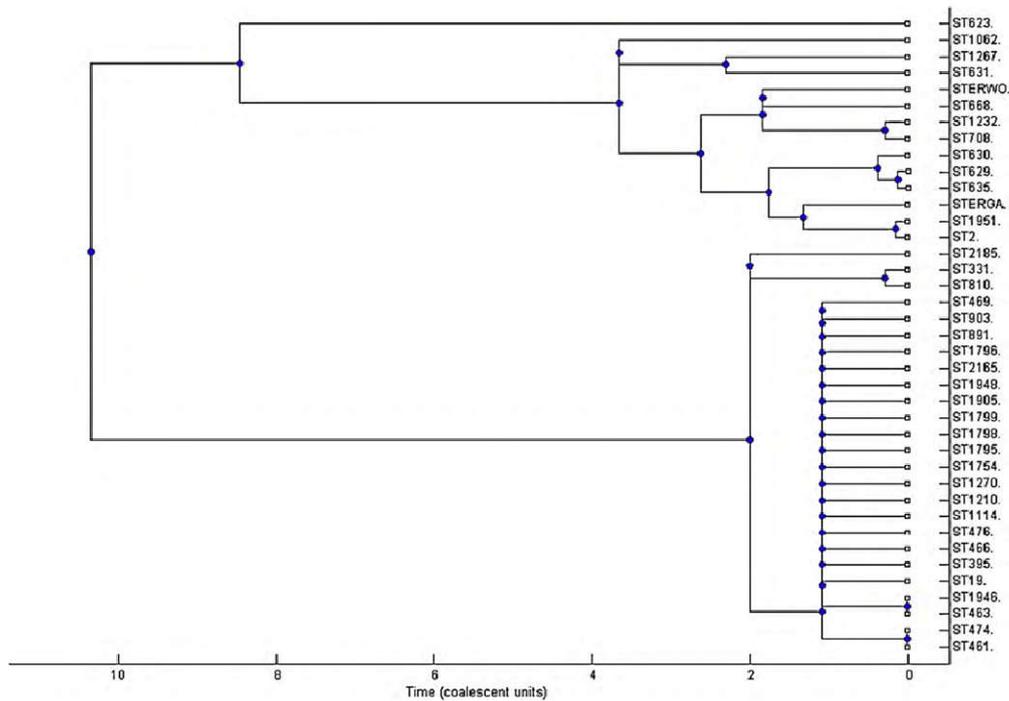


Figure 3.7 - Dendrogramme UPGMA des données MLST de 37 souches de *Erhlichia ruminantium* isolées de tiques *Amblyomma variegatum* du Burkina Faso et des deux souches de référence ERWO (Afrique du Sud) et ERGA (Guadeloupe).

Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'existence d'une dynamique jusque là inconnue chez ces bactéries avec i) une population très diversifiée relativement ancienne dont sont issues les deux souches séquencées de référence et ii) une importante émergence clonale dans cette région d'Afrique avec une population récente. Les pressions de sélection qui ont présidé à cette émergence restent inconnues. De nouvelles études sont en cours pour vérifier le statut des différences populations face aux vaccins.

b - Des gènes, des histoires : l'exemple de *Orientia tsutsugamushi*.

- *Collaborateurs* : Roger Frutos, Emmanuel Cornillot, Catherine Moulia.
- *Etudiants* : Patimaporn Wongprompitak (Post-doctorat), Duong Vaesna (PhD)
- *Publications* : Duong et al., 2013; Wongprompitak et al., 2015

Afin d'étudier la diversité de la bactérie *Orientia tsutsugamushi*, une cohorte de patients atteints de typhus des broussailles a été étudiée entre 2008 et 2010 dans trois pays où la maladie est endémique : le Cambodge, le Vietnam et la Thaïlande. Nous avons analysé des échantillons prélevés en milieu hospitalier en amplifiant, par PCR, et en séquençant un ensemble gènes de ménage pour réaliser une analyse MLST (adk, sucA, lepB, sodB, lipA, lipB et secY). Le gène codant pour une protéine 56-kDa, qui est impliquée dans le contournement de la réponse immunitaire chez ses hôtes vertébrés (Choi et al., 2014), a également été inclus dans l'analyse. L'ensemble de ces données a été comparé à cinq souches de référence (Kelly et al., 2009) : Boryong isolée en 1980 en Corée du Sud (Otb), Ikeda isolée en 1979 au Japon (Oti), Gilliam isolée en 1943 en Birmanie (Otgm), Kato en 1955 au Japon (Otki) et Karp isolée en Nouvelle Guinée en 1943 (Otkp) qui est la souche la plus impliquée dans les épidémies humaines (représentant jusqu'à 50% des souches isolées).

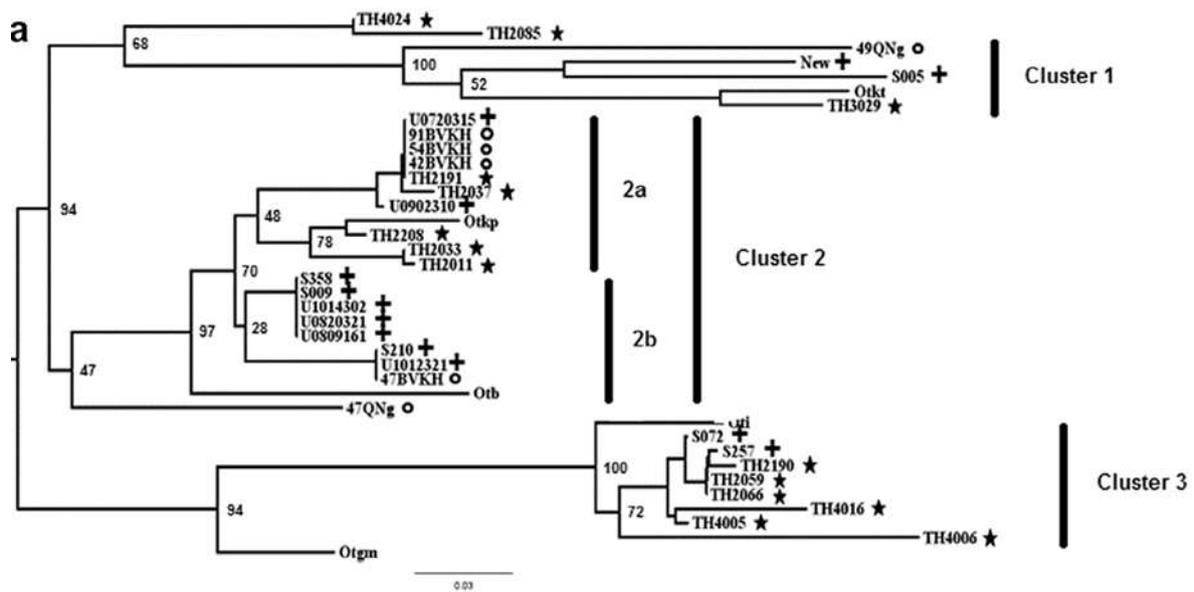


Figure 3.8 - Phylogénie du gène 56-KDa des souches de *Orientia tsutsugamushi* isolées au Cambodge, au Vietnam et en Thaïlande entre 2008 et 2010 chez des patients hospitalisés. Reconstruction par maximum de vraisemblance sur modèle évolutif GTR+G Model. Otb : *O. tsutsugamushi* souche Boryong. Oti: *O. tsutsugamushi* souche Ikeda. Otgm : *O. tsutsugamushi* souche Gilliam reference type. Otk : *O. tsutsugamushi* souche Kato. Otkp : *O. tsutsugamushi* souche Karp. Origine : ○ : Vietnam; ☆: Cambodge; + : Thaïlande.

L'analyse phylogénétique du gène 56-kDa (Figure 3.8) présente une structuration typologique en 3 clusters avec de forts signaux de sélection par adaptation à l'hôte (host-drive) (Wongprompitak et al., 2015). Ces pressions de sélection ne sont pas le fait des interactions avec les hôtes humains (qui représente un cul de sac évolutif), mais de celles existant avec les hôtes rongeurs qui sont les hôtes *naturels* de ces bactéries (Duong et al., 2013a). Il apparaît que ce phénomène est majoritaire et qu'aucune autre structuration n'a été détectée, en particulier d'un point de vue géographique.

Ces constatations nous permettent d'esquisser une explication sur la structuration des populations de *O. tsutsugamushi* (Figure 3.10). En effet, les mécanismes de recombinaison qui ont lieu chez les vecteurs trombiculidés augmentent considérablement la diversité des bactéries, ce qui est observable sur les données MLST dont la diversité est telle que chaque souche présente une combinaison unique d'allèles. En parallèle, lors des passages des bactéries chez les rongeurs, au cours de leur cycle parasitaire, seuls les génotypes arborant les allèles efficaces pour réussir l'infection survivent (les autres sont éliminés par le système immunitaire des hôtes-rongeurs). Parmi ceux-ci, le gène 56-kDa joue un rôle particulièrement important et subit donc une sélection purifiante ne conservant que les formes efficaces, qui entraîne les allèles sur les autres locus du génome dans cette dynamique.

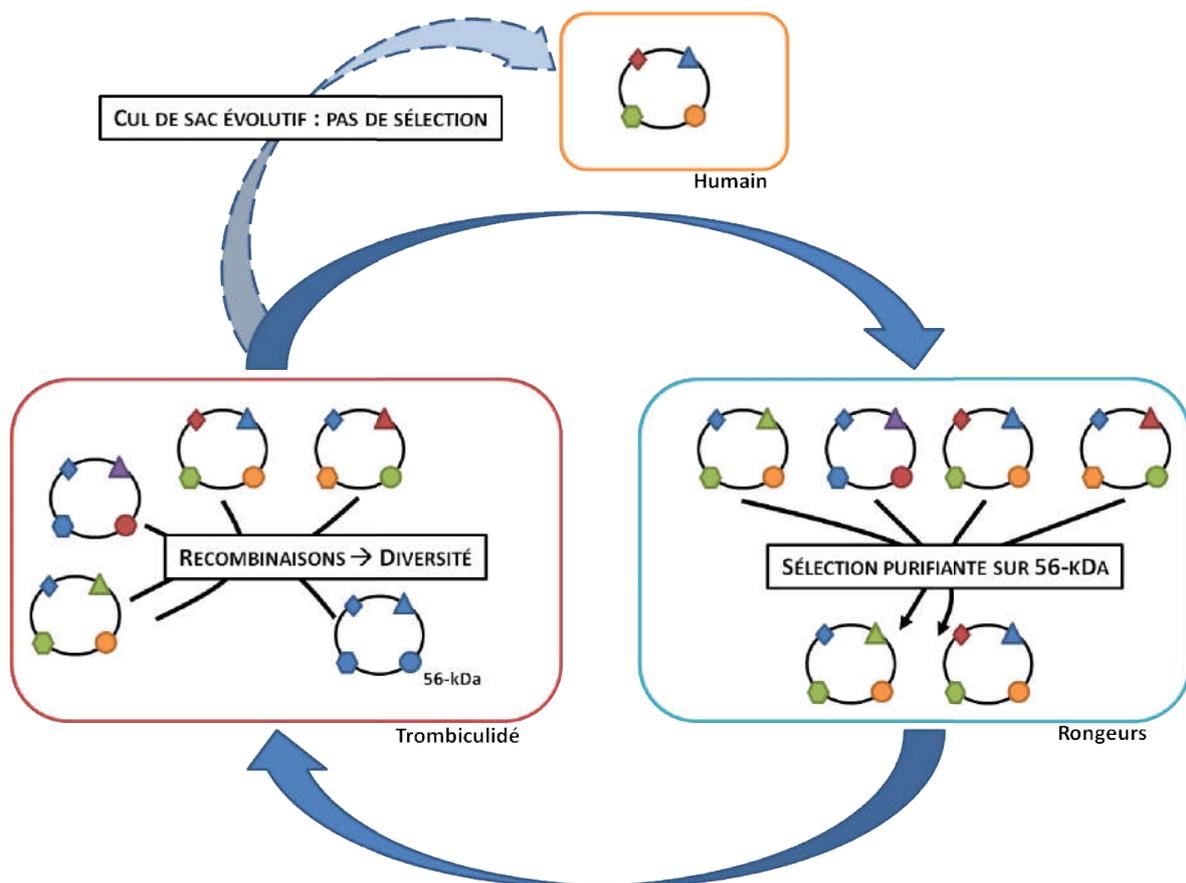


Figure 3.10 - Illustration des mécanismes théoriques expliquant les observations divergentes entre l'étude du gène 56-kDa et l'analyse MLST chez *Orientia tsutsugamushi*. Le locus 56-kDa est représenté par le cercle.

Finalement, l'homme ne joue aucun rôle dans la diversité et l'évolution de la bactérie *O. tsutsugamushi*, ce qui ne représente que des "erreurs de route" dans le cycle parasitaire et, même si une sélection s'opère sur les génotypes nous infectant, ils ne retournent jamais dans

l'environnement car les vecteurs sont inféodés aux milieux broussailleux où les contacts avec l'homme sont réduits.

Ainsi, nous avons ici un parfait exemple de *discontinuité phylogénétique* entre locus en fonction des régimes de pression de sélection qui s'exercent sur eux. Les gènes de ménage évoluant sous sélection neutre, leur diversité est principalement due à des recombinaisons entre génotypes, aboutissant à une faible diversité génétique mais à une grande diversité génomique. D'un autre côté, le gène codant pour la protéine 56-kDa est clairement sous une sélection répondant aux génomes hôtes rencontrés, ce qui nous permet d'étudier une co-évolution plus récente et forcément discontinue qui se concrétise par la formation de clades dans les arbres phylogénétiques.

CHAPITRE 4 - EPIDEMIOLOGIE :

I - SCRUTER LES MALADIES : LES ARBOVIROSES

- *Collaborateurs* : Roger Frutos, Laurence Briant, Emmanuel Cornillot, Alain Viari, Tri Baskoro
- *Etudiants* : Duong Veasna (PhD), Lien Pham Thi Kim (PhD)
- *Publications* : Duong et al., 2011 et 2012 ; Baskoro et al., 2014 ; Lien et al., 2015 et 2016.

Les dynamiques épidémiques de la Dengue sont le principal sujet d'étude auquel j'ai participé ces dernières années dans le cadre de collaborations avec plusieurs collègues de différents pays d'Asie. Ces travaux, qui ont permis la rédaction de cinq articles (plusieurs autres sont en préparation ou soumis), ont porté sur plusieurs axes d'étude : i) la recherche de la présence du virus dans les populations de vecteurs, ii) les mécanismes de maintien du virus hors des épidémies humaines et iii) l'épidémiologie des souches de virus circulant.

Durant l'épidémie de dengue de 2011 à Hanoï (Vietnam), nous avons réalisé un suivi de l'infection chez les patients humains hospitalisés (relevé et détermination du sérotype infectant) en parallèle d'un **suivi des populations de moustiques** infestant les habitations et les alentours des personnes infectées (Kim Lien et al., 2015). Cette étude a été en quelque sorte un pilote pour nous, qui nous permet de tester des protocoles de terrain visant à qualifier les populations de vecteurs en contact avec les humains infectés. Une expérimentation à plus grande échelle (Archipel indonésien dans son ensemble) est actuellement en cours avec le soutien des autorités indonésiennes (Ministère de la Recherche et de la Santé) et de l'OMS. Les résultats de cette étude seront publiés dans les années à venir. Au cours de la première expérimentation au Vietnam, les moustiques adultes présents dans les maisons des personnes hospitalisées ainsi que dans les quinze maisons les plus proches de celles-ci (dans un rayon de 50 m maximum) ont été collectés.

Les résultats obtenus (Figure 4.1) nous ont permis de mettre en évidence les sérotypes circulant lors de cette épidémie, à savoir DENV 1 et, majoritairement, DENV 2. De plus, nous avons identifié une prépondérance de la présence de *Aedes aegypti* (87% des individus capturés) sur les lieux de vie des personnes infectées par rapport à *Aedes albopictus*. Il apparaît également que seul *Aedes aegypti*, avec une prévalence estimée à 3%, est infecté par des virus de la Dengue, mettant en évidence son statut de vecteur principal lors de cette épidémie.

Districts	Cas humains	Sérotypes				Pools de moustiques (positifs)	
		DENV1	DENV2	DENV3	DENV4	<i>A. aegypti</i>	<i>A. albopictus</i>
Ba Dinh	23	1	11	0	0	18 (1/D1)	0
Hai Ba Trung	31	5	9	0	0	21 (1/D1)	3
Dong Da	42	1	24	0	0	32 (1/D2)	4
Thanh Xuan	6	0	1	0	0	7	2
Thanh Oai	6	0	3	0	0	1	1
Thanh Tri	2	1	0	0	0	1	0
Tu Liem	2	0	1	0	0	1	0
Ha Dong	28	0	14	0	0	15	3
Total	140	8	63	0	0	96 (3)	14 (0)

Figure 4.1 - Détection et typage des virus de dengue chez des patients hospitalisés et les moustiques du genre *Aedes* capturés dans les habitations des patients et des zones alentours dans la région de Hanoï (Vietnam) en 2011. Les moustiques sont testés par pool de 10 individus maximum.

Comprendre la dynamique d'un virus, comme celui de la dengue, nécessite plus que de réaliser une carte de la distribution des virus chez les hommes et chez les vecteurs. En effet, il existe de nombreuses voies de transfert de ce virus, incluant des hôtes sylvatiques (principalement des primates) (Hanley et al., 2013). L'une de ces voies a été explorée lors d'une étude de terrain en Indonésie, dans la ville de Bantul (île de Java) : il s'agit de la **transmission trans-ovarienne chez les moustiques infectés** (Tri Baskoro et al., 2014). Un total de 978 pièges de type *ovitrap* ont été déposés dans les différents districts de la ville (entre 55 et 70 par district). Les oeufs de moustiques ont été mis à éclore au laboratoire et les larves ont été nourries jusqu'à leur mue imaginale. L'espèce des adultes obtenus a été déterminée sur caractères morphologiques et les individus *Aedes aegypti* ont été analysés pour déterminer la présence, et le cas échéant le sérotype, de virus de la dengue.

Des moustiques infectés ont été obtenus pour 302 des 978 pièges, mettant en évidence la présence du virus dans 14 des 17 districts : le sérotype DENV 3 a été détecté dans 12 districts, DENV 2 dans 3 districts et DENV 4 dans 1 seul district (Figure 4.2). Environ 20% des moustiques *A. albopictus* piégés ont été démontrés positifs à l'infection, ce qui indique une transmission trans-ovarienne massive chez cette espèce (le taux variant de 0 à un maximum de 64% suivant les districts). Cette transmission verticale est donc une composante très importante de la dynamique des épidémies de dengue mais aussi de son maintien hors des épisodes épidémiques.

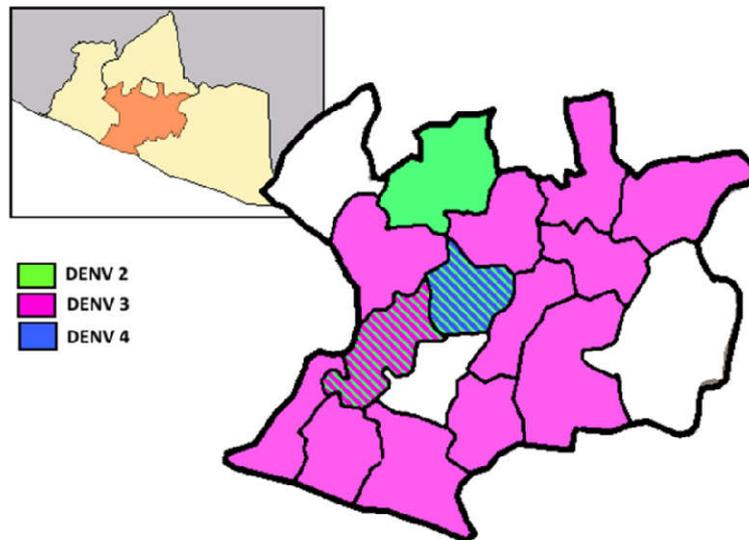


Figure 4.2 - Carte de répartition des sérotypes de dengue détectés chez les moustiques *A. aegypti* émergeant de piège "ovitraps" dans les différents districts de la ville de Bantul en 2012.

Le troisième niveau d'analyse que nous avons appliqué au virus de la dengue est celui de l'étude de la **dynamique des souches circulantes** lors d'épidémies humaines. Pour cela, nous avons étudié les épidémies ayant eu lieu au Cambodge entre 2000 et 2009, grâce au séquençage complet des génomes des virus isolés chez des patients humains.

Le sérotype DENV1 (Duong et al., 2013b), qui représente 5 à 20% des cas humains de dengue suivant les années, présente 4 populations distinctes ainsi que des cas de génomes issus de recombinaisons entre ces populations (Figure 4.3). Il apparaît une dynamique relativement complexe (Figure 4.4) : on observe une co-circulation des différentes souches. Ainsi les populations 1, 2 et 3 sont présentes toutes les trois entre 2000 et 2003, année durant laquelle la population 4 est détectée pour la première fois. En 2004 et 2005, la population 1 disparaît et, en 2006 et 2007, c'est au tour de la population 2 : seules les populations 3 et 4 sont détectées chez les patients hospitalisés au Cambodge. Enfin, en 2008 et 2009, la population 1 réapparaît en co-circulation avec la population 4. Cette réémergence de la population 1 après plusieurs années peut être expliquée soit par une circulation *à bas bruit* (ne permettant pas sa détection), soit par une réimportation de virus circulant dans des zones géographiques périphériques. En plus de cette dynamique, nous avons identifié deux génomes issus de recombinaisons de virus de différentes populations : un d'une recombinaison entre un génome de la population 3 et de la population 4 et un second, plus complexe, issu d'une base de population 2 avec sans doute plusieurs recombinaisons avec des virus différents.

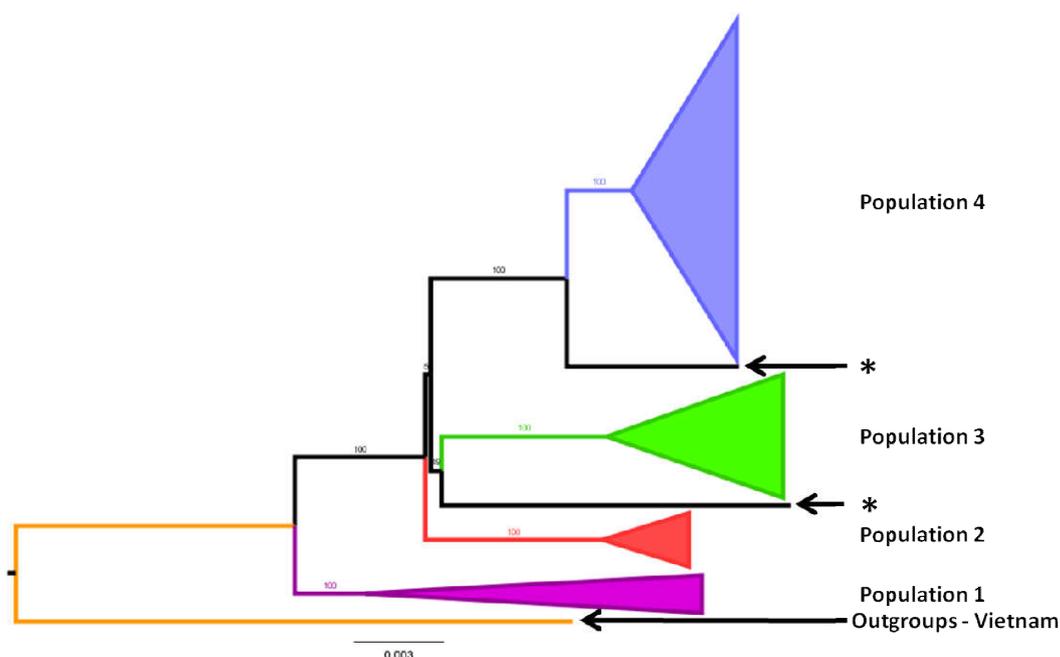


Figure 4.3 - Phylogénie sur génome complet des souches circulantes de virus de la Dengue, sérotype DENV1, au Cambodge de 2000 à 2009. Reconstitué par maximum de vraisemblance, modèle GTR + G. L'arbre est enraciné sur un génome complet de virus de souche vietnamienne. * indique des génomes issus de recombinaisons.

Population	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
1	+	+	+	+					+	+
2	+	+	+	+	+	+				
3	+	+	+	+	+	+	+	+		
4				+	+	+	+	+	+	+

Figure 4.4 - Identification de la présence des différentes populations circulantes du sérotype 1 de la Dengue au Cambodge entre 2000 et 2009.

Pour les sérotypes 2 et 3 (Duong et al., 2013c), nous avons identifié respectivement cinq et quatre populations présentant des mutations spécifiques mais sans indication de recombinaison. Chez ces deux sérotypes, les lignées qui circulaient avant 2003 (deux pour DENV2 et une pour DENV3) disparaissent et sont remplacées par de nouvelles (deux pour chacun des sérotypes à partir de cette date). Les deux sérotypes ne suivent cependant pas la même dynamique (Table 4.5). Ainsi, pour DENV2, les nouvelles populations qui émergent en 2003 persistent jusqu'en 2008, avec une absence d'infection par DENV2 détectée pour l'année 2006). Cependant la population 5, qui apparaît en 2007, devient ultra-majoritaire en 2008 et représente 80% des échantillons positifs à DENV2. Pour le sérotype 3, la population 3 qui émerge en 2003, remplaçant la population 1 qui disparaît, reste présente jusqu'à la fin de

l'étude en proportion majoritaire. La population 3 apparaît en 2006 pour disparaître en 2007 tandis que la population 4 apparaît en 2007 et reste présente en 2008. Ainsi, on observe une co-circulation de plusieurs populations, en particulier en 2007, lors d'une flambée épidémique particulièrement importante.

Sérotype	Population	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
DENV 2	1	+		+					
	2		+						
	3			+	+	+		+	+
	4			+	+	+		+	+
	5							+	+
DENV 3	1	+	+	+					
	2			+	+	+	+	+	+
	3						+	+	
	4							+	+

Figure 4.5 - Identification de la présence des différentes populations circulantes du sérotype 2 et 3 de la Dengue au Cambodge entre 2001 et 2008.

II - L'IMPORTANCE DE LA FONCTION DU GÈNE : L'EXEMPLE DU HFMD

- *Collaborateurs* : Roger Frutos, Christian Devaux, Emmanuel Cornillot, Catherine Moulia.
- *Etudiant* : Nghia Ngu Duy (PhD)
- *Publication* : Duy et al., *BMC infectious disease*, in press.

Le virus EV71 est connu au Vietnam depuis 2003 et la première épidémie de HFMD a été observée en 2005 dans le sud du pays. Au début de l'année 2011, une importante épidémie de HFMD s'est déclarée à travers tout le Vietnam. Cette épidémie a été l'occasion de mettre en place des protocoles ciblés afin d'étudier au mieux la dynamique de cette maladie. Nous avons donc travaillé avec les autorités sanitaires du nord du Vietnam et en particulier de la ville de Hai Phong. Le gène VP1 a été entièrement séquencé pour 108 échantillons issus de patients du nord du Vietnam. L'analyse phylogénétique (par maximum de vraisemblance) met en évidence l'existence de 4 groupes dans ces séquences. Ces clusters ségrégent respectivement avec le génogroupe C4 pour les groupes 1, 2 et 3 et le génogroupe C5 pour le groupe 4.

Nous avons identifié, au sein de la séquence protéique du gène VP1 (qui est très conservée), trois sites variables en position 249, 262 et 284, présentant soit une Valine (V), soit une Isoleucine (I). Des variations entre ces deux acides aminés, tous deux hydrophobes aliphatiques, ont été identifiés comme impliqués dans des phénotypes variés chez de

nombreux virus : i) une susceptibilité à une molécule chez le cocksackievirus B3 (Schmidtke et al., 2005), ii) une sensibilité à la température chez le virus murin de la Leucémie de Moloney (Yuen and Szurek, 1989), iii) une diminution de la pathogénicité chez le virus IBD du poulet (Yu and Huang, 2013), iv) une augmentation de la virulence chez le virus humain de l'encéphalite japonaise (Yamaguchi et al., 2011), v) un évitement de la réponse immunitaire cytotoxique chez le SHIV (Peyerl et al., 2003). Six variants ont été détectés présentant les acides aminés suivants sur les trois sites (en respectant le sens de synthèse de la protéine) : VVI (1 séquence), IVI (15 séquences), IIV (28 séquences), VII (38 séquences), VIV (23 séquences) and VVV (3 séquences). Ces caractéristiques ségrégent bien avec la phylogénie générale du virus mais les mutations isoleucine/valine présentent des disparités claires avec celle-ci, marquant une sélection spécifique (Figure 4.6).

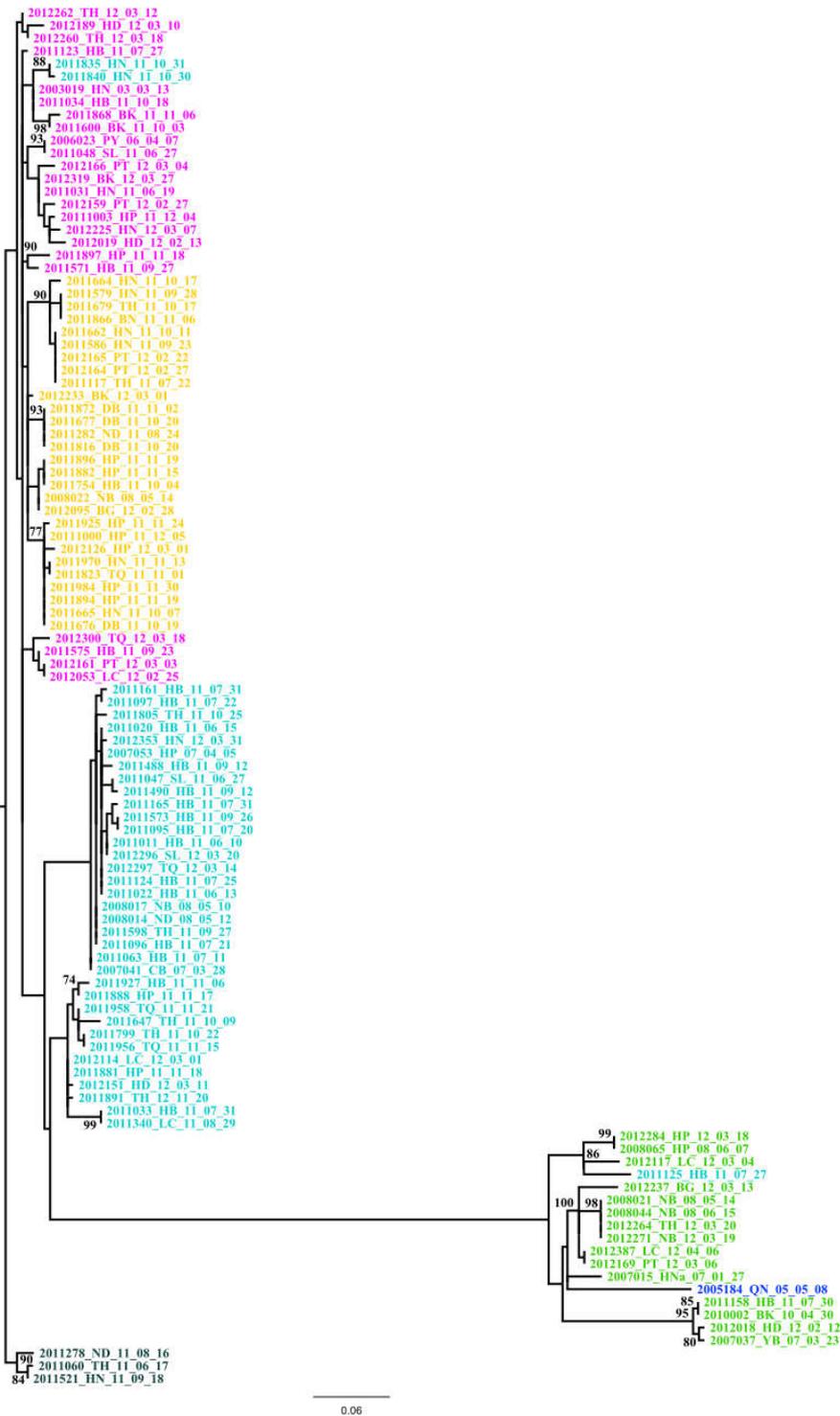


Figure 4.6 - Phylogénie en maximum de vraisemblance des souches de virus du HFMD isolées lors d'épidémies de 2003 à 2012 au nord Vietnam sur la base de la séquence du gène VP1. L'arbre est raciné à partir d'autres séquences de virus EV71 et Coxsackievirus A non présentées ici. Les échantillons sont colorés sur la base des variants Isoleucine/Valine des sites 249, 262 et 284 : gris pour VVV, rose pour VIV, jaune pour IIV, bleu cyan pour VII, vert pour IVI et bleu foncé pour VVI.

La forme ancestrale, sur la base des autres séquences connues de gènes VP1, est la forme VVV, même si elle ne se trouve que dans des échantillons très récents (2013). On retrouve ensuite la forme VIV qui est présente dans des échantillons datés de 2003 et 2005 et qui est surtout impliquée dans l'épidémie de 2011-2012 en tant que variant minoritaire, la première année, mais majoritaire, la seconde (40% des échantillons). Les variants IIV et VII sont les variants majoritaires épidémiques en 2011, qui représentent 80% des infections, bien que circulant déjà avant cette date puisque détecté depuis 2007 pour VII et depuis 2008 pour IVI. Enfin le variant IVI, apparu en 2007, est présent toutes les années depuis cette date et représente le second variant épidémique en 2012 (25% des échantillons) (Figure 4.7).

Mutant	2003	2005	2006	2007	2008	2010	2011	2012
VVV	0	0	0	0	0	0	3	0
VIV	<u>1</u>	0	<u>1</u>	0	0	0	9	<u>12</u>
IIV	0	0	0	0	1	0	<u>21</u>	6
VII	0	0	0	<u>2</u>	2	0	<u>29</u>	5
IVI	0	0	0	<u>2</u>	<u>3</u>	<u>1</u>	1	8
VVI	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0

Figure 4.7 - Variant V/I identifiés dans nos échantillons en fonction des années de prélèvement. Les formes considérées comme majoritaires sont soulignées pour chacune des années.

Nous pouvons donc suivre la succession des variants I/V au cours de l'évolution du virus (Figure 4.8) même si le faible nombre d'échantillons récoltés avant 2011 ne permet pas de dater les transitions dans le temps. Ainsi une forme ancestrale VVV a muté sur le second acide aminé pour donner une forme VIV détectée dès 2003. Selon les données phylogénétiques, la forme IIV a émergé des souches de forme VIV suite à une mutation sur le premier acide aminé bien qu'elle n'ait été détectée sur le terrain qu'en 2008. De manière indépendante, les souches VII ont émergé des souches VIV. Il est à noter qu'une seconde transition VIV → VII est observée mais une seule souches de chaque forme a été retrouvée. Ensuite, une transition apparaît depuis des formes VII pour donner une forme rare VVI qui n'est détectée qu'une seule fois en 2005 et qui est vraisemblablement à l'origine d'une dernière forme IVI qui est impliquée dans le seconde vague de l'épidémie de 2011-2012.

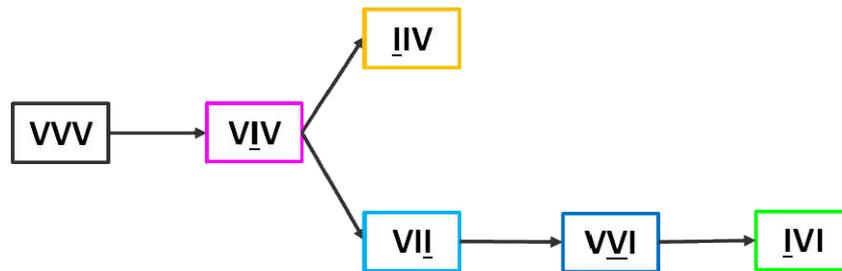


Figure 4.8 - Transitions théoriques entre les différents types V/I de VP1 chez les virus EV71 détectés au Vietnam selon les données récoltées. Les acides aminés mutés entre chaque transition sont soulignés.

Il apparaît donc que la flambée épidémique de 2011-2012 dans le nord du Vietnam n'est pas due à des virus émergents, ayant acquis des adaptations spécifiques qui explique leurs phénotypes. Tous les types de virus impliqués dans l'épidémie de 2011-2012 présentent des caractéristiques similaires (à la fois phylogénétiques et de type V/I) à des souches isolées plusieurs années avant l'épidémie (2003, 2007 ou 2008). Les variants VII et IIV, prédominants en 2011 sont clairement remplacés par les variants IVI et VIV en 2012. Il n'y a pas d'explications claires à ces observations, mais elles pourraient être dues à des résistances immunitaires acquises lors de la première année de l'épidémie en 2011 par les populations touchées.

En parallèle de la dengue, nous avons également recherché la présence de chikungunya dans différentes régions du sud-est asiatique, en particulier au Vietnam, mais nos investigations ne nous ont pas permis de mettre en évidence la présence du virus (Kim Lien et al., 2016).

III - PERSPECTIVES EPIDEMIOLOGIQUES

Les différents travaux portant sur l'étude de la dynamique épidémiologique des arboviroses en Asie ont servi de base à l'élaboration d'un ambitieux projet mené en collaboration avec les autorités de plusieurs pays (Indonésie, Vietnam, Cambodge...) ainsi que des institutions nationales (LIPI et Ministère de la Santé en Indonésie, NIHE au Vietnam...), des universités locales (Gadja Madha Universitas) et des institutions internationales (OMS). Ce projet se mettra en place sur plusieurs années et se décomposera en trois volets intimement interconnectés :

i) Le plan "moustique"

A la suite des premières expérimentations réalisées sur des zones géographiques restreintes qui ont fait l'objet des publications présentées dans ce chapitre, un vaste plan de détermination et de suivi des populations de vecteur en collaboration avec l'état indonésien et l'OMS a été mis en place. Ce plan est basé sur la mise en place d'équipes techniques arpentant le terrain (principalement les zones urbaines) pour capturer les moustiques adultes à l'affût. Elles sont équipées d'un système d'enregistrement embarqué dans des tablettes tactiles géo-localisées permettant de certifier les lieux de capture et d'enregistrer l'ensemble des paramètres écologiques et urbains liés aux individus capturés. Une fois validée, cette méthode est appelée à être généralisée dans plusieurs pays participant au programme. Les premiers résultats semblent indiquer un impact fort de la nature de l'habitat et du niveau social des quartiers sur la dynamique des populations de vecteurs. Contrairement à un *à priori* initial, les plus grandes populations de moustiques ne sont pas présentes dans les quartiers les plus pauvres mais dans des zones présentant un niveau économique plus élevé. Ceci pourrait être directement lié au mode de vie des personnes et notamment à la présence de gîtes artificiels, très prisés par *Aedes albopictus*, que sont les plantes en pot, absents des habitats plus pauvres.

ii) Le suivi épidémiologique des arboviroses

En liaison avec le *plan moustique*, nous cherchons dans les lots de moustiques capturés la présence de différents pathogènes d'intérêt médical. Ainsi, les suivis de la dengue et du chikungunya se poursuivent et les premiers résultats sont encourageants. Par ailleurs, nous avons élargi nos recherches au virus Zika, suite à la récente épidémie mondiale, et il apparaît que celui-ci est largement présent en Indonésie. Enfin, suite à une demande de notre partenaire OMS, nous allons lancer une campagne d'étude sur la fièvre jaune.

iii) La modélisation de la dynamique des maladies infectieuses

La troisième étape, qui n'a pas encore commencé, consistera à l'élaboration d'une modélisation de la dynamique locale et régionale des épidémies d'arboviroses. Bien entendu, les données entomologiques et virologiques que nous aurons collectées serviront de base pour le développement des modèles mais nous comptons également y introduire les données démographiques et sociologiques disponibles.

CURRICULUM VITAE

LAURENT Gavotte

Né le 05 mars 1978 à Annecy (74)

Nationalité française

Marié

Situation actuelle ***Maitre de Conférences, Université de Montpellier***

Laboratoire ***Université Montpellier***
Institut des Sciences de l'Evolution de Montpellier
UMR CNRS 5554 - CC063
Place Eugène Bataillon
34095 Montpellier Cedex 05
Email : laurent.gavotte@umontpellier.fr
Tel : 04 67 14 42 27

Titres universitaires

- 2005 Doctorat de Biologie
 Université de Perpignan – Université Lyon I
 « Evolution d'un système en poupées russes : diversité, distribution et activité du
 bactériophage WO chez son hôte *Wolbachia*, endosymbiote d'invertébrés.»
 Directeurs : Pr. Claude Combes et Pr. Michel Boulétreau.
 Jury : O. Panaud, N. Boemare, D. Bouchon, C. Combes, M. Boulétreau et F. Vavre.
- 2001 D.E.A. de Parasitologie
 Option biologie moléculaire, biologie cellulaire, immunologie.
 Universités de Montpellier 1, Montpellier 2 et Perpignan

Habilitation à Diriger les Recherches - Laurent Gavotte - 2018

2000 Maîtrise de Biologie Cellulaire et Physiologie
Université de Bretagne Occidentale

1999 Licence de Biologie Cellulaire et Physiologie
Université de Bretagne Occidentale

1998 DEUG B (biologie)
Université de Savoie

Expériences Professionnelles

ATER

2007-2008 Enseignement et Recherche
Université Montpellier 2
UFR Fac des Sciences - Département Biologie-Ecologie

Post-doctorat

2005-2007 Research Scholar
Sous VISA JI
Department of Entomology
University of Kentucky
Directeur : Pr Stephen L. Dobson

TRAVAUX SCIENTIFIQUES

Participation à des congrès scientifiques

Conférences internationales

2016. E. Lefoulon, B. Makepeace, C. d'Haese, S. Uni, C. Martin & **L. Gavotte**. Breakdown of coevolution between symbiotic bacteria *Wolbachia* and their filarial hosts. The 9th International *Wolbachia* conference, Queensland, Australie.

2013. Frutos, R., A. Merlin, P. Ravel, M. Fargette, Tri Baskoro TS, E. Andayani, S. Damayanti, G. Kister, Y. Bardie, E. Cornillot, C. Devaux, C. Moulia, **L. Gavotte**, T. Libourel, L. Briant and N. Chazal. Modeling the dynamic of chikungunya in Indonesia. Symposium on Biomathematics (Symomath), Bandung, Indonesia.

2013. Merlin, A., P. Ravel, M. Fargette, Tri Baskoro TS, E. Andayani, S. Damayanti, G. Kister, Y. Bardie, E. Cornillot, C. Devaux, C. Moulia, **L. Gavotte**, T. Libourel, L. Briant, Frutos, R, N. Chazal. Progress report of the Modelling group for Chikungunya Dynamic in Asian regions (MoDyCA).

2013. Frutos, R., A. Merlin, S. Staunton, P. Ravel, M. Fargette, H. Quiquampoix, Tri Baskoro TS, E. Andayani, S. Damayanti, G. Kister, Y. Bardie, E. Cornillot, C. Devaux, C. Moulia, **L. Gavotte**, T. Libourel, L. Briant, N. Chazal. Current concepts on dengue vector control. International Symposium: Integrating Research and Action on Dengue, Yogyakarta, Indonesia.

2013. Frutos, R., A. Merlin, S. Staunton, P. Ravel, M. Fargette, H. Quiquampoix, Tri Baskoro TS, E. Andayani, S. Damayanti, G. Kister, Y. Bardie, E. Cornillot, C. Devaux, C. Moulia, **L. Gavotte**, T. Libourel, L. Briant, N. Chazal. Modelling the dynamic of dengue and chikungunya. Joint International Tropical Medicine Meeting (JITMM). Bangkok, Thailand.

2012. Lefoulon E, **Gavotte L**, Junker K, Barbuto M, Uni S, Landmann F, Laaksonen S, Saari S, Nikander S, De Souza Lima S, Casiraghi M, Bain O and Martin C. A New *Wolbachia* Type F from Splendidofilariinae (Onchocercidae) Supports Recent Emergence of this Supergroup. 7th International *Wolbachia* Conference. Oléron, France.

2010. Frutos R, Wongprompitak P, Duong V, **Gavotte L**, Anukool W, Mai TTX, Blasdell K, Ra C, Wongsawat E, Laurent D, Silpasakorn S, Chien BT, Ekpo P, Suputtamongkol Y and Buchy P. Diversity of *Orientia tsutsugamushi* strains in South East Asia (Thailand, Cambodia, Vietnam) based on the 56-kDa protein gene and multilocus typing. Joint International Tropical Medicine Meeting. Bangkok (Thailand).

2010. Adakal H, **Gavotte L**, Stachurski F, Konkobo M, Henri H, Zoungrana S, Huber K, Vachery N, Martinez D, Morand S and Frutos R. Clonal origin of emerging populations of *E. ruminantium* in Burkina Faso. MEEGID X, Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics of Infectious Diseases Conference. Amsterdam (Hollande).

2008. **Gavotte L**, Mercer RD & Dobson SL. Costs and benefits of *Wolbachia* infection in immature *Aedes albopictus* depend upon gender and competition level. 5th International *Wolbachia* Conference. Kolymbari (Greece).

2006. **Gavotte L**, Mains J, M. Islam S and Dobson SL. *Wolbachia* influence on *Aedes albopictus* larval resource competition. 4th International *Wolbachia* Conference, Puerto Rico.

2004. **Gavotte L**, Vavre F, Stouthamer R & Boulétreau M. Diversity, distribution and dynamics of the bacteriophage WO. 3rd International *Wolbachia* Conference, Heron Island, Australia

2002. **Gavotte L**, Vavre F, Stouthamer R & Boulétreau M. Bacteriophage WO: diversity, distribution and involvement in manipulation of host reproduction ?. 2nd International *Wolbachia* Conférence, Kolymbari, Grèce.

Conférences nationales et locales

2009 **Gavotte L**, Montpellier. Conf^eISEM. « Epidémiologie et évolution rapide de *Ehrlichia ruminantium* en Afrique de l'Ouest ».

2006 **Gavotte L**, Mains J & Dobson SL. Lexington (USA). University of Kentucky CEEB spring research symposium. « *Wolbachia* influence on *Aedes albopictus* larval resource competition ».

2003 **Gavotte L**, Montferrier-sur-Lez. Réunion du Réseau d'Etude de la Biodiversité des Nématodes et des Helminthes au CBGP. « *Wolbachia* et Filaires : une intimité pathologique ».

2003 **Gavotte L**, Vavre F & Boulétreau M. Lyon. Réunion du PoWol (Pôle *Wolbachia* Lyonnais). « Bactériophage WO: ubiquiste ou spécialiste ? ».

2002 **Gavotte L**, Vavre F & Boulétreau M. Lyon. Réunion du PoWol (Pôle *Wolbachia* Lyonnais). « Bactériophage WO: Connaissances et perspectives ».

Articles publiés dans des revues à comité de lecture

Légende :

Nom → encadrement officiel

Nom → encadrement non officiel

Nom → Post-doctorant

Nom → Thésard

Nom → Master

1. Kim Lien PT, Briant L, Gavotte L, Labbe P, Perriat-Sanguinet M, Cornillot E, Truong Vu D, NguyenTY, Tran VP, Nguyen VS, Devaux C, Afelt A, Chi CT, Phan TN, Tran ND, Frutos R. Incidence of dengue and chikungunya viruses in mosquitoes and human patients in border provinces of Vietnam. *Parasites & Vectors*. 2017. 10(1):556.
2. Duy NN, Huong LTT, Ravel P, Huong LTS, Dwivedi A, Sessions OM, Hou Y, Chua R, Kister G, Afelt A, Moulia C, Gubler DJ, Thiem VD, Thanh NTH, Devaux C, Duong TN, Hien NT, Cornillot E, Gavotte L, Frutos R. Valine/isoleucine variants drive selective pressure in the VP1 sequence of EV-A71 enteroviruses. *BMC Infect Dis*. 2017. 17(1):333.
3. Lefoulon E, Bain O, d'Haese C, Martin C and Gavotte L. Breakdown of coevolution between symbiotic bacteria *Wolbachia* and their filarial hosts. *PeerJ*. 2016. 4:e184.
4. Fargette M, Frutos R, Merlin A, Ravel P, Satoto TBT, Andayani E, Damayanti S, Kister K, Ngu Duy N, Bardie Y, Cornillot E, Devaux C, Moulia C, Gavotte L, Briant L, Chazal N, Libourel T. Observatoire Scientifique en Appui à la Gestion Sanitaire sur un territoire (OSAGE-S). *Dynamiques environnementales*. 2016. 36:59-79.
5. Kim Lien PT, Briant L, Tang TB, Trang BM, Gavotte L, Cornillot E, Duoc VT, Duong TN, Frutos R, Nga PT. Surveillance of dengue and chikungunya infection in Dong Thap, Vietnam: A 13-month study. *Asian Pac J Trop Med*. 2016 Jan. 9(1):39-43.
6. Lefoulon E, Bain O, Bourret J, Junker K, Guerrero R, Cañizales I, Kuzmin Y, Baskoro Tunggul Satoto T, Cardenas JM, de Souza Lima S, Raccurt C, Mutafchiev Y, Gavotte L and Martin C. Shaking the Tree: Multi-locus Sequence Typing Usurps Current Onchocercid (Filarial Nematode) Phylogeny. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2015. 9(11):e0004233.
7. Munkhbat J, Moulia C, Frutos R, Bayartogtokh B, Perriat-Sanguinet M and Gavotte L. Undiscovered diversity of Dipteran parasitoids infecting Mongolian orthopterans. *International Journal of Entomological Research*. 2015. 03(02): 61-65.
8. Kim Lien PT, Van Duoc V, Gavotte L, Cornillot E, Thi Nga P, Briant L, Frutos R and Nhu Duong T. Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* during the 2011 dengue fever

- epidemics in Hanoi, Vietnam. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2015. 8(7): 543-8.
9. **Wongprompitak P**, **Duong V**, Anukool W, Sreyrath L, Thi Xuan Mai T, **Gavotte L**, Moulia C, Cornillot E, Ekpol P, Suputtamongkol Y, Buchy P and Frutos R. *Orientia tsutsugamushi*, agent of scrub typhus, displays a single metapopulation with maintenance of ancestral haplotypes throughout continental South East Asia. *Infect Genet Evol*. 2015. 31(14) : 1-8.
 10. Baskoro Tunggal Satoto T, Rahmah Umniyati S, Dwi Astuti F, Wijayanti N, **Gavotte L**, Devaux C and Frutos R. Assessment of vertical dengue virus transmission in *Aedes aegypti* and serotype prevalence in Bantul, Indonesia. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 2014. 4:S563-S568.
 11. **Nieguitsila A**, Frutos R, Moulia C, Lhermitte-Vallarino N, Bain O, **Gavotte L** and Martin C. Fitness cost of *Litomosoides sigmodontis* filarial infection in mite vectors; implications of infected haematophagous arthropod excretory products in host-vector interactions. *BioMed Research International*. 2013. Epub 2013 Sep 9.
 12. **Lefoulon E**, **Gavotte L**, Junker K, Barbuto M, Uni S, Landmann F, Laaksonen S, Saari S, Nikander S, de Souza Lima S, Casiraghi M, Bain O, Martin C. A new type F *Wolbachia* from *Splendidofilariinae* (Onchocercidae) supports the recent emergence of this supergroup. *Int J Parasitol*. 2012. 42(11):1025-36.
 13. **Sorn S**, Sok T, Ly S, Rith S, Tung N, Viari A, **Gavotte L**, Holl D, Seng H, Asgari N, Richner B, Laurent D, Chea N, Duong V, Toyoda T, Yasuda CY, Kitsutani P, Zhou P, Bing S, Deubel V, Donis R, Frutos R, Buchy P. Dynamic of H5N1 virus in Cambodia and emergence of a novel endemic sub-clade. *Infect Genet Evol*. Epub 2012 Jun 7.
 14. **Duong V**, Henn MR, Simmons C, Ngan C, Y B, **Gavotte L**, Viari A, Ong S, Huy R, Lennon NJ, Ly S, Vong S, Birren BW, Farrar JJ, Deubel V, Frutos R, Buchy P. Complex dynamic of dengue virus serotypes 2 and 3 in Cambodia following series of climate disasters. *Infect Genet Evol*. Epub 2012 Jun 5.
 15. **Bouchery T**, Dénécé G, Attout T, Ehrhardt K, Lhermitte-Vallarino N, Hachet-Haas M, Galzi JL, Brotin E, Bachelerie F, **Gavotte L**, Moulia C, Bain O, Martin C. The chemokine CXCL12 is essential for the clearance of the filaria *Litomosoides sigmodontis* in resistant mice. *PLoS One*. 2012 7(4):e34971.
 16. **Duong V**, Simmons C, **Gavotte L**, Viari A, Ong S, Chantha N, Lennon NJ, Birren BW, Vong S, Farrar JJ, Henn MR, Deubel V, Frutos R, Buchy P. Genetic diversity and lineage dynamic of dengue virus serotype 1 (DENV-1) in Cambodia. *Infect Genet Evol*. Epub 2011 Jul 2.

17. **Duong V**, Blassdell K, May TT, Sreyrath L, **Gavotte L**, Morand S, Frutos R, Buchy P. Diversity of *Orientia tsutsugamushi* clinical isolates in Cambodia reveals active selection and recombination process. *Infect Genet Evol.* Epub 2010 Sep 18.
18. **Gavotte L**, Mercer DR, Stoeckle JJ, Dobson SL. Costs and benefits of *Wolbachia* infection in immature *Aedes albopictus* depend upon sex and competition level. *J Invertebr Pathol.* 2010 105(3):341-6.
19. Fu Y, **Gavotte L**, Mercer DR, Dobson SL. Artificial triple *Wolbachia* infection in *Aedes albopictus* yields a new pattern of unidirectional cytoplasmic incompatibility. *Appl Environ Microbiol.* 2010 76(17):5887-91.
20. Martin C, **Gavotte L**. The bacteria *Wolbachia* in filariae, a biological Russian dolls' system: new trends in antifilarial treatments. *Parasite.* 2010 17(2):79-89. Review.
21. **Adakal H**, **Gavotte L**, Stachurski F, Konkobo M, Henri H, Zoungrana S, Huber K, Vachier N, Martinez D, Morand S, Frutos R. Clonal origin of emerging populations of *Ehrlichia ruminantium* in Burkina Faso. *Infect Genet Evol.* 2010 10(7):903-12.
22. **Gavotte L**, Mercer DR, Vandyke R, Mains JW, Dobson SL. *Wolbachia* infection and resource competition effects on immature *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae). *J Med Entomol.* 2009 46(3):451-9.
23. Xi Z, **Gavotte L**, Xie Y, Dobson SL. Genome-wide analysis of the interaction between the endosymbiotic bacterium *Wolbachia* and its *Drosophila* host. *BMC Genomics.* 2008 2;9:1.
24. Duron O, **Gavotte L**. Absence of *Wolbachia* in nonfilarid worms parasitizing arthropods. *Curr Microbiol.* 2007 55(3):193-7.
25. **Gavotte L**, Henri H, Stouthamer R, Charif D, Charlat S, Boulétreau M, Vavre F. A Survey of the bacteriophage WO in the endosymbiotic bacteria *Wolbachia*. *Mol Biol Evol.* 2007 24(2):427-35.
26. **Gavotte L**, Vavre F, Henri H, Ravallec M, Stouthamer R, Boulétreau M. Diversity, distribution and specificity of WO phage infection in *Wolbachia* of four insect species. *Insect Mol Biol.* 2004 13(2):147-53.

Chapitres d'ouvrages

1. Laurence Pascal, Catherine Moulia and **Laurent Gavotte**. 2018. Biotic interactions, co-viability and dynamics of biodiversity. In Co-viability of Social and Ecological Systems: Reconnect Man to the Biosphere in a Global Era of Change. Springer Editions. *in press*.

Ouvrages

Claude Combes, **Laurent Gavotte**, Mathieu Sicard et Catherine Moulia. 2018. Ecologie et évolution des Parasites : les Interactions Durables. Dunod, Paris. *in press*.

ENCADREMENT DE RECHERCHE (MASTER, THESES ET POST-DOCTORATS)

Année	Prénom Nom	Niveau (encadrement)	Publications
2007	Elvire Bousquet	Master 1 (100%)	-
2007	Nicolas Pionnier	Master 1 (100%)	-
2008-2015	Emilie Lefoulon	Master 1 (100%) - Thèse	3-6-12
2009	Anne Kenaghan	Master 2 (100%)	-
2010	Patricia Bagagli	Master 2 (100%)	-
2012-2013	Adélaïde Nieguitsila	Post-doctorat (50%)	11
2012-2016	Thi Kim Lien Phan	Thèse (25%)	1-5-8
2012-2017	Nghia Ngu Duy	Thèse (25%)	2
2012-2016	Munkhbat Javanrusen	Thèse (25%)	7
2013	Patimaporn Wongprompitak	Post-doctorat (25%)	9
2013	Franck Jacob	Master 2 (100%)	-
2014	Vincent Bernard	Master 2 (100%)	-
2016	Jules Rodrigues	Master 1 (100%)	<i>En rédaction</i>
2017	Fanni Borveto	Master 2 (100%)	<i>En rédaction</i>

RESPONSABILITES

Responsabilités collectives

Administrateur élu de la **Société Française de Parasitologie** - depuis 2015.

Directeur du **Département d'Enseignement de Biologie Ecologie** - 2012-2015.

Membre nommé du **Conseil de laboratoire de l'ISEM** - 2010-2014.

Membre élu du bureau du **Département d'Enseignement de Biologie Ecologie** - 2009-2012 et 2015-2016.

Comités de sélection BIATS :

- Président concours Technicien interne "Technicien des milieux naturels et ruraux" - 2014.
- Membre concours Adjoint Technique "animalier" externe - 2015.

Comités de sélection Enseignant Chercheur :

- Concours "Biodiversité, adaptations et histoire évolutive des hémospories" - Muséum National d'Histoires Naturelles - 2014.
- Concours "Infectiologie: interaction moléculaire hôtes-agents infectieux" - Université de la Réunion - 2016.

Responsabilités en enseignement

Responsable de la **Licence 3^{ème} année parcours Ecologie et Biologie des Organismes** - 2010-2012.

Responsable de la **Spécialité de Master Maladies Transmissibles** de la Mention Biodiversité, Ecologie et Evolution - 2011-2014.

Co-responsable des parcours de Master **Epidémiologie des Maladies Transmissibles (EPI)** et **Dynamique des Interactions Parasites-Hôtes-Environnement (DIPHE** - anciennement **Ecologie et Evolution des Parasites)** - depuis 2012.

Co-responsable du parcours international bi-diplômant (France Indonésie) **Emerging of Parasitic and Infectious Diseases (EPID)** - depuis 2016.

Responsabilité et coresponsabilité des **Unités d'Enseignement** :

Niveau	Unité d'Enseignement	# étudiants	Années	Création
L3	Parasitisme	25 ~ 30	depuis 2009	
L3	Biologie des Organismes Unicellulaires	90 ~ 110	2013-2015	oui
L3	Biologie des Interactions	90 ~ 110	depuis 2014	oui
M1	Ecologie des Maladies Transmissibles	10 ~ 15	depuis 2009	
M1	Immuno-écologie et maladies vectorielles	10 ~ 15	depuis 2014	oui
M1	Evolution des Interactions Durables	10 ~ 15	2009-2016	
M1	Histoire et Evolution des Maladies Emergentes	10 ~ 15	depuis 2013	oui
M1	Biologie intégrative des maladies transmissibles	10 ~ 15	depuis 2013	oui
M2	Synthèse bibliographique "Maladies Transmissibles"	10 ~ 15	2013-2016	
M2	Méthodes et outils d'analyse, plateformes génomiques et post génomiques	10 ~ 15	depuis 2015	
M2	Epidémiologie des Maladies Transmissibles: concepts et applications	10 ~ 15	depuis 2015	oui
M2	Interactions of hosts and pathogen populations (eng)	10 ~ 15	depuis 2017	oui

Expertise scientifique scientifiques

Expert consultant pour le **National Institute of Health** (NIH - USA) - 2006

Expert consultant pour l'**Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail** (ANSES) projet DIM1HEALTH - 2017

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Adakal, H., Meyer, D.F., Carasco-Lacombe, C., Pinarello, V., Allegre, F., Huber, K., Stachurski, F., Morand, S., Martinez, D., Lefrancois, T., Vachiere, N., and Frutos, R. 2009. MLST scheme of *Ehrlichia ruminantium*: genomic stasis and recombination in strains from Burkina-Faso. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 9:1320-1328.
- Anderson, C.L., and Karr, T.L. 2001. *Wolbachia*: evolutionary novelty in a rickettsial bacteria. *BMC evolutionary biology* 1:10.
- Augustinos, A.A., Santos-Garcia, D., Dionyssopoulou, E., Moreira, M., Papapanagiotou, A., Scarvelakis, M., Doudoumis, V., Ramos, S., Aguiar, A.F., Borges, P.A., Khadem, M., Latorre, A., Tsiamis, G., and Bourtzis, K. 2011. Detection and characterization of *Wolbachia* infections in natural populations of aphids: is the hidden diversity fully unraveled? *PloS one* 6:e28695.
- Bain, O. 2002. Evolutionary relationships among filarial nematodes. in: *The Filaria (World Class Parasites)*, Springer, New York.
- Bain, O., Mutafchiev, Y., and Junker, K. 2013. *Nematoda*. De Gruyter.
- Balbuena, J.A., Miguez-Lozano, R., and Blasco-Costa, I. 2013. PACo: a novel procrustes application to cophylogenetic analysis. *PloS one* 8:e61048.
- Baldini, F., Segata, N., Pompon, J., Marcenac, P., Shaw, W.R., Dabire, R.K., Diabate, A., Levashina, E.A., and Catteruccia, F. 2014. Evidence of natural *Wolbachia* infections in field populations of *Anopheles gambiae*. *Nature communications* 5:3985.
- Baldo, L., Bordenstein, S., Wernegreen, J.J., and Werren, J.H. 2006. Widespread recombination throughout *Wolbachia* genomes. *Molecular biology and evolution* 23:437-449.
- Baldo, L., Prendini, L., Corthals, A., and Werren, J.H. 2007. *Wolbachia* are present in southern african scorpions and cluster with supergroup F. *Current microbiology* 55:367-373.
- Bandi, C., Anderson, T.J., Genchi, C., and Blaxter, M.L. 1998. Phylogeny of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 265:2407-2413.
- Bing, X.L., Xia, W.Q., Gui, J.D., Yan, G.H., Wang, X.W., and Liu, S.S. 2014. Diversity and evolution of the *Wolbachia* endosymbionts of *Bemisia* (Hemiptera: Aleyrodidae) whiteflies. *Ecology and evolution* 4:2714-2737.
- Bordenstein, S., and Rosengaus, R.B. 2005. Discovery of a novel *Wolbachia* super group in Isoptera. *Current microbiology* 51:393-398.

- Bordenstein, S.R., Paraskevopoulos, C., Dunning Hotopp, J.C., Sapountzis, P., Lo, N., Bandi, C., Tettelin, H., Werren, J.H., and Bourtzis, K. 2009. Parasitism and mutualism in Wolbachia: what the phylogenomic trees can and cannot say. *Molecular biology and evolution* 26:231-241.
- Bouchon, D., Rigaud, T., and Juchault, P. 1998. Evidence for widespread Wolbachia infection in isopod crustaceans: molecular identification and host feminization. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 265:1081-1090.
- Bourtzis, K., and Miller, T.A. 2003. *Insect Symbiosis*, Boca Raton, FL, USA.
- Brown, B.A., Oberste, M.S., Alexander, J.P., Jr., Kennett, M.L., and Pallansch, M.A. 1999. Molecular epidemiology and evolution of enterovirus 71 strains isolated from 1970 to 1998. *Journal of virology* 73:9969-9975.
- Brownlie, J.C., and O'Neill, S.L. 2005. Wolbachia genomes: insights into an intracellular lifestyle. *Current biology* : CB 15:R507-509.
- Caine, E.A., Moncla, L.H., Ronderos, M.D., Friedrich, T.C., and Osorio, J.E. 2016. A Single Mutation in the VP1 of Enterovirus 71 Is Responsible for Increased Virulence and Neurotropism in Adult Interferon-Deficient Mice. *Journal of virology* 90:8592-8604.
- Casiraghi, M., Anderson, T.J., Bandi, C., Bazzocchi, C., and Genchi, C. 2001a. A phylogenetic analysis of filarial nematodes: comparison with the phylogeny of Wolbachia endosymbionts. *Parasitology* 122 Pt 1:93-103.
- Casiraghi, M., Favia, G., Cancrini, G., Bartoloni, A., and Bandi, C. 2001b. Molecular identification of Wolbachia from the filarial nematode *Mansonella ozzardi*. *Parasitology research* 87:417-420.
- Casiraghi, M., Bain, O., Guerrero, R., Martin, C., Pocacqua, V., Gardner, S.L., Franceschi, A., and Bandi, C. 2004. Mapping the presence of Wolbachia pipientis on the phylogeny of filarial nematodes: evidence for symbiont loss during evolution. *International journal for parasitology* 34:191-203.
- Casiraghi, M., Bordenstein, S.R., Baldo, L., Lo, N., Beninati, T., Wernegreen, J.J., Werren, J.H., and Bandi, C. 2005. Phylogeny of Wolbachia pipientis based on gltA, groEL and ftsZ gene sequences: clustering of arthropod and nematode symbionts in the F supergroup, and evidence for further diversity in the Wolbachia tree. *Microbiology* 151:4015-4022.
- Chabaud, A.G., and Choquet, M.T. 1953. [New attempt of classification of filarias; superfamily of Filarioidea]. *Annales de parasitologie humaine et comparee* 28:172-192.
- Chabaud, A.G., and Bain, O. 1994. The evolutionary expansion of the Spirurida. *International journal for parasitology* 24:1179-1201.
- Charleston, M.A. 1998. Jungles: a new solution to the host/parasite phylogeny reconciliation problem. *Mathematical biosciences* 149:191-223.

- Choi, S., Jeong, H.J., Ju, Y.R., Gill, B., Hwang, K.J., and Lee, J. 2014. Protective immunity of 56-kDa type-specific antigen of *Orientia tsutsugamushi* causing scrub typhus. *Journal of microbiology and biotechnology* 24:1728-1735.
- Collins, N.E., Liebenberg, J., de Villiers, E.P., Brayton, K.A., Louw, E., Pretorius, A., Faber, F.E., van Heerden, H., Josemans, A., van Kleef, M., Steyn, H.C., van Strijp, M.F., Zweygarth, E., Jongejan, F., Maillard, J.C., Berthier, D., Botha, M., Joubert, F., Corton, C.H., Thomson, N.R., Allsopp, M.T., and Allsopp, B.A. 2005. The genome of the heartwater agent *Ehrlichia ruminantium* contains multiple tandem repeats of actively variable copy number. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102:838-843.
- Comandatore, F., Sasser, D., Montagna, M., Kumar, S., Koutsovoulos, G., Thomas, G., Repton, C., Babayan, S.A., Gray, N., Cordaux, R., Darby, A., Makepeace, B., and Blaxter, M. 2013. Phylogenomics and analysis of shared genes suggest a single transition to mutualism in *Wolbachia* of nematodes. *Genome biology and evolution* 5:1668-1674.
- Conow, C., Fielder, D., Ovadia, Y., and Libeskind-Hadas, R. 2010. Jane: a new tool for the cophylogeny reconstruction problem. *Algorithms for molecular biology* : AMB 5:16.
- Coulibaly, Y.I., Dembele, B., Diallo, A.A., Lipner, E.M., Doumbia, S.S., Coulibaly, S.Y., Konate, S., Diallo, D.A., Yalcouye, D., Kubofcik, J., Doumbo, O.K., Traore, A.K., Keita, A.D., Fay, M.P., Traore, S.F., Nutman, T.B., and Klion, A.D. 2009. A randomized trial of doxycycline for *Mansonella perstans* infection. *The New England journal of medicine* 361:1448-1458.
- Czarnetzki, A.B., and Tebbe, C.C. 2004. Detection and phylogenetic analysis of *Wolbachia* in Collembola. *Environmental microbiology* 6:35-44.
- Darby, A.C., Cho, N.H., Fuxelius, H.H., Westberg, J., and Andersson, S.G. 2007. Intracellular pathogens go extreme: genome evolution in the Rickettsiales. *Trends in genetics* : TIG 23:511-520.
- Darby, A.C., Armstrong, S.D., Bah, G.S., Kaur, G., Hughes, M.A., Kay, S.M., Koldkjaer, P., Rainbow, L., Radford, A.D., Blaxter, M.L., Tanya, V.N., Trees, A.J., Cordaux, R., Wastling, J.M., and Makepeace, B.L. 2012. Analysis of gene expression from the *Wolbachia* genome of a filarial nematode supports both metabolic and defensive roles within the symbiosis. *Genome research* 22:2467-2477.
- Das, B., Satapathy, T., Kar, S.K., and Hazra, R.K. 2014. Genetic structure and *Wolbachia* genotyping in naturally occurring populations of *Aedes albopictus* across contiguous landscapes of Orissa, India. *PloS one* 9:e94094.
- de Albuquerque, A.L., Magalhaes, T., and Ayres, C.F. 2011. High prevalence and lack of diversity of *Wolbachia pipientis* in *Aedes albopictus* populations from Northeast Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 106:773-776.
- Dumler, J.S., Barbet, A.F., Bekker, C.P., Dasch, G.A., Palmer, G.H., Ray, S.C., Rikihisa, Y., and Rurangirwa, F.R. 2001. Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of

- Ehrlichia with Anaplasma, Cowdria with Ehrlichia and Ehrlichia with Neorickettsia, descriptions of six new species combinations and designation of Ehrlichia equi and 'HGE agent' as subjective synonyms of Ehrlichia phagocytophila. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 51:2145-2165.
- Duong, V., Blassdell, K., May, T.T., Sreyrath, L., Gavotte, L., Morand, S., Frutos, R., and Buchy, P. 2013a. Diversity of Orientia tsutsugamushi clinical isolates in Cambodia reveals active selection and recombination process. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 15:25-34.
- Duong, V., Simmons, C., Gavotte, L., Viari, A., Ong, S., Chantha, N., Lennon, N.J., Birren, B.W., Vong, S., Farrar, J.J., Henn, M.R., Deubel, V., Frutos, R., and Buchy, P. 2013b. Genetic diversity and lineage dynamic of dengue virus serotype 1 (DENV-1) in Cambodia. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 15:59-68.
- Duong, V., Henn, M.R., Simmons, C., Ngan, C., Y, B., Gavotte, L., Viari, A., Ong, S., Huy, R., Lennon, N.J., Ly, S., Vong, S., Birren, B.W., Farrar, J.J., Deubel, V., Frutos, R., and Buchy, P. 2013c. Complex dynamic of dengue virus serotypes 2 and 3 in Cambodia following series of climate disasters. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 15:77-86.
- Dutta, S.K., Vemulapalli, R., and Biswas, B. 1998. Association of deficiency in antibody response to vaccine and heterogeneity of Ehrlichia risticii strains with Potomac horse fever vaccine failure in horses. *Journal of clinical microbiology* 36:506-512.
- Dwivedi, V.D., Tripathi, I.P., Tripathi, R.C., Bharadwaj, S., and Mishra, S.K. 2017. Genomics, proteomics and evolution of dengue virus. *Briefings in functional genomics* 16:217-227.
- Ellegaard, K.M., Klasson, L., Naslund, K., Bourtzis, K., and Andersson, S.G. 2013. Comparative genomics of Wolbachia and the bacterial species concept. *PLoS genetics* 9:e1003381.
- Fenn, K., Conlon, C., Jones, M., Quail, M.A., Holroyd, N.E., Parkhill, J., and Blaxter, M. 2006. Phylogenetic relationships of the Wolbachia of nematodes and arthropods. *PLoS pathogens* 2:e94.
- Ferreira, R.F., Cerqueira Ade, M., Castro, T.X., Ferreira Ede, O., Neves, F.P., Barbosa, A.V., Macieira Dde, B., and Almosny, N.R. 2014. Genetic diversity of Ehrlichia canis strains from naturally infected dogs in Rio de Janeiro, Brazil. *Revista brasileira de parasitologia veterinaria = Brazilian journal of veterinary parasitology : Orgao Oficial do Colegio Brasileiro de Parasitologia Veterinaria* 23:301-308.
- Ferri, E., Barbuto, M., Bain, O., Galimberti, A., Uni, S., Guerrero, R., Ferte, H., Bandi, C., Martin, C., and Casiraghi, M. 2009. Integrated taxonomy: traditional approach and DNA barcoding for the identification of filarioid worms and related parasites (Nematoda). *Frontiers in zoology* 6:1.

- Ferri, E., Bain, O., Barbuto, M., Martin, C., Lo, N., Uni, S., Landmann, F., Baccei, S.G., Guerrero, R., de Souza Lima, S., Bandi, C., Wanji, S., Diagne, M., and Casiraghi, M. 2011. New insights into the evolution of Wolbachia infections in filarial nematodes inferred from a large range of screened species. *PLoS one* 6:e20843.
- Fischer, K., Beatty, W.L., Jiang, D., Weil, G.J., and Fischer, P.U. 2011. Tissue and stage-specific distribution of Wolbachia in *Brugia malayi*. *PLoS neglected tropical diseases* 5:e1174.
- Foster, J., Ganatra, M., Kamal, I., Ware, J., Makarova, K., Ivanova, N., Bhattacharyya, A., Kapatral, V., Kumar, S., Posfai, J., Vincze, T., Ingram, J., Moran, L., Lapidus, A., Omelchenko, M., Kyrpides, N., Ghedin, E., Wang, S., Goltsman, E., Joukov, V., Ostrovskaya, O., Tsukerman, K., Mazur, M., Comb, D., Koonin, E., and Slatko, B. 2005. The Wolbachia genome of *Brugia malayi*: endosymbiont evolution within a human pathogenic nematode. *PLoS biology* 3:e121.
- Frutos, R., Viari, A., Vachiery, N., Boyer, F., and Martinez, D. 2007. *Ehrlichia ruminantium*: genomic and evolutionary features. *Trends in parasitology* 23:414-419.
- Gerth, M., Rothe, J., and Bleidorn, C. 2013. Tracing horizontal Wolbachia movements among bees (*Anthophila*): a combined approach using multilocus sequence typing data and host phylogeny. *Molecular ecology* 22:6149-6162.
- Gerth, M., Gansauge, M.T., Weigert, A., and Bleidorn, C. 2014. Phylogenomic analyses uncover origin and spread of the Wolbachia pandemic. *Nature communications* 5:5117.
- Giordano, R., O'Neill, S.L., and Robertson, H.M. 1995. Wolbachia infections and the expression of cytoplasmic incompatibility in *Drosophila sechellia* and *D. mauritiana*. *Genetics* 140:1307-1317.
- Glowska, E., Dragun-Damian, A., Dabert, M., and Gerth, M. 2015. New Wolbachia supergroups detected in quill mites (Acari: Symbionidae). *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 30:140-146.
- Goodacre, S.L., Martin, O.Y., Thomas, C.F., and Hewitt, G.M. 2006. Wolbachia and other endosymbiont infections in spiders. *Molecular ecology* 15:517-527.
- Gorham, C.H., Fang, Q.Q., and Durden, L.A. 2003. Wolbachia endosymbionts in fleas (*Siphonaptera*). *The Journal of parasitology* 89:283-289.
- Grunnill, M., and Boots, M. 2016. How Important is Vertical Transmission of Dengue Viruses by Mosquitoes (*Diptera: Culicidae*)? *Journal of medical entomology* 53:1-19.
- Guzman, M.G., Gubler, D.J., Izquierdo, A., Martinez, E., and Halstead, S.B. 2016. Dengue infection. *Nature reviews. Disease primers* 2:16055.
- Guzman, M.G., Halstead, S.B., Artsob, H., Buchy, P., Farrar, J., Gubler, D.J., Hunsperger, E., Kroeger, A., Margolis, H.S., Martinez, E., Nathan, M.B., Pelegrino, J.L., Simmons,

- C., Yoksan, S., and Peeling, R.W. 2010. Dengue: a continuing global threat. *Nature reviews. Microbiology* 8:S7-16.
- Gyawali, N., Bradbury, R.S., and Taylor-Robinson, A.W. 2016. The epidemiology of dengue infection: Harnessing past experience and current knowledge to support implementation of future control strategies. *Journal of vector borne diseases* 53:293-304.
- Haegeman, A., Vanholme, B., Jacob, J., Vandekerckhove, T.T., Claeys, M., Borgonie, G., and Gheysen, G. 2009. An endosymbiotic bacterium in a plant-parasitic nematode: member of a new *Wolbachia* supergroup. *International journal for parasitology* 39:1045-1054.
- Hanley, K.A., Monath, T.P., Weaver, S.C., Rossi, S.L., Richman, R.L., and Vasilakis, N. 2013. Fever versus fever: the role of host and vector susceptibility and interspecific competition in shaping the current and future distributions of the sylvatic cycles of dengue virus and yellow fever virus. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 19:292-311.
- Hertig, M., and Wolbach, S.B. 1924. Studies on Rickettsia-Like Micro-Organisms in Insects. *J Med Res.* 44:329-374.
- Hilgenboecker, K., Hammerstein, P., Schlattmann, P., Telschow, A., and Werren, J.H. 2008. How many species are infected with *Wolbachia*?--A statistical analysis of current data. *FEMS microbiology letters* 281:215-220.
- Hoerauf, A., Specht, S., Buttner, M., Pfarr, K., Mand, S., Fimmers, R., Marfo-Debrekyei, Y., Konadu, P., Debrah, A.Y., Bandi, C., Brattig, N., Albers, A., Larbi, J., Batsa, L., Taylor, M.J., Adjei, O., and Buttner, D.W. 2008. *Wolbachia* endobacteria depletion by doxycycline as antifilarial therapy has macrofilaricidal activity in onchocerciasis: a randomized placebo-controlled study. *Medical microbiology and immunology* 197:295-311.
- Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.Y., and Fukatsu, T. 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107:769-774.
- Huang, S.W., Tai, C.H., Fonville, J.M., Lin, C.H., Wang, S.M., Liu, C.C., Su, I.J., Smith, D.J., and Wang, J.R. 2015. Mapping Enterovirus A71 Antigenic Determinants from Viral Evolution. *Journal of virology* 89:11500-11506.
- Junglen, S. 2016. Evolutionary origin of pathogenic arthropod-borne viruses-a case study in the family Bunyaviridae. *Current opinion in insect science* 16:81-86.
- Kataoka, C., Suzuki, T., Kotani, O., Iwata-Yoshikawa, N., Nagata, N., Ami, Y., Wakita, T., Nishimura, Y., and Shimizu, H. 2015. The Role of VP1 Amino Acid Residue 145 of Enterovirus 71 in Viral Fitness and Pathogenesis in a *Cynomolgus* Monkey Model. *PLoS pathogens* 11:e1005033.
- Kelly, D.J., Fuerst, P.A., Ching, W.M., and Richards, A.L. 2009. Scrub typhus: the geographic distribution of phenotypic and genotypic variants of *Orientia*

- tsutsugamushi. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America* 48 Suppl 3:S203-230.
- Kim Lien, P.T., Duoc, V.T., Gavotte, L., Cornillot, E., Nga, P.T., Briant, L., Frutos, R., and Duong, T.N. 2015. Role of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* during the 2011 dengue fever epidemics in Hanoi, Vietnam. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 8:543-548.
- Kim Lien, P.T., Briant, L., Tang, T.B., Trang, B.M., Gavotte, L., Cornillot, E., Duoc, V.T., Duong, T.N., Frutos, R., and Nga, P.T. 2016. Surveillance of dengue and chikungunya infection in Dong Thap, Vietnam: A 13-month study. *Asian Pacific journal of tropical medicine* 9:39-43.
- Kimura, M. 1968. Evolutionary Rate at the Molecular Level. *Nature* 217:624-626.
- Kitrayapong, P., Baimai, V., and O'Neill, S.L. 2002. Field prevalence of *Wolbachia* in the mosquito vector *Aedes albopictus*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 66:108-111.
- Koutsovoulos, G., Makepeace, B., Tanya, V.N., and Blaxter, M. 2014. Palaeosymbiosis revealed by genomic fossils of *Wolbachia* in a strongyloidean nematode. *PLoS genetics* 10:e1004397.
- Landmann, F., Foster, J.M., Slatko, B., and Sullivan, W. 2010. Asymmetric *Wolbachia* segregation during early *Brugia malayi* embryogenesis determines its distribution in adult host tissues. *PLoS neglected tropical diseases* 4:e758.
- Landmann, F., Bain, O., Martin, C., Uni, S., Taylor, M.J., and Sullivan, W. 2012. Both asymmetric mitotic segregation and cell-to-cell invasion are required for stable germline transmission of *Wolbachia* in filarial nematodes. *Biology open* 1:536-547.
- Lefoulon, E., Bain, O., Makepeace, B.L., d'Haese, C., Uni, S., Martin, C., and Gavotte, L. 2016. Breakdown of coevolution between symbiotic bacteria *Wolbachia* and their filarial hosts. *PeerJ* 4:e1840.
- Lefoulon, E., Gavotte, L., Junker, K., Barbuto, M., Uni, S., Landmann, F., Laaksonen, S., Saari, S., Nikander, S., de Souza Lima, S., Casiraghi, M., Bain, O., and Martin, C. 2012. A new type F *Wolbachia* from *Splendidofilariinae* (Onchocercidae) supports the recent emergence of this supergroup. *International journal for parasitology* 42:1025-1036.
- Lefoulon, E., Bain, O., Bourret, J., Junker, K., Guerrero, R., Canizales, I., Kuzmin, Y., Satoto, T.B., Cardenas-Callirgos, J.M., de Souza Lima, S., Raccurt, C., Mutafchiev, Y., Gavotte, L., and Martin, C. 2015. Shaking the Tree: Multi-locus Sequence Typing Usurps Current Onchocercid (Filarial Nematode) Phylogeny. *PLoS neglected tropical diseases* 9:e0004233.
- Li, R., Zou, Q., Chen, L., Zhang, H., and Wang, Y. 2011. Molecular analysis of virulent determinants of enterovirus 71. *PloS one* 6:e26237.

- Lin, P.R., Tsai, H.P., Tsui, P.Y., Weng, M.H., Kuo, M.D., Lin, H.C., Chen, K.C., Ji, D.D., Chu, D.M., and Liu, W.T. 2011. Genetic typing, based on the 56-kilodalton type-specific antigen gene, of *Orientia tsutsugamushi* strains isolated from chiggers collected from wild-caught rodents in Taiwan. *Applied and environmental microbiology* 77:3398-3405.
- Lo, N., and Evans, T.A. 2007. Phylogenetic diversity of the intracellular symbiont *Wolbachia* in termites. *Molecular phylogenetics and evolution* 44:461-466.
- Lo, N., Casiraghi, M., Salati, E., Bazzocchi, C., and Bandi, C. 2002. How many *wolbachia* supergroups exist? *Molecular biology and evolution* 19:341-346.
- Lo, N., Paraskevopoulos, C., Bourtzis, K., O'Neill, S.L., Werren, J.H., Bordenstein, S.R., and Bandi, C. 2007. Taxonomic status of the intracellular bacterium *Wolbachia pipientis*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology* 57:654-657.
- Luchetti, A., Mantovani, B., Fioravanti, M.L., and Trentini, M. 2004. *Wolbachia* infection in the newly described Ecuadorian sand flea, *Tunga trimamillata*. *Experimental parasitology* 108:18-23.
- Mahan, S.M., Semu, S.M., Peter, T.F., and Jongejan, F. 1998. Evaluation of the MAP-1B ELISA for cowdriosis with field sera from livestock in Zimbabwe. *Annals of the New York Academy of Sciences* 849:259-261.
- Mahan, S.M., Allsopp, B., Kocan, K.M., Palmer, G.H., and Jongejan, F. 1999. Vaccine strategies for *Cowdria ruminantium* infections and their application to other ehrlichial infections. *Parasitology today* 15:290-294.
- Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russell, J.E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., and Spratt, B.G. 1998. Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:3140-3145.
- Maillard, J.C., Kemp, S.J., Naves, M., Palin, C., Demangel, C., Accipe, A., Maillard, N., and Bensaid, A. 1993. An attempt to correlate cattle breed origins and diseases associated with or transmitted by the tick *Amblyomma variegatum* in the French West Indies. *Revue d'élevage et de médecine vétérinaire des pays tropicaux* 46:283-290.
- Marklewitz, M., Zirkel, F., Kurth, A., Drosten, C., and Junglen, S. 2015. Evolutionary and phenotypic analysis of live virus isolates suggests arthropod origin of a pathogenic RNA virus family. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112:7536-7541.
- Martin, C., and Gavotte, L. 2010. The bacteria *Wolbachia* in filariae, a biological Russian dolls' system: new trends in antifilarial treatments. *Parasite* 17:79-89.
- Martinez-Cano, D.J., Reyes-Prieto, M., Martinez-Romero, E., Partida-Martinez, L.P., Latorre, A., Moya, A., and Delaye, L. 2014. Evolution of small prokaryotic genomes. *Frontiers in microbiology* 5:742.

- Martinez, D., Vachier, N., Stachurski, F., Kandassamy, Y., Raliniaina, M., Aprelon, R., and Gueye, A. 2004. Nested PCR for detection and genotyping of *Ehrlichia ruminantium*: use in genetic diversity analysis. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1026:106-113.
- McMinn, P., Lindsay, K., Perera, D., Chan, H.M., Chan, K.P., and Cardoso, M.J. 2001. Phylogenetic analysis of enterovirus 71 strains isolated during linked epidemics in Malaysia, Singapore, and Western Australia. *Journal of virology* 75:7732-7738.
- McNulty, S.N., Fischer, K., Mehus, J.O., Vaughan, J.A., Tkach, V.V., Weil, G.J., and Fischer, P.U. 2012. Absence of *Wolbachia* endobacteria in *Chandlerella quiscali*, an avian filarial parasite. *The Journal of parasitology* 98:382-387.
- Mustafa, M.S., Rasotgi, V., Jain, S., and Gupta, V. 2015. Discovery of fifth serotype of dengue virus (DENV-5): A new public health dilemma in dengue control. *Medical journal, Armed Forces India* 71:67-70.
- Noda, H., Munderloh, U.G., and Kurtti, T.J. 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Applied and environmental microbiology* 63:3926-3932.
- Oh, H.W., Kim, M.G., Shin, S.W., Bae, K.S., Ahn, Y.J., and Park, H.Y. 2000. Ultrastructural and molecular identification of a *Wolbachia* endosymbiont in a spider, *Nephila clavata*. *Insect molecular biology* 9:539-543.
- Pagan, I., Montes, N., Milgroom, M.G., and Garcia-Arenal, F. 2014. Vertical transmission selects for reduced virulence in a plant virus and for increased resistance in the host. *PLoS pathogens* 10:e1004293.
- Pannebakker, B.A., Zwaan, B.J., Beukeboom, L.W., and Van Alphen, J.J. 2004. Genetic diversity and *Wolbachia* infection of the *Drosophila* parasitoid *Leptopilina clavipes* in western Europe. *Molecular ecology* 13:1119-1128.
- Paris, D.H., Shelite, T.R., Day, N.P., and Walker, D.H. 2013. Unresolved problems related to scrub typhus: a seriously neglected life-threatening disease. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 89:301-307.
- Peyerl, F.W., Barouch, D.H., Yeh, W.W., Bazick, H.S., Kunstman, J., Kunstman, K.J., Wolinsky, S.M., and Letvin, N.L. 2003. Simian-human immunodeficiency virus escape from cytotoxic T-lymphocyte recognition at a structurally constrained epitope. *Journal of virology* 77:12572-12578.
- Philip, C.B. 1956. Comments on the classification of the order Rickettsiales. *Canadian journal of microbiology* 2:261-270.
- Pietila, M.K., Hellstrom, K., and Ahola, T. 2017. Alphavirus polymerase and RNA replication. *Virus research*.
- Raliniaina, M., Meyer, D.F., Pinarello, V., Sheikboudou, C., Emboule, L., Kandassamy, Y., Adakal, H., Stachurski, F., Martinez, D., Lefrancois, T., and Vachier, N. 2010.

- Mining the genetic diversity of Ehrlichia ruminantium using map genes family. *Veterinary parasitology* 167:187-195.
- Ramirez-Puebla, S.T., Servin-Garciduenas, L.E., Ormeno-Orrillo, E., Vera-Ponce de Leon, A., Rosenblueth, M., Delaye, L., Martinez, J., and Martinez-Romero, E. 2015. Species in Wolbachia? Proposal for the designation of 'Candidatus Wolbachia bourtzisii', 'Candidatus Wolbachia onchocercicola', 'Candidatus Wolbachia blaxteri', 'Candidatus Wolbachia brugii', 'Candidatus Wolbachia taylori', 'Candidatus Wolbachia collembolicola' and 'Candidatus Wolbachia multihospitum' for the different species within Wolbachia supergroups. *Systematic and applied microbiology*.
- Rar, V.A., Livanova, N.N., Panov, V.V., Doroschenko, E.K., Pukhovskaya, N.M., Vysochina, N.P., and Ivanov, L.I. 2010. Genetic diversity of Anaplasma and Ehrlichia in the Asian part of Russia. *Ticks and tick-borne diseases* 1:57-65.
- Rasgon, J.L., and Scott, T.W. 2004. Phylogenetic characterization of Wolbachia symbionts infecting Cimex lectularius L. and Oeciacus vicarius Horvath (Hemiptera: Cimicidae). *Journal of medical entomology* 41:1175-1178.
- Raychoudhury, R., Baldo, L., Oliveira, D.C., and Werren, J.H. 2009. Modes of acquisition of Wolbachia: horizontal transfer, hybrid introgression, and codivergence in the Nasonia species complex. *Evolution; international journal of organic evolution* 63:165-183.
- Renault, P., Balleydier, E., D'Ortenzio, E., Bavielle, M., and Filleul, L. 2012. Epidemiology of Chikungunya infection on Reunion Island, Mayotte, and neighboring countries. *Medecine et maladies infectieuses* 42:93-101.
- Rikihisa, Y. 1991. Protection against murine potomac horse fever by an inactivated Ehrlichia risticii vaccine. *Veterinary microbiology* 27:339-350.
- Robinson, C.R., Doane, F.W., and Rhodes, A.J. 1958. Report of an outbreak of febrile illness with pharyngeal lesions and exanthem: Toronto, summer 1957; isolation of group A Cocksackie virus. *Canadian Medical Association journal* 79:615-621.
- Ros, V.I., Fleming, V.M., Feil, E.J., and Breeuwer, J.A. 2009. How diverse is the genus Wolbachia? Multiple-gene sequencing reveals a putatively new Wolbachia supergroup recovered from spider mites (Acari: Tetranychidae). *Applied and environmental microbiology* 75:1036-1043.
- Rowley, S.M., Raven, R.J., and McGraw, E.A. 2004. Wolbachia pipientis in Australian spiders. *Current microbiology* 49:208-214.
- Sanders, S.A., Herrero, L.J., McPhie, K., Chow, S.S., Craig, M.E., Dwyer, D.E., Rawlinson, W., and McMinn, P.C. 2006. Molecular epidemiology of enterovirus 71 over two decades in an Australian urban community. *Archives of virology* 151:1003-1013.
- Schmidtke, M., Hammerschmidt, E., Schuler, S., Zell, R., Birch-Hirschfeld, E., Makarov, V.A., Riabova, O.B., and Wutzler, P. 2005. Susceptibility of coxsackievirus B3 laboratory strains and clinical isolates to the capsid function inhibitor pleconaril: antiviral studies with virus chimeras demonstrate the crucial role of amino acid 1092 in treatment. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* 56:648-656.

- Shi, C., Liu, Y., Ding, Y., Zhang, Y., and Zhang, J. 2015. PRRSV receptors and their roles in virus infection. *Archives of microbiology* 197:503-512.
- Sinha, D.P., Raut, C.G., Jayaprakash, H., Hanumaiah, H., Shaikh, N.J., and Manjunatha, M.J. 2014. Molecular diagnosis of enteroviruses associated with Hand, Foot and Mouth Disease (HFMD). *Indian journal of pediatrics* 81:1242.
- Sironi, M., Bandi, C., Sacchi, L., Di Sacco, B., Damiani, G., and Genchi, C. 1995. Molecular evidence for a close relative of the arthropod endosymbiont *Wolbachia* in a filarial worm. *Molecular and biochemical parasitology* 74:223-227.
- Stewart, A.D., Logsdon, J.M., Jr., and Kelley, S.E. 2005. An empirical study of the evolution of virulence under both horizontal and vertical transmission. *Evolution; international journal of organic evolution* 59:730-739.
- Strubing, U., Lucius, R., Hoerauf, A., and Pfarr, K.M. 2010. Mitochondrial genes for heme-dependent respiratory chain complexes are up-regulated after depletion of *Wolbachia* from filarial nematodes. *International journal for parasitology* 40:1193-1202.
- Suitor, E.C., Jr., and Weiss, E. 1961. Isolation of a Rickettsialike Microorganism (*Wolbachia persica*, n. sp.) from *Argas persicus* (Oken). *The Journal of infectious diseases* 108:95-106.
- Taylor, M.J., and Hoerauf, A. 1999. *Wolbachia* bacteria of filarial nematodes. *Parasitology today* 15:437-442.
- Tee, K.K., Lam, T.T., Chan, Y.F., Bible, J.M., Kamarulzaman, A., Tong, C.Y., Takebe, Y., and Pybus, O.G. 2010. Evolutionary genetics of human enterovirus 71: origin, population dynamics, natural selection, and seasonal periodicity of the VP1 gene. *Journal of virology* 84:3339-3350.
- Tri Baskoro, T.S., Siti Ramah, U., Fardhiasih, D.A., Nastiti, W., Gavotte, L., Devaux, C., and Frutos, R. 2014. Assessment of vertical dengue virus transmission in *Aedes aegypti* and serotype prevalence in Bantul, Indonesia *Asian Pacific journal of tropical medicine* 4:563-568.
- Tsetsarkin, K.A., Vanlandingham, D.L., McGee, C.E., and Higgs, S. 2007. A single mutation in chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS pathogens* 3:e201.
- Tsetsarkin, K.A., McGee, C.E., Volk, S.M., Vanlandingham, D.L., Weaver, S.C., and Higgs, S. 2009. Epistatic roles of E2 glycoprotein mutations in adaption of chikungunya virus to *Aedes albopictus* and *Ae. aegypti* mosquitoes. *PloS one* 4:e6835.
- Unver, A., Rikihisa, Y., Kawahara, M., and Yamamoto, S. 2003. Analysis of 16S rRNA gene sequences of *Ehrlichia canis*, *Anaplasma platys*, and *Wolbachia* species from canine blood in Japan. *Annals of the New York Academy of Sciences* 990:692-698.
- Van Valen, L. 1973. A new evolutionary law *Evolutionary Theory* 1:1-30.

- Vandekerckhove, T.T., Watteyne, S., Willems, A., Swings, J.G., Mertens, J., and Gillis, M. 1999. Phylogenetic analysis of the 16S rDNA of the cytoplasmic bacterium *Wolbachia* from the novel host *Folsomia candida* (Hexapoda, Collembola) and its implications for wolbachial taxonomy. *FEMS microbiology letters* 180:279-286.
- Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P., and Bouletreau, M. 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Molecular biology and evolution* 16:1711-1723.
- Vavre, F., Dedeine, F., Quillon, M., Fouillet, P., Fleury, F., and Bouletreau, M. 2001. Within-species diversity of *Wolbachia*-induced cytoplasmic incompatibility in haplodiploid insects. *Evolution; international journal of organic evolution* 55:1710-1714.
- Waghela, S.D., Rurangirwa, F.R., Mahan, S.M., Yunker, C.E., Crawford, T.B., Barbet, A.F., Burrige, M.J., and McGuire, T.C. 1991. A cloned DNA probe identifies *Cowdria ruminantium* in *Amblyomma variegatum* ticks. *Journal of clinical microbiology* 29:2571-2577.
- Weaver, S.C., and Forrester, N.L. 2015. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral research* 120:32-39.
- Wehr, E.E.A. 1935. A revised classification of the nematode superfamily Filarioidea. *Proceedings of the Helminthological Society of Washington* 2:84-88.
- Werren, J.H. 1997. Biology of *Wolbachia*. *Annual review of entomology* 42:587-609.
- Werren, J.H., Zhang, W., and Guo, L.R. 1995. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. *Proceedings. Biological sciences / The Royal Society* 261:55-63.
- Wongprompitak, P., Duong, V., Anukool, W., Sreyrath, L., Mai, T.T., Gavotte, L., Moulia, C., Cornillot, E., Ekpo, P., Suputtamongkol, Y., Buchy, P., and Frutos, R. 2015. *Orientia tsutsugamushi*, agent of scrub typhus, displays a single metapopulation with maintenance of ancestral haplotypes throughout continental South East Asia. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 31:1-8.
- Xie, H., Bain, O., and Williams, S.A. 1994. Molecular phylogenetic studies on filarial parasites based on 5S ribosomal spacer sequences. *Parasite* 1:141-151.
- Yamaguchi, Y., Nukui, Y., Tajima, S., Nerome, R., Kato, F., Watanabe, H., Takasaki, T., and Kurane, I. 2011. An amino acid substitution (V3I) in the Japanese encephalitis virus NS4A protein increases its virulence in mice, but not its growth rate in vitro. *The Journal of general virology* 92:1601-1606.
- Yang, D., Zhang, C., Zhao, L., Zhou, G., Wang, H., and Yu, L. 2011. Identification of a conserved linear epitope on the VP1 protein of serotype O foot-and-mouth disease virus by neutralising monoclonal antibody 8E8. *Virus research* 155:291-299.

- Yu, C.G., and Huang, Q. 2013. Recent progress on the role of gut microbiota in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Journal of digestive diseases* 14:513-517.
- Yu, X.J., McBride, J.W., and Walker, D.H. 2007. Restriction and expansion of Ehrlichia strain diversity. *Veterinary parasitology* 143:337-346.
- Yuen, P.H., and Szurek, P.F. 1989. The reduced virulence of the thymotropic Moloney murine leukemia virus derivative MoMuLV-TB is mapped to 11 mutations within the U3 region of the long terminal repeat. *Journal of virology* 63:471-480.
- Zhang, D., Zhan, X., Wu, X., Yang, X., Liang, G., Zheng, Z., Li, Z., Wu, Y., and Zheng, X. 2014. A field survey for Wolbachia and phage WO infections of Aedes albopictus in Guangzhou City, China. *Parasitology research* 113:399-404.
- Zheng, L., Bi, Z., Kou, Z., Yang, H., Zhang, L., and Zhao, Z. 2015. Genotype diversity and distribution of Orientia tsutsugamushi in scrub typhus patients and rodents in Shandong, northern China. *Infection, genetics and evolution : journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases* 36:126-130.
- Zweygarth, E., Josemans, A.I., Van Strijp, M.F., Lopez-Rebollar, L., Van Kleef, M., and Allsopp, B.A. 2005. An attenuated Ehrlichia ruminantium (Welgevonden stock) vaccine protects small ruminants against virulent heartwater challenge. *Vaccine* 23:1695-1702.