

LISTE DES FIGURES

Figure 1: Classification taxonomique de <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762.....	5
Figure 2: Carte mondiale de répartition prévisionnelle d' <i>Aedes aegypti</i>	6
Figure 3: Cycle de vie d' <i>Aedes aegypti</i>	7
Figure 4: Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques.....	10
Figure 5: Site d'étude abritant les zones de capture des moustiques <i>Aedes aegypti formosus</i>	12
Figure 6: Broyage des intestins	14
Figure 7: Préparation des dilutions	14
Figure 8: Gélose cœur cerveau.....	14
Figure 9: Congélateur -80°.....	15
Figure 10: Plaque de 96 puits contenant des bactéries aérobies	15
Figure 11: Préparation d'un frottis	16
Figure 12: Résultats des isollements de quelques colonies bactériennes sur milieu GCC.....	21
Figure 13: Analyse comparative du microbiote intestinal des individus d' <i>Aedes aegypti formosus</i>	25

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Noms et lieux d'échantillonnage des intestins d' <i>Aedes aegypti formosus</i>	12
Tableau II: Liste du matériel pour l'étude du microbiote d' <i>Aedes aegypti formosus</i>	13
Tableau III: Colonies bactériennes provenant des intestins individuels d' <i>Aedes aegypti formosus</i>	21
Tableau IV: Isolats bactériens provenant d'intestins d' <i>Aedes aegypti formosus</i>	22
Tableau V : Morphologie et coloration de Gram des isolats bactériens d'intestins d' <i>Aedes.ae.formosus</i>	22
Tableau VI: Résultats des tests de catalase effectués sur les bactéries intestinales de chaque individu.....	22
Tableau VII: Résultats des tests oxydases effectués sur les bactéries intestinales de chaque individu.	23
Tableau VIII: Résultats de la galerie biochimique des cocci Gram + catalase +	23
Tableau IX: Résultats tests biochimiques sur les bacilles Gram- catalase+ oxydase-	24
Tableau X: Résultats des tests de galerie biochimique sur les bacilles gram- catalase+ oxydase+.....	24
Tableau XI: Espèces bactériennes intestinales identifiées chez <i>Aedes aegypti formosus</i>	26

Annexes

Annexe 1 : Colorants

Annexe 2 : Milieux de cultures

Annexe 3 : Résultats des identifications microscopiques et biochimiques

Annexe 4 : Travaux préliminaires sur *Aedes.ae.aegypti* (22 intestins) et *Aedes.ae.formosus*(50 intestins)

Annexe 5 : Travaux préliminaires sur les 5 intestins d'*Aedes.ae.formosus*

Annexe 6 : Fiche d'identification des entérobactéries

Annexe 7 : Conservation des souches

Annexe 8 : Préparation des milieux de cultures

LISTE DES ABREVIATIONS

ACH_E :	Acétylcholinestérase
ADN :	Acide désoxyribonucléique
<i>Ae.ae</i> :	<i>Aedes aegypti</i>
BCC :	Bouillon cœur cerveau
BP :	Milieu Baird Paker
CNaVdp :	Canal sodique voltage-dépendant
CS :	Citrate de Simmons
DDT :	Dichlorodiphényltrichloroethane
GCC :	Gélose Cœur Cerveau
GLU :	glucose
GN :	Gélose Nutritive
H₂S :	Sulfure d'Hydrogène
IND :	Indole
Kdr :	Résistance Knock down
KH :	Kligler-Hajna
LAC :	Lactose
MD :	Maladie de la Dengue
MHD :	Maladie Hémorragique de la Dengue
MILDA :	Moustiquaires Insecticides à Longue Durée d'Action
OMS :	Organisation Mondiale de la Santé
PCR :	Polymerase Chain Reaction
PERI :	Pulvérisation à Effet Rémanent à l'Intérieur
pH :	Potentiel d'Hydrogène
Pyoc :	Pyocyanine
Pyov :	Pyoverdine
RM :	Rouge de Méthyle
URE :	Urée
VDEN :	Virus de la Dengue
VFJ :	Virus de la Fièvre Jaune
VP :	Vosges-Proskauer

TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	iii
LISTE DES TABLEAUX	iii
LISTE DES ABREVIATIONS.....	iv
INTRODUCTION	1
CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....	3
I.1. Le microbiome	3
I.1.1. Définition	3
I.1.2. Les microbiomes intestinaux d’insectes.....	3
I.1.2.1. Microbiome spécifique à chaque groupe	3
I.1.2.2. Composition du microbiome des insectes selon le sexe du moustique	4
I.1.2.3. Modes d’acquisition du microbiome	4
I.1.3. Fonction du microbiome chez les insectes	5
I.1.3.1. Reproduction.....	5
I.1.3.2. Digestion.....	5
I.1.3.3. Nutrition	5
I.2. <i>Aedes aegypti</i> Linnaeus, 1762	5
I.2.1. Classification	5
I.2.2. Répartition géographique	6
I.2.3. Biologie d' <i>Aedes aegypti</i>	7
I.2.2.1. Phase aquatique.....	7
I.2.2.2. Phase aérienne.....	8
I.2.4. Les principales arboviroses liées au moustique <i>Aedes aegypti</i>	8
I.2.5. Lutte anti-vectorielle et développement de la résistance aux insecticides	9
I.2.5.1. Lutte mécanique.....	9
I.2.5.2. Lutte biologique	9
I.2.5.3. Lutte chimique	9
I.2.5.4. Contrôle par paratransgénése	10
I.2.6. Résistances aux insecticides chez les moustiques.....	10
I.2.6.1. Résistance comportementale.....	10
I.2.6.2. Résistance cuticulaire	11
I.2.6.3. Résistance métabolique	11
I.2.6.4. Résistance par modification de la cible des insecticides	11
CHAPITRE II : MATERIEL & METHODES.....	12
II.1. Cadre et site d'étude.....	12
II.2. Matériel.....	12

II.2.1. Matériel biologique.....	12
II.2.2. Matériel d'identification bactérienne	13
II.3. Méthodes	13
II.3.1. Préparation des dilutions décimales.....	13
II.3.2. Isolement des bactéries	14
II.3.3. Purification des colonies bactériennes	14
II.3.4. Conservation des isolats bactériens	15
II.4. Identification des isolats bactériens aérobies	15
II.4.1. Examens microscopiques	15
II.4.1.1. Préparation d'une suspension bactérienne :.....	15
II.4.1.2. Coloration de gram des isolats bactériens	15
II.5. Identification biochimique des isolats bactériens provenant d'intestins d' <i>Ae. ae. formosus</i>	16
II.5.1. Tests d'orientation pour la galerie biochimique	16
II.5.1.1. Test Catalase.....	16
II.5.1.2. Test oxydase	17
II.5.2. Tests biochimiques	17
II.5.2.1. Gélose Chapman	17
II.5.2.2. Recherche de la désoxyribonucléase.....	17
II.5.2.3. Milieu Baird Paker (BP).....	18
II.5.2.4. Recherche de la coagulase.....	18
II.5.2.5. Fermentation des sucres, production du sulfure d'hydrogène et de gaz.....	18
II.5.2.6. Utilisation du Citrate de Simmons	19
II.5.2.7. Milieu Clark et Lubs	19
II.5.2.8. Production d'uréase, de tryptophane désaminase et d'indole	19
II.5.2.9. Mannitol-Mobilité.....	20
II.5.2.10. Recherche de la pyocyanine et de la pyoverdine	20
Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSION	21
III.1. Résultats	21
III.1.1. Dénombrement des colonies bactériennes sur les boîtes de dilutions	21
III.1.2. Identification morphologique des isolats bactériens	21
III.1.2.1. Isolement et purification	21
III.1.2.2. Coloration de gram	22
III.1.3. Tests biochimiques	22
III.1.3.1 Résultats test d'orientation	22
III.1.4.1. Identification biochimique des isolats bactériens intestinaux d' <i>Aedes aegypti formosus</i>	23

III.1.4.2. Le microbiote intestinal d' <i>Aedes aegypti formosus</i> .	25
III.2. Discussion.	26
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	29
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	30
ANNEXES	I

INTRODUCTION

Les moustiques, constituant la famille des Culicidae, comptent plus de 3500 espèces différentes distribuées dans le monde entier, pour la plupart hémaphysogènes. Parmi ces espèces, certaines sont capables de transmettre des agents pathogènes aux vertébrés, faisant d'eux un problème important de santé publique. Les espèces les plus décrites appartiennent aux genres *Anopheles*, *Aedes* et *Culex* (Becker *et al.*, 2010).

Le moustique *Aedes aegypti* est le principal vecteur de plusieurs arbovirus importants sur le plan médical comme le Zika, la Dengue, le Chikungunya et le virus de la Fièvre Jaune dans le monde entier. Les seuls virus de la dengue sont responsables de 390 millions d'infections humaines chaque année (Bhatt *et al.*, 2013).

En l'absence de vaccins ou de thérapies spécifiques pour la plupart des arbovirus, le contrôle des populations de moustiques vecteurs constitue la principale stratégie de prévention des maladies (Wilder-Smith *et al.*, 2017).

À ce jour, certains insecticides sont utilisés dans les stratégies de lutte antivectorielle recommandées par l'OMS, telles que la pulvérisation à effet rémanent à l'intérieur (PERI) et les moustiquaires imprégnées d'insecticides (moustiquaires insecticides à longue durée d'action (MILDA) ciblant les moustiques adultes. Cependant, la plupart de ces insecticides sont confrontés au formidable défi que constitue l'émergence d'une résistance physiologique des vecteurs d'arbovirus dans le monde (Kajla, 2020).

Avec l'augmentation de la résistance aux insecticides, le développement de nouvelles interventions entomologiques est en cours (McGraw et O'Neill, 2013 ; Lambrechts *et al.*, 2015). Parmi ces interventions, les microbes associés à l'hôte (microbiote) sont récemment apparus comme un domaine prometteur à explorer pour de nouvelles stratégies de lutte antivectorielle respectueuses de l'environnement (Scolari *et al.*, 2019).

Ces communautés microbiennes colonisent divers tissus, notamment l'appareil digestif, et varient en fonction du sexe, du stade de développement et de facteurs écologiques (Heu et Gendrin, 2018).

Le microbiote bactérien intestinal, en particulier, influence de multiples aspects de la biologie du moustique, y compris la compétence vectorielle (Minard *et al.*, 2013 ; Hegde *et al.*, 2015), et est devenu un sujet de recherche approfondie. Il a été démontré que la manipulation des espèces bactériennes présentes dans l'intestin moyen du moustique augmente ou diminue la quantité de virus de la dengue, de virus du chikungunya ou de *Plasmodium falciparum* (Cirimotich *et al.*, 2011 ; Apte-Deshpande *et al.*,

2014). Dans ce sens, l'utilisation des bactéries appartenant au microbiome intestinal d'*Aedes aegypti formosus* pourrait jouer un rôle important dans la lutte contre ces arbovirus.

C'est dans ce contexte qu'a pris forme le présent projet de master. Ainsi, l'objectif général de cette étude est d'étudier le microbiome bactérien intestinal d'*Aedes aegypti formosus* vecteur de la Dengue, du Zika, de la Fièvre Jaune et du Chikungunya dans la région de Kédougou. Pour y parvenir, nous avons comme objectifs spécifiques d'isoler la communauté bactérienne du microbiome intestinal d'*Ae.ae.formosus*, puis identifier les espèces prédominantes et enfin déterminer la diversité et la variation de ces espèces composant cette communauté en fonction de la répartition géographique.

Ce mémoire est divisé en trois chapitres : la synthèse bibliographique sur le microbiome et l'espèce *Aedes aegypti*, le matériel et les méthodes utilisés et enfin les résultats et la discussion suivis d'une conclusion et des perspectives.

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

I.1. Le microbiome

I.1.1. Définition

Les termes « microbiome » et « microbiote » définissent deux concepts très proches et sont souvent utilisés de façon interchangeable pour désigner l'ensemble des populations microbiennes habitant une niche écologique donnée. Par contre, le concept de microbiome désigne les tissus hôtes et les populations microbiennes alors que le concept de microbiote ne prend en compte que les populations microbiennes elles-mêmes (Whiteside *et al.*, 2015). Dans le présent mémoire, le terme microbiome est utilisé dans la revue de littérature car c'est de ce concept que traitent la majorité des sources utilisées. Le terme de microbiote est utilisé pour l'expérience traitée dans ce mémoire, qui ne concerne pas vraiment les tissus hôtes des populations microbiennes étudiées.

I.1.2. Les microbiomes intestinaux d'insectes

L'intestin des insectes est divisé en trois parties (Engel et Moran, 2013). L'intestin antérieur (stomodéum) est d'origine ectodermique et peut servir de réservoir de nourriture. L'intestin moyen, ou mésentéron, est l'endroit où se produit en grande partie la digestion, c'est pourquoi l'expérience présente s'attarde particulièrement à cette portion de l'intestin. Il est d'origine endodermique. L'intestin postérieur (proctodéum) joue un rôle dans l'absorption de l'eau et des sels ainsi que dans l'expulsion des excréments et est d'origine ectodermique.

Comme la plupart des organismes multicellulaires, les moustiques sont des hôtes d'une communauté de microbes commensaux, symbiotiques ou pathogènes. Ces microbes, incluant des bactéries, des virus, des champignons, des protozoaires, des nématodes et des acariens, sont présents de façon plus ou moins stable au sein de l'exosquelette, de l'intestin, de l'hémocoèle et/ou dans les cellules du moustique. Parmi les tissus abritant un microbiote, l'intestin est un site primordial pour la propagation de pathogènes (Heu et Gendrin, 2018). C'est un milieu très instable pour le maintien d'un microbiome. Ceci est principalement dû au fait que l'intestin subit d'importantes perturbations causées par les changements développementaux qu'il traverse (Engel et Moran, 2013).

I.1.2.1. Microbiome spécifique à chaque groupe

Les insectes forment une des classes du vivant démontrant la plus grande diversité en termes d'espèces. Il n'est donc pas surprenant que les microbiomes d'insectes varient immensément d'un groupe d'insectes à un autre. Le fait que les habitudes alimentaires varient énormément à l'intérieur de la classe des insectes explique en bonne partie ce phénomène (Engel et Moran, 2013). Par exemple, les détritivores comme les

termites, criquets et cafards possèdent les microbiomes avec la plus grande charge bactérienne (Cazemier *et al.*, 1997). Les différents microbiomes peuvent aussi être reliés aux divers types de système digestif spécifique à chaque groupe d'insectes. Certains insectes possèdent un système digestif doté d'adaptations, permettant le maintien de populations microbiennes contribuant à leur survie. Parmi ces adaptations on compte les replis et les poches dans l'épithélium intestinal, permettant aux microbes de mieux résister aux perturbations subies par le système digestif, ce qui améliore la stabilité du microbiome intestinal (Breznak et Brune, 1994).

I.1.2.2. Composition du microbiome des insectes selon le sexe du moustique

Le sexe du moustique est un facteur déterminant de la composition du microbiote, mâle et femelle ayant des comportements écologiques différents. En effet, tous les moustiques se nourrissent de nectar et sont capables d'hydrolyser le sucrose mais seules les femelles sont hématophages (Heu et Gendrin., 2018). Zouache *et al.* (2011) ont montré qu'environ la moitié de la diversité bactérienne d'une population d'*Aedes albopictus* de terrain était expliquée par le sexe du moustique avec une plus grande diversité chez les femelles. L'effet du sexe a également été rapporté chez *Anopheles stephensi* où les bactéries du genre *Bacillus* et *Staphylococcus* ont été détectées chez les mâles alors que celles des genres *Chryseobacterium*, *Pseudomonas* et *Serratia* étaient, dans la même étude, présentes spécifiquement chez les femelles (Minard *et al.*, 2013).

I.1.2.3. Modes d'acquisition du microbiome

Le microbiote évolue tout au long du cycle de vie du moustique. L'œuf peut contenir des bactéries intracellulaires et des virus dans son cytoplasme ainsi que des bactéries extracellulaires à la surface de son enveloppe, qui pourront être ingérées par la larve après éclosion. La larve acquiert également des microbes provenant de son environnement aquatique, dont certains ont étéensemencés par la femelle lors de la ponte. La larve élimine une grande partie de son microbiote intestinal juste avant de se transformer en puppe et amorcer la métamorphose, les adultes émergent donc avec très peu de microbes dans l'intestin. Ils acquièrent également un microbiote en absorbant l'eau de leur gîte larvaire lors de l'émergence et probablement en s'alimentant de nectar floral.

Au cours de la vie de l'adulte, le microbiote change, on observe notamment une forte augmentation de la charge bactérienne et une diminution de la diversité du microbiote bactérien après le repas de sang. Certains microbes peuvent être transmis horizontalement entre moustiques, par contamination de l'eau pendant le développement ou par voie sexuelle chez l'adulte (Heu et Gendrin, 2018).

I.1.3. Fonction du microbiome chez les insectes

I.1.3.1. Reproduction

Certaines bactéries colonisent les organes de reproduction des insectes, ce qui leur permet de manipuler la reproduction de l'hôte et de se propager considérablement au sein des populations hôtes. Le genre *Wolbachia* est capable de contrôler l'accouplement des moustiques par un phénomène appelé incompatibilité cytoplasmique. Ce processus empêche les mâles infectés de produire une descendance viable lors de l'accouplement avec une femelle non infectée ou une femelle infectée avec une souche incompatible de *Wolbachia*. Ainsi, certaines espèces de moustiques d'*Aedes* et de *Culex* dépendent de *Wolbachia* pour produire une progéniture viable (Minard *et al.*, 2013).

I.1.3.2. Digestion

Les bactéries contribuent à la nutrition des insectes de différentes manières. Les bactéries de l'intestin moyen peuvent produire des composés directement assimilables par l'hôte ou peuvent améliorer la digestion en produisant des enzymes de dégradation facilitant l'assimilation de molécules complexes (Minard *et al.*, 2013).

I.1.3.3. Nutrition

Chez les insectes phytophages, le microbiote fournit généralement des vitamines, des acides aminés et du stérol qui complètent les régimes alimentaires à base de plantes. L'exemple le plus connu est l'implication de la bactérie *Buchnera* dans la fourniture d'acides aminés essentiels aux pucerons (Minard *et al.*, 2013).

I.2. *Aedes aegypti* Linnaeus, 1762

I.2.1. Classification

Règne : Animalia

Embranchement : Arthropoda

Classe : Insecta

Ordre : Diptera

Famille : Culicidae

Genre : *Aedes*

Sous-genre : *Stegomyia*

Espèce : *aegypti*



Figure 1: *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

- *Ae. aegypti* présente deux sous-espèces ou sous-populations :

La première sous-espèce, *Ae. aegypti formosus*, est l'ancêtre de la forme domestique d' *Ae. aegypti* et vit encore dans les forêts et les écotones végétalisés d'Afrique subsaharienne (Lounibos, 1981). Morphologiquement, cette forme est beaucoup plus foncée que la forme adaptée aux habitats humains (McClelland, 1974).

- La deuxième sous-espèce, *Ae. aegypti* (souvent désigné par le nom plus court *Ae. aegypti*), se trouve globalement dans les régions tropicales et subtropicales, généralement en association avec l'homme, mais est absent de l'intérieur de l'Afrique au sud du Sahara (Moore *et al.*, 2013 ; Powell et Tabachnick, 2013).

I.2.2. Répartition géographique

Il a été émis l'hypothèse qu' *Aedes aegypti* a été importé dans le Nouveau Monde depuis l'Afrique via la traite des esclaves aux 16ème -19ème siècles (Brown *et al.*, 2014). En raison, d'une part, de l'urbanisation croissante, du commerce globalisé, de la migration des populations, de l'utilisation croissante des moyens de transport aérien et du tourisme international et, d'autre part, de la capacité des oeufs à survivre en absence d'eau, sa dissémination s'est accélérée à l'échelle mondiale (Gratz *et al.*, 2000 ; Lounibos, 2002). De nos jours, cette espèce est présente dans toutes les régions tropicales et subtropicales (Figure 2). Et sa distribution s'étend à nouveau dans des régions plus tempérées : Californie etc. (Kraemer *et al.*, 2015).

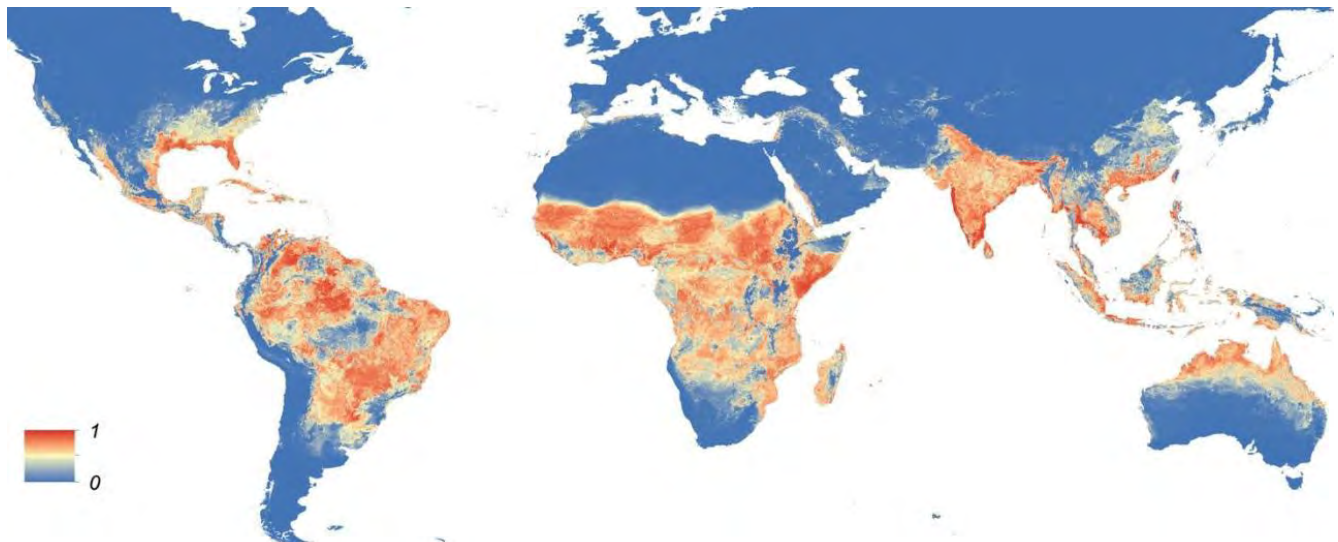


Figure 2: Carte mondiale de répartition prévisionnelle d' *Aedes aegypti*. La carte représente la probabilité d'occurrence d' *Aedes aegypti* de 0 (bleu) à 1 (rouge) (Kraemer *et al.*, 2015).

I.2.3. Biologie d'*Aedes aegypti*

Les moustiques de l'espèce *Aedes aegypti* sont des insectes à métamorphose complète (holométaboles), parce que leur cycle de vie est complexe avec des changements de forme et d'habitat. Le développement complet de l'œuf à l'adulte dure de 8 à 10 jours à température tropicale et dépend de conditions environnementales favorables comme la disponibilité nutritionnelle, un volume d'eau suffisant, la température de l'eau, la compétition larvaire (intra ou interspécifique), les conditions physico-chimiques du gîte. Le cycle biologique est composé d'une phase pré-imaginale aquatique et d'une phase aérienne (Figure 3).

I.2.2.1. Phase aquatique

La phase de développement aquatique d'*Aedes aegypti* a lieu dans les gîtes créés par l'homme comme des coupelles de pot de fleurs, des gouttières mal entretenues, des congélateurs abandonnés, des seaux et autres déchets pouvant contenir de l'eau, peu de gîtes naturels ont été rapportés (Bernáth *et al.*, 2008 ; Mocellin *et al.*, 2009).

Lorsque les œufs résistants à la dessiccation sont à nouveau au contact de l'eau après être parfois restés plusieurs mois desséchés durant la saison défavorable, les larves éclosent. Celles-ci se nourrissent de matières organiques particulières présentes dans le gîte. Le développement larvaire est constitué de quatre stades, chacun séparé d'une mue comme pour tous les insectes holométaboles. Une métamorphose transforme la larve de quatrième stade en nymphe. Ces nymphes ne se nourrissent plus. C'est le stade pendant lequel le corps de l'adulte aérien se forme. Environ deux jours après, l'adulte nouvellement formé émerge de l'eau après avoir rompu l'enveloppe nymphale.

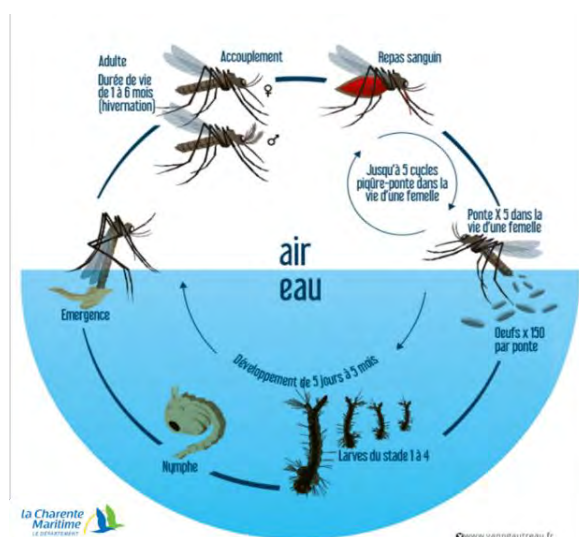


Figure 3: Cycle de vie d'*Aedes aegypti*

<https://www.eidatlantique.eu/page.php?P=144>. Consulté le 18/07/2020

I.2.2.2. Phase aérienne

Chez les adultes, les deux sexes se nourrissent de sucres végétaux pour survivre. Une fois accouplés, seules les femelles prennent un repas sanguin pour apporter les éléments nutritifs indispensables à la maturation des œufs, qui prend 2-3 jours. La femelle est considérée comme anthropophile car sa proximité avec l'homme fait de celui-ci l'hôte idéal. Une femelle prendra aussi un repas fragmenté, piquant plusieurs hôtes pour un seul repas complet de sang ou pour un seul cycle gonotrophique (Harrington *et al.*, 2014).

Après ce repas de sang, les femelles vont préférentiellement pondre leurs œufs sur un support solide et humide servant alors de gîte larvaire (Urdaneta-Marquez et Failloux, 2011). Elles ont souvent un comportement d'oviposition dans de multiples gîtes, pour éviter la surpopulation dans un même gîte où la nutrition des larves est limitée, ou pour minimiser les risques associés aux sites temporaires (Reiter, 2007). Un nouveau cycle de développement va se répéter en repassant par la phase aquatique.

I.2.4. Les principales arboviroses liées au moustique *Aedes aegypti*

❖ La dengue

La dengue est l'arbovirose la plus importante en termes de morbidité et mortalité avec 390 millions de cas chaque année dont 96 millions développant des signes cliniques sévères (Failloux, 2018). Le virus de la dengue (VDEN) appartient au genre *Flavivirus* de la famille des Flaviviridae. Les tableaux cliniques liés à la dengue vont de la forme asymptomatique, la forme classique (MD pour la maladie de la Dengue) à la dengue hémorragique (MHD pour la Maladie Hémorragique de la Dengue). Il est à noter que 80% des cas d'infections sont asymptomatiques. Demeurant infectés et non malades, ces cas participent activement à la transmission et la diffusion du virus. La dengue sévit principalement dans les régions intertropicales (Failloux, 2018).

❖ Le Chikungunya

Le virus du chikungunya (VCHIK) appartient au genre *Alphavirus* de la famille des Togaviridae. Les symptômes de la maladie sont une forte fièvre, des atteintes articulaires, des maux de tête, des douleurs musculaires, une éruption cutanée. Des formes neurologiques graves sont exceptionnellement décrites. Endémique à l'Afrique et l'Asie, ce virus a émergé en 2004, provoquant des épidémies dans les îles de la région de l'Océan Indien (Failloux, 2018).

❖ La Fièvre jaune

Le virus de la fièvre jaune (VFJ) est un prototype du genre *Flavivirus* de la famille des Flaviviridae. Les symptômes (fièvre, douleurs musculaires, maux de tête) peuvent alors évoluer vers des formes graves avec survenue d'un syndrome hémorragique. La mort survient dans 50 à 80% des cas (Failoux, 2018).

❖ La fièvre Zika ou maladie à virus Zika

Le virus Zika est un *Flavivirus* de la famille des Flaviviridés comme la Dengue et la Fièvre Jaune. Il est décrit dans les régions tropicales d'Asie du Sud- Est et d'Afrique. Les symptômes sont une fièvre, des éruptions maculo-papuleuses, des myalgies et arthralgies. Des cas de syndrome de Guillain-Barré et de microcéphalies des nouveau-nés ont été rapportés lors des dernières épidémies (Failoux, 2018).

I.2.5. Lutte anti-vectorielle et développement de la résistance aux insecticides

I.2.5.1. Lutte mécanique

Elle consiste pour ce qui est des stades pré-imaginaux (œufs, larves et nymphes), à éliminer ou neutraliser physiquement tous les sites d'oviposition potentiels, comme les pneus abandonnés, les pots de fleurs, les soucoupes pour pots de fleur, et plus généralement les récipients de toutes tailles et de toutes sortes, que les collections d'eau soient intentionnelles (abreuvoirs d'animaux, réserves d'eau, seaux à boutures...) ou dues à la négligence (détritrus, carcasses de voitures, gouttières mal entretenues...).

I.2.5.2. Lutte biologique

Différents produits à base d'agents biologiques, en particulier des toxines bactériennes, ont été conçus pour éliminer les larves de moustiques. La bactérie *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) seule ou en combinaison avec *Bacillus sphaericus* est utilisée actuellement pour réduire le nombre d'*Aedes* immatures à court terme. Les toxines synthétisées par le *Bti* peuvent détruire les cellules de l'intestin moyen des larves de moustiques, qui meurent en 24 à 48 heures (Boyce *et al.*, 2013). La toxicité très faible de ces produits sur l'homme et l'environnement constitue leur principal avantage. Par contre, *Bti* est efficace sur les jeunes larves, mais moins sur les larves de quatrième stade, et pas du tout sur les nymphes. De plus, l'efficacité dépend aussi de conditions environnementales comme la profondeur des gîtes, la température de l'eau, l'ensoleillement et la densité de matière organique (Kroeger *et al.*, 2013).

I.2.5.3. Lutte chimique

Elle inclut l'application de larvicides et d'adulticides. Plus de 95 % des insecticides visant les moustiques sont des neurotoxiques perturbant de diverses façons la propagation de l'influx nerveux. Au terme de leur action, l'insecte meurt de paralysie. Ils agissent essentiellement par contact et inhalation. Les principaux obstacles sont les problèmes de toxicité pour les organismes non-ciblés, et les phénomènes de résistances observés de plus en plus fréquemment (Moyes *et al.*, 2017). On compte à l'heure actuelle

six classes de composés insecticides organiques globalement utilisés dans le cadre de la lutte contre les moustiques; ce sont les organochlorés, les organophosphorés, les carbamates, les pyréthrinoïdes, les pyrroles et les phénylpyrazoles.

I.2.5.4. Contrôle par paratransgénèse

Le lâcher de moustiques porteurs de la bactérie endosymbiote *Wolbachia* est l'exemple le plus approprié et réussi, parce que la présence de cette bactérie peut interférer avec la réplication de virus pathogènes chez les populations infectées, et au même moment provoquer une descendance stérile par un système d'incompatibilité cytoplasmique (Hoffmann *et al.*, 2014).

I.2.6. Résistances aux insecticides chez les moustiques

Quatre types de mécanismes sont principalement impliqués dans la résistance aux insecticides : la résistance comportementale, la résistance à la pénétration, l'insensibilité du site cible, et la résistance métabolique (Figure 4). Parmi eux, les récentes études sur les deux dernières résistances sont plus avancées, détaillées et complètes.

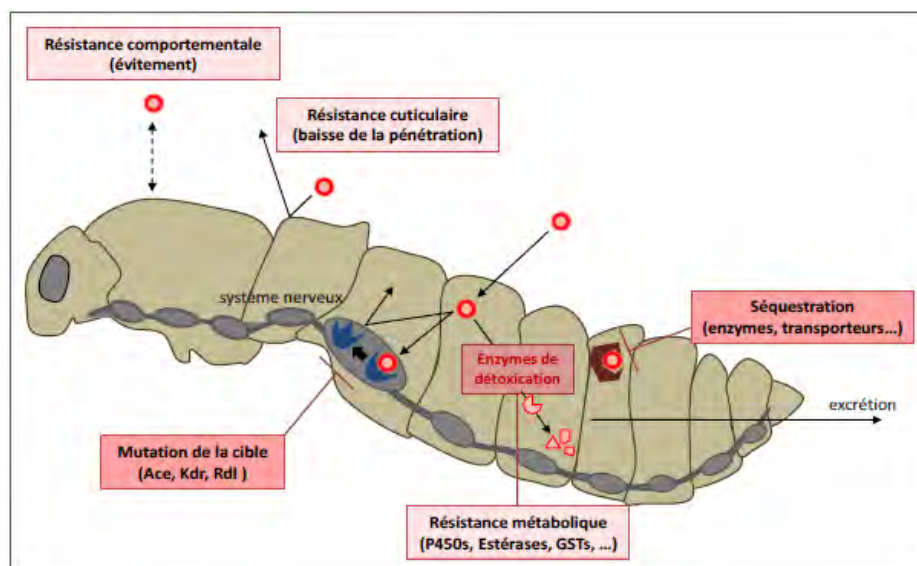


Figure 4: Principaux mécanismes de résistance aux insecticides chimiques

https://www.sciencesetavenir.fr/sante/les-moustiques-porteurs-de-virus-resistent-aux-insecticides_128410

Consulté le 22/07/2020

I.2.6.1. Résistance comportementale

L'évitement comportemental (dissuasion) est défini comme la capacité d'un moustique à s'éloigner (s'échapper) d'une zone traitée par un insecticide, souvent sans conséquence létale. Ce type de réponse peut être subdivisé en une excitation par contact direct « irritabilité de contact » et une « répulsion spatiale » sans contact. Le terme « irritabilité de contact » implique qu'un moustique quitte une zone traitée avec

un insecticide seulement après un contact physique, alors que la « répulsion spatiale » signifie que le moustique s'éloigne de la zone traitée sans contact direct (Grieco *et al.*, 2007).

I.2.6.2. Résistance cuticulaire

Pour réussir leur action insecticide, les molécules toxiques doivent tout d'abord traverser l'exosquelette du moustique, particulièrement la cuticule pour atteindre le site cible. Afin de survivre, les moustiques ont développé un mécanisme qui permet de réduire la pénétration du composé insecticide. Les résultats de Wood *et al* en 2010 ont montrés que les femelles *Anopheles funestus* tolérantes ou résistantes aux pyréthrinoides ont vraisemblablement des cuticules plus épaisses que les femelles moins tolérantes ou sensibles.

I.2.6.3. Résistance métabolique

Une fois en contact avec des molécules insecticides, trois familles majeures de gènes de détoxification métabolique sont activées et impliquées dans le processus de biodégradation, ce sont les cytochromes P450 mono-oxygénases, les carboxyle/cholinestérases, et les glutathion S-transférases (Hemingway *et al.*, 2004).

La résistance métabolique se développe par des altérations dans les niveaux des activités de détoxification enzymatique. Théoriquement, la résistance métabolique peut être d'une part la conséquence de super-expression d'une ou plusieurs enzymes de détoxification qui sont capables de métaboliser l'insecticide, et peut être d'autre part la cause de la sélection de variations en accélérant la vitesse de métabolisme des insecticides en raison de modifications conformationnelles (Li, Schuler, et Berenbaum, 2007).

I.2.6.4. Résistance par modification de la cible des insecticides

Les cibles principales d'insecticides sont les récepteurs ou enzymes du système nerveux : l'acétylcholinestérase (AChE), le canal sodique voltage-dépendant (CNaVdp) et le récepteur de c-aminobutyrique. La mutation de ces cibles est un mécanisme de résistance très efficace qui induit une résistance croisée à tous les insecticides agissant sur la même cible. La cible des organophosphorés et les carbamates est AChE. Les organochlorines du groupe des cyclodiènes agissent sur les récepteurs de l'acide c-aminobutyrique. Les pyréthrinoides et le DDT agissent sur le CNaVdp. Une mutation ponctuelle remplaçant la leucine par la phénylalanine au sixième segment du domaine II du gène CNaVdp (résistance Knock down (Kdr) mutation Leu-Phe) et une autre remplaçant la leucine par la serine à la même position (Kdr mutation Leu-serine) ont été décrites respectivement en Afrique de l'Ouest (Martinez-Torres *et al.*, 1998 ; Chandre *et al.*, 1999) et de l'Est (Ranson *et al.*, 2000).

CHAPITRE II : MATERIEL & METHODES

II.1. Cadre et site d'étude

Notre travail a été réalisé au Pôle de Microbiologie ex UBE (Unité de Bactériologie Expérimentale) de l'Institut Pasteur de Dakar (Sénégal). La préparation des intestins d'*Aedes aegypti formosus* a été réalisée dans ce même institut en collaboration avec le Pôle de Zoologie Médicale.

Les souches de moustiques qui ont servi à cette étude proviennent de la région de Kédougou. La région de Kédougou (12°33'28" Nord, 12°10'27" Ouest) est située à 702 Km de Dakar à l'extrême Sud-Est du Sénégal dans la zone soudano-guinéenne. Cette zone comprend des zones de forêts, des zones rurales, et parallèlement des moustiques vecteurs confinés à ces milieux. Cette région est connue comme une zone d'émergence de nombreux arbovirus d'intérêt médical incluant la Fièvre jaune, la Dengue, le Chikungunya et la fièvre Zika.



Figure 5: Site d'étude abritant les zones de capture des moustiques *Aedes aegypti formosus*

[https://fr.wikipedia.org/wiki/K%C3%A9dougou_\(r%C3%A9gion\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/K%C3%A9dougou_(r%C3%A9gion)) . consulté le 22/07/2020

II.2. Matériel

II.2.1. Matériel biologique

Cette étude a été réalisée sur sept (7) intestins individuels d'*Aedes aegypti formosus* femelles assoiffées provenant de différents sites. Parmi elles, six (6) sont d'origine urbaine et une (1) d'origine forestière. Ces intestins ont été placés dans des tubes nunc de 1,8 ml et nommés de la manière suivante (Tableau I).

Tableau I: Noms et lieux d'échantillonnage des intestins d'*Aedes aegypti formosus*

Noms des intestins individuels	Lieux d'échantillonnage
MG6 à MG9	Garage mécanique dans la ville de Kédougou
MG1et MG2	D1U (Bloc du domaine 1 en milieu urbain) correspond au Village de Ngari à 12km de la ville
MG1	D1F (Bloc du domaine 1 dans la forêt) correspond au faciès forêt situé à 10 km de la ville

MG = midgut en anglais qui signifie intestin moyen

II.2.2. Matériel d'identification bactérienne

Il comprend des ensemenceurs, du matériel et des consommables d'incubation (étuve, bac anaérobie ...), des milieux de cultures et enfin le matériel de protection du manipulateur comme les gants, blouse etc (Tableau II).

Les milieux de cultures utilisés au cours de ce travail (GCC, BCC, GN ... (annexe 2) étaient soit des milieux liquides, soit des milieux solides. La composition et le mode de préparation des milieux qui ont servi à notre étude sont rapportés en détail dans les annexes 2 et 8.

Tableau II: Liste du matériel pour l'étude du microbiote d'*Aedes aegypti formosus*.

Libellé du matériel	Libellé du matériel (suite)	Libellé du matériel (suite)
✓ Autoclave	✓ Alcool 95%	✓ Anse de platine
✓ Congélateur -80°	✓ Anse de platine	✓ Bandelettes oxydase
✓ Eau physiologique	✓ Liquide de lugol	✓ Bec de bunsen
✓ Embouts	✓ Microscope optique	✓ Gant L et M (non poudré)
✓ Étuve	✓ Peroxyde d'hydrogène	✓ Glycérol 25%
✓ Lames	✓ Pipette pasteur	✓ Huile de cèdre
✓ Micropipettes	✓ Solution de fuschine	✓ Milieux de culture
✓ Réfrigérateur +4°	✓ Tubes eppendorf	✓ Pipette pasteur
✓ Sachet générateur de CO2	✓ Tubes nunc	
	✓ Violet de gentiane	

II.3. Méthodes

II.3.1. Préparation des dilutions décimales

Après broyage de chaque intestin, des dilutions décimales de 10^{-1} jusqu'à 10^{-3} ont été effectuées dans des conditions aseptiques. Trois tubes stériles dans lesquels ont été pipeté aseptiquement 900 µl d'eau physiologique ont été préparés pour chaque intestin d'*Aedes aegypti formosus*. Après avoir homogénéisée soigneusement au vortex la suspension de départ (solution mère contenant l'intestin), 100 µl de cette dernière ont été prélevés à l'aide d'une pipette de 200 µl et ajoutés dans le premier tube de dilution (10^{-1}). Le contenu de ce tube 10^{-1} a été ensuite homogénéisé. Puis, 100 µl de ce dernier ont été ensemencé dans le tube 10^{-2} et ainsi de suite. Enfin 100 µl de chaque dilution sont étalés à l'aide d'un « étaloir » sur des boîtes de pétries contenant du GCC. Ces boîtes sont incubées en milieu aérobie pendant 72h à 37° (Figure 6 et 7).



Figure 6: Broyage des intestins



Figure 7: Préparation des dilutions

II.3.2. Isolement des bactéries

Une nouvelle nomenclature a été adoptée pour les colonies bactériennes obtenues à partir de chaque intestin. Exemple : la colonie bactérienne numéro 1 de l'intestin MG6G est nommée F₆G c₁ (F=*formosus*; G= garage; c₁= colonie numéro 1).

Pour chaque intestin 24 colonies bactériennes ont été sélectionnées à partir des boîtes de dilution puis ont été repiquées séparément sur milieu solide GCC à l'aide d'une anse de platine stérile. La gélose cœur-cerveille est un milieu riche qui convient à la culture d'une grande variété de microorganismes incluant les levures et les moisissures.

L'ensemencement se fait par stries en surface et les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C (Figure 8).



Figure 8: Gélose cœur cervelle

II.3.3. Purification des colonies bactériennes

C'est une étape très importante et très délicate, qui demande beaucoup de temps, puisqu'il s'agit d'un prélèvement qui abrite des milliers de microorganismes, et c'est de la pureté des cultures que va dépendre le reste du travail d'identification des bactéries.

Après le premier ensemencement sur boîte de Pétri, différentes colonies sont obtenues. Chaque colonie d'aspect différent est ensemencée à part sur un milieu de culture solide (GCC). Les boîtes ensemencées

sont incubées pendant 24h à 37°C. L'opération est répétée plusieurs fois jusqu'à l'obtention d'une colonie pure de chaque isolat.

II.3.4. Conservation des isolats bactériens

Pour la conservation de courte durée les souches bactériennes ainsi purifiées sont ensemencées sur milieu GCC puis placées au réfrigérateur à 4°C, pour quelques semaines (Spencer et Ragout de Spencer, 2001). Pour la conservation de longue durée, les souches sont mises en culture dans des tubes contenant le milieu de culture BCC (bouillon cœur cerveau) liquide pendant 24h. Ensuite 50µl de la suspension bactérienne de chaque tube et 50µl de glycérol 25% stérile sont transférés aux puits d'une plaque de 96 puits puis conservée à -80°C (Figure 9 et 10 ; annexe 7b).



Figure 10: Plaque de 96 puits contenant des bactéries aérobies



Figure 9: Congélateur -80°

II.4. Identification des isolats bactériens aérobies

L'identification est basée sur la détermination des caractères morphologiques et biochimiques (Lamouliatte *et al.*, 1992). Sur chacune des boîtes de dilution, nous avons classé les colonies en plusieurs catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, une colonie a été choisie aléatoirement pour réaliser les premiers tests d'orientation.

II.4.1. Examens microscopiques

II.4.1.1. Préparation d'une suspension bactérienne :

A partir d'une culture pure sur milieu GCC, nous avons prélevé à l'aide d'une pipette pasteur stérile 3 à 5 colonies bien isolées et parfaitement identiques. Puis nous avons déchargé ces colonies bactériennes dans 2ml d'eau physiologique stérile 0,9%. Ce mélange est enfin bien homogénéiser au vortex.

II.4.1.2. Coloration de gram des isolats bactériens

❖ Principe

Cette technique traditionnelle a pour but de déterminer l'aspect microscopique de la bactérie et la nature de sa paroi (Gram+ ou Gram-). Elle permet de déterminer également leur mode de regroupement et leur morphologie (cocci, bacille, coccobacille).

Préparation d'un frottis

❖ Principe

Il permet de fixer les bactéries étudiées sur une lame afin de les colorer. Sur un frottis, les bactéries sont donc mortes.

❖ Technique

- Déposer sur une lame propre une goutte d'eau stérile.
- Prélever à l'aide de l'anse de platine une colonie bactérienne.
- Mélanger afin d'obtenir une suspension homogène.
- Réaliser le frottis en partant du centre de la lame en décrivant avec l'anse des mouvements circulaires se façon à obtenir un étalement.

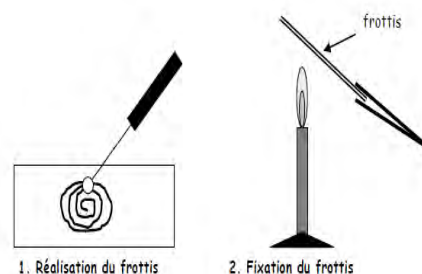


Figure 11: Préparation d'un frottis

http://stl.bgb.liberte.free.fr/microbio_fiches/frottis1.pdf.
consulté le 23/07/2020

- Sécher et fixer le frottis au-dessus de la flamme du bec bunsen (Figure 11).

La coloration

- Réaliser une coloration simple au violet de Gentiane, laissé agir pendant 1 min, rincer à l'eau.
- Ajouter le lugol et laisser agir pendant 1min puis rincer à l'eau courante.
- Laver à l'alcool 95° ; rincer à l'eau.
- Recolorer avec la fuchsine, laissé agir pendant 30 secondes ensuite rincer à l'eau puis sécher.
- Observer au microscope à immersion après avoir déposé une goutte de l'huile de cèdre au centre de la lame(x100) (Guillaume, 2004).

Lecture : Coloration en violet → Gram positif ; Coloration en rose → Gram négatif (annexe 3).

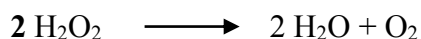
II.5. Identification biochimique des isolats bactériens provenant d'intestins d'*Ae.ae.formosus*

II.5.1. Tests d'orientation pour la galerie biochimique

II.5.1.1. Test Catalase

❖ Principe

La catalase est une enzyme respiratoire capable de dégrader l'eau oxygénée (H₂O₂) en eau et O₂ selon la réaction suivante :



❖ Technique

Sur une lame et à l'aide d'une pipette pasteur, nous déposons une colonie bactérienne à laquelle nous ajoutons de l'eau oxygénée H₂O₂ (à 10 volumes). La présence d'une catalase est révélée par l'apparition immédiate de bulles de gaz qui correspondent à l'oxygène dégagé (Tortora *et al.*, 2003).

II.5.1.2. Test oxydase

Il permet de différencier dans le grand groupe des bacilles à Gram négatif, la famille des entérobactéries de celles des Pseudomonaceae et des Vibrionaceae (Niang, 2003).

❖ Principe

Certains groupes de bactéries possèdent, dans leur chaîne respiratoire, le cytochrome C et l'enzyme cytochrome oxydase. Le test oxydase est un test sous forme de bandelettes de papier imprégnées avec du N,N,N',N'- tetraméthyl-p-phénylènediamine dihydrochloride. Le cytochrome oxydase oxydant le cytochrome C va ensuite oxyder le réactif, entraînant l'apparition d'un produit coloré bleu/violet (annexe 3b).

❖ Technique

1. Déposer la colonie à tester à la surface de la bandelette en utilisant une pipette pasteur en verre stérile. Disperser la colonie à la surface de la bandelette.
2. Observer la bandelette au bout de 15 secondes.
3. Le développement d'une coloration bleue/violet indique une réaction positive.

II.5.2. Tests biochimiques

II.5.2.1. Gélose Chapman

La gélose de Chapman au mannitol permet l'isolement sélectif, la recherche et le dénombrement des staphylocoques pathogènes dans le lait, les produits carnés, les produits de la mer, les autres produits alimentaires, les produits pharmaceutiques, les produits cosmétiques et les prélèvements biologiques d'origine animale. La forte concentration en chlorure de sodium inhibe la croissance de la plupart des bactéries autres que les staphylocoques. La fermentation du mannitol, mise en évidence par le virage au jaune de l'indicateur pH (rouge de phénol), permet d'orienter le diagnostic (annexe 3c). La mise en évidence des staphylocoques pathogènes devra être confirmée par la recherche de la coagulase et, éventuellement, de la désoxyribonucléase (Chapman, 1945, 1948).

II.5.2.2. Recherche de la désoxyribonucléase

La gélose à l'acide désoxyribonucléique (A.D.N.) est un milieu destiné à la mise en évidence de la désoxyribonucléase des bactéries (principalement celle des staphylocoques).

Les bactéries possédant une désoxyribonucléase hydrolysent l'A.D.N ce qui se traduit par l'apparition d'un halo clair autour des colonies.

❖ **Ensemencement :**

A partir d'une culture pure et fraîche, prélever les colonies suspectes et les ensemercer à la surface de la boîte en strie unique de 2 cm de longueur ou en plages de 1 cm de diamètre. Les boîtes sont ensuite incubées pendant 24 heures à 37°C (annexe 3c).

Lecture : Les boîtes sont inondées avec une solution d'acide chlorhydrique normale ou avec une solution à 0,1 % de bleu de toluidine. Dans les 5 minutes qui suivent, différents aspects peuvent être notés :

❖ **Révélation à l'acide chlorhydrique :**

- Zone claire autour de la strie, le reste de la boîte reste opaque : la souche est DNase (+).
- Absence de zone claire autour de la strie : la souche est DNase (-) (Blair *et al.*, 1967 ; Smith *et al.*, 1969).

II.5.2.3. Milieu Baird Parker (BP)

Le principe repose sur l'aptitude des staphylocoques à coagulase positive à réduire le tellurite (colonies grises à noir) (Sawhney, 1986) (annexe 3c).

II.5.2.4. Recherche de la coagulase

La production de la coagulase libre par *Staphylococcus aureus* provoque une coagulation du plasma qui se traduit par la formation d'un caillot de coagulation (Joffin et Leyral, 2014).

❖ **Technique**

Une culture de la souche à tester au bouillon cœur-cerveille (BCC) a été réalisé et l'incuber pendant 24h à 37°C. Ensuite 0,5ml de plasma de lapin a été ajouté dans le tube contenant la culture. Le tube est enfin incubé à 37° pendant 24h. Un résultat positif se traduit par la formation d'un caillot (plasma coagulé).

II.5.2.5. Fermentation des sucres, production du sulfure d'hydrogène et de gaz

Le milieu Kligler-Hajna est un milieu de culture permettant la recherche simultanée de la fermentation du glucose, du lactose; la production du sulfure d'hydrogène (H₂S) et la production de gaz. La fermentation du glucose par la bactérie est mise en évidence par le virage du culot du rouge au jaune tandis le virage de la pente au jaune indique la fermentation du lactose. Par ailleurs, la production de sulfure d'hydrogène est mise en évidence par une coloration noire dans le culot et la présence de bulles d'air ou le décollement du culot indique la production de gaz (Avril *et al.*, 2000).

❖ **Technique**

Il s'agit ensemercer abondamment la surface par stries serrées ou par inondation, puis le culot par simple piqure, à l'aide de la même pipette boutonnée (pipette Pasteur). Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement la capsule (le bouchon) afin de permettre les échanges gazeux. Les tubes sont enfin incubés pendant 24h à 37°C (annexe 3g).

II.5.2.6. Utilisation du Citrate de Simmons

L'utilisation du Citrate de Simmons (CS) comme seule source de carbone par les bactéries se traduit par une alcalinisation du milieu qui correspond au virage de l'indicateur colore du vert au bleu (Avril *et al.*, 2000).

Le milieu est présenté sous forme de gélose inclinée. La pente estensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture bactérienne.

Après incubation pendant 24 heures à 37°C, on procède comme suit pour la lecture:

- Virage de l'indicateur de pH au bleu : il y a eu alcalinisation du milieu et la souche est citrate de Simmons +.
- Pas de virage de l'indicateur de pH : il n'y a pas eu alcalinisation et le milieu ne présente pas de culture. La souche est citrate de Simmons – (annexe 3g).

II.5.2.7. Milieu Clark et Lubs

Ce milieu permet l'étude de la voie de fermentation du glucose (tests RM et VP). L'étude de cette voie permet de différencier les bactéries de la famille des Enterobacteriaceae (bacilles Gram -, oxydase -) (Sabrina, 2020).

Le bouillon Clark et Lubs est inoculé par une goutte d'une suspension trouble de bactéries. Après 24h à 37°C, on divise le bouillon dans 2 tubes stériles. Chaque tube sert à révéler une des 2 voies :

- Voie des Acides mixtes : Addition d'une goutte de rouge de méthyl (test au RM)
- Voie Butylène-Glycolique : Addition de 2 gouttes de KOH à 10% et d'Alpha-naphtol (réaction de Voges-Proskauer) (annexe 3g).

- **Test RM** (rouge de méthyle)

Ce test permet la mise en évidence, grâce au rouge de méthyle, de la fermentation du glucose en acides mixtes par acidification d'un milieu glucosé.

- **Test VP** (Voges-Proskauer)

Ce test permet la mise en évidence de la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone) au cours de la fermentation butylène glycolique: en présence d'une base forte (soude ou potasse) et d' α -naphtol, l'acétoïne donne une coloration rouge en milieu très oxygéné (annexe 3e).

II.5.2.8. Production d'uréase, de tryptophane désaminase et d'indole

Les bactéries possédant une uréase active scindent l'urée en dioxyde de carbone et en ammoniacque.

Ceux-ci en se combinant donnent du carbonate d'ammonium. Le carbonate d'ammonium alcalinise le milieu, ce qui se traduit par le virage de l'indicateur colore de l'orange au rose (Avril *et al.*, 2000).

La culture est effectuée sur milieu urée- indole à partir d'une suspension de la souche à étudier et incubée par la suite 24-48h à 37°C. La coloration rouge traduit une alcalinisation du milieu, suite à l'hydrolyse de l'urée et formation de carbonate d'ammonium (uréase+). Après le test de présence d'uréase, nous procédons à la lecture de l'indole sur le même tube.

L'indole produit est révélé par des réactifs, le plus utilisé est le réactif de Kovacs. La culture est additionnée de réactif de Kovacs (contenant le diméthyl-amino-4-benzaldéhyde qui réagit avec l'indole); si la bactérie est indole (+), un anneau rouge apparaît à la surface du milieu ; si au contraire elle est indole (-), il y a un anneau jaune ou le milieu demeure inchangée. La présence de tryptophane désaminase (TDA) est mise en évidence par addition de perchlorure de fer qui provoque une coloration brun rouge du milieu en cas de réaction positive (annexe 3d).

II.5.2.9. Mannitol-Mobilité

Ce milieu permet de tester la capacité de la fermentation du mannitol (caractère biochimique) et la mobilité de la souche (caractère morphologique). Ce milieu est utilisable uniquement pour les bactéries fermentatives. La présence d'une faible teneur d'agar (gélose molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale (le milieu estensemencé à l'aide d'un fil de platine ou une pipette Pasteur à bout fermée et incubé à 37°C pendant 18-24 heures). La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol (annexe 3h). L'utilisation du mannitol acidifie le milieu ce qui se traduit par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune) (Sabrina, 2020).

II.5.2.10. Recherche de la pyocyanine et de la pyoverdine

- La pyocyanine est un pigment caractéristique de *Pseudomonas aeruginosa* responsable de la teinte bleue des milieux de culture : sa production est favorisée sur milieu de King A.
- La pyoverdine présente une teinte vert fluorescent (*P. fluorescent*) souvent masquée par la pyocyanine, sa production est maximale sur milieu de King B.

- **Mode opératoire**

A l'aide d'une anse de platine nous avonsensemencé la surface d'un milieu de culture King A ensuite un milieu de culture King B et on incube les milieux à 37°C pendant 24h (annexe 3f).

Chapitre III : RÉSULTATS ET DISCUSSION

III.1. Résultats

III.1.1. Dénombrement des colonies bactériennes sur les boîtes de dilutions

Tableau III: Colonies bactériennes provenant des intestins individuels d'*Aedes aegypti formosus* après incubation à 37°C pendant 72h.

Intestins	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³
MG6G	+++	42	5
MG7G	+++	+++	4
MG8G	+++	+++	8
MG9G	32	5	4
MG1D1U	26	3	0
MG2D1U	19	10	3
MG1D1F	+++	12	0

NB : la notation +++ signifie que la boîte contient des colonies impossible à dénombrer.

Une forte présence de colonies bactériennes a été notée sur les boîtes de dilution 10⁻¹ et 10⁻² contrairement aux boîtes 10⁻³ ou nous avons une faible présence de ces colonies a été notée (Tableau III).

III.1.2. Identification morphologique des isolats bactériens

III.1.2.1. Isolement et purification

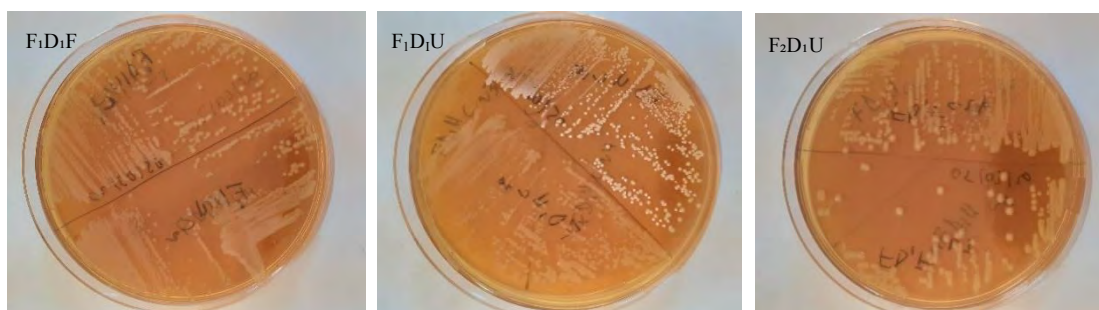


Figure 12: Résultats des isoléments de quelques colonies bactériennes sur milieu GCC

Cette figure montre certaines colonies bactériennes intestinales sur GCC des individus F₁D₁F, F₁DU et F₂D₁U après purification et incubation pendant 24h à 37°C.

Au total, les broyats des sept (7) intestins individuels d'*Aedes aegypti formosus* ont été utilisés. A partir de ces broyats, nous avons isolé en aérobiose 168 colonies bactériennes (24 pour chaque intestin). Ces dernières ont fait l'objet d'un test de Gram, de catalase, et d'oxydase. Les résultats issus de ces tests nous ont permis de choisir trente (30) colonies bactériennes représentatives qui ont fait l'objet de tests complémentaires (identifications biochimiques). Les 138 isolats bactériens aérobies restants n'ont pas pu être identifiés par méthode biochimique et ne sont pas présentés dans ce mémoire (Tableau IV).

Tableau IV: Isolats bactériens provenant d'intestins d'*Aedes aegypti formosus*

Espèce	Nombre de moustiques	Isolats bactériens aérobie	isolats identifiés	Isolats non identifiés
<i>Aedes aegypti formosus</i>	7	168	30	138

III.1.2.2. Coloration de gram

Tableau V : Morphologie et coloration de Gram des isolats bactériens d'intestins d'*Aedes.ae.formosus*

Phénotypes	F1D1U	F2D1U	F1D1F	FG6	FG7	FG8	FG9
Bacilles à Gram négatif	23 (95,8%)	24 (100%)	24 (100%)	24 (100%)	11 (45,8%)	21 (87,5%)	23 (95,8%)
Cocci à Gram positif	1 (4,2%)	0	0	0	12 (54,2%)	3 (12,5%)	1 (4,2%)

L'examen au microscope (100X) a montré deux formes de bactéries (coques et bâtonnets). Ils ont également révélé que les isolats bactériens intestinaux des individus (F₂D₁U, F₁D₁F, et FG₆), sont tous des bacilles Gram négatif. Pour les individus (F₁D₁U, FG₉ (95%) et FG₈ (87%)), presque la totalité des isolats bactériens intestinaux sont des bacilles à Gram négatif. Contrairement à l'individu FG₇ où plus de la moitié des isolats (54,2%) sont des cocci à Gram positif. Cette expérience a montré une forte présence de bactéries bacilles Gram- (90%) que bactéries cocci gram + sur l'ensemble des individus (Tableau V).

III.1.3. Tests biochimiques

III.1.3.1 Résultats test d'orientation

III.1.3.1.1. Test catalase

Tableau VI: Résultats des tests de catalase effectués sur les bactéries intestinales de chaque individu.

Phénotypes		F1D1U	F2D1U	F1D1F	FG6	FG7	FG8	FG9
Bacilles à Gram négatif	Catalase +	23 (95,8%)	24 (100%)	24 (100%)	24 (100%)	11 (45,8%)	21 (87,5%)	24 (95,8%)
	Catalase -	0	0	0	0	0	0	0
Cocci à Gram positif	Catalase +	1 (4,2%)		0	0	12 (54,2%)	3 (12,5%)	1 (4,2%)
	Catalase -	0	0	0	0	0	0	0

Ces résultats montrent que les bactéries (bacilles à Gram négatif et cocci à Gram positif) isolées à partir des sept intestins individuels de l'espèce d'*Ae.ae.formosus* sont toutes positives au test de catalase (Tableau VI).

III.1.3.1.2. Test oxydase

Tableau VII: Résultats des tests oxydases effectués sur les bactéries intestinales de chaque individu.

Phénotypes		F1D1U	F2D1U	F1D1F	FG6	FG7	FG8	FG9
Bacilles à Gram négatif	Oxydase +			4 (16,7%)	21 (87,5%)	10 (41,6%)	19 (79,2%)	
	Oxydase -	23 (95,8%)	24 (100%)	20 (83,3%)	3 (12,5%)	1 (4,2%)	2 (8,3%)	24 (95,8%)
Cocci à Gram positif	Oxydase +					2 (8,3%)	1 (4,2%)	
	Oxydase -	1 (4,2%)				11 (45,9%)	2 (8,3%)	1 (4,2%)

Ces résultats montrent que chez les individus F1D1U, F2D1U, et FG9 tous les isolats bactériens (bacilles à Gram- et cocci à Gram+) sont oxydase -.

Bacilles à Gram- : Chez les individus F1D1F, FG6, FG7 et FG8, on constate la présence à la fois de bacilles à Gram négatif oxydase + et de bacilles à Gram négatif oxydase- avec une prédominance des bactéries oxydase+ sauf chez l'individu F1D1F (83,3% oxydase- et 16,7% oxydase+) que de bactéries oxydase+ (Tableau VII).

Cocci à Gram + : On note aussi la présence en même temps de cocci à Gram + oxydase+ et de cocci à Gram+ oxydase – chez les individus FG7 et FG8 avec une prédominance des bactéries oxydase - .

III.1.4.1. Identification biochimique des isolats bactériens intestinaux d'*Aedes aegypti formosus*

Nous avons sélectionné trente (30) isolats bactériens intestinaux représentatifs pour identifier leurs espèces bactériennes correspondantes (annexe 3i).

Tableau VIII: Résultats de la galerie biochimique des cocci Gram + catalase + (annexe 3c)

	F1D1UC19	FG7C24	FG7C9	FG8C11	FG9C19
Couleur/GN	Jaune dorée	blanche	Jaune	blanche	blanche
DNase	+	-	-	-	-
BP	+	+	-	+	+
CHAPMAN	+	+	-	+	+
Coagulase	+	-		-	-
MANITOL	+	-	-	-	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Micrococcus spp</i>	<i>Staphylococcus spp</i>	<i>Staphylococcus spp</i>

+ : positif ; - : négatif

La totalité des cultures positives isolées sur milieu de Chapman et BP (spécifique pour *Staphylocoques*) répondent aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques du genre *Staphylococcus*. Au total

quatre (4) colonies bactériennes (F₁D₁UC₁₉, FG₇C₂₄, FG₈C₁₁ et FG₉C₁₉) appartenant au genre *Staphylococcus* ont été identifiées. Une (1) colonie (F₁D₁UC₁₉) pure a été assignée à l'espèce *Staphylococcus aureus* par la mise en évidence de la coagulase. Les trois souches restantes sont des *Staphylococcus spp* qui appartiennent aux espèces à coagulase négative. Les résultats obtenus sur la colonie bactérienne FG₇C₉ isolée de l'intestin de l'individu FG7 sont compatibles avec les caractères biochimiques de *Micrococcus spp* (Tableau VIII).

Tableau IX: Résultats tests biochimiques sur les bacilles Gram- catalase+ oxydase- des intestins individuels d'*Aedes aegypti formosus* (annexe 3)

	F ₁ D ₁ U C ₁	F ₁ D ₁ U C ₂	F ₂ D ₁ U C ₁	F ₂ D ₁ U C ₂	F ₁ D ₁ F C ₄	F ₁ D ₁ F C ₈	FG ₆ C ₇	FG ₆ C ₈	FG ₇ C ₆	FG ₈ C ₁₃	FG ₈ C ₁₄	FG ₉ C ₇	FG ₉ C ₈
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Escherichia vulneris</i>												

D'après la fiche d'identification des entérobactéries (annexe 6), les résultats des tests biochimiques effectués sur les isolats bactériens (bacilles Gram- oxydase -) de chaque intestin d'*Ae.ae.formosus* sont conformes aux caractères biochimiques d'*Escherichia vulneris* (Tableau IX).

Tableau X: Résultats des tests de galerie biochimique sur les bacilles gram- catalase+ oxydase+ intestinales des individus F₁D₁F, FG₆, FG₇ et FG₈ (annexe 3).

	F ₁ D ₁ F C ₅	F ₁ D ₁ F C ₆	F ₁ D ₁ F C ₇	FG ₆ C ₁	FG ₆ C ₂	FG ₆ C ₅	FG ₇ C ₃	FG ₇ C ₄	FG ₇ C ₁₂	FG ₈ C ₄	FG ₈ C ₁₉	FG ₈ C ₂₀
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RM	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAZ	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Man	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyov	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyoc	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	<i>Pseudomonas spp</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>										<i>Pseudomonas spp</i>

Les résultats d'identification biochimique obtenus montrent que les colonies bactériennes (bacilles gram-oxydase+) intestinales isolées à partir de ces quatre individus (F₁D₁F, FG₆, FG₇ et FG₈) appartiennent au genre *Pseudomonas*. L'espèce *Pseudomonas alcaligenes* est la plus abondante et occupe la première place avec 83,3%. Elle est présente chez tous les individus. Il s'en suit l'espèce *Pseudomonas spp* observée seulement chez les isolats F₁D₁U (C₅) et FG₈ (C₂₀) (Tableau X).

III.1.4.2. Le microbiote intestinal d'*Aedes aegypti formosus*.

L'examen du microbiote d'*Ae.ae.formosus* nous a permis d'analyser 168 colonies bactériennes isolées en aérobie. Nous avons pu identifier 30 colonies par méthode biochimique.

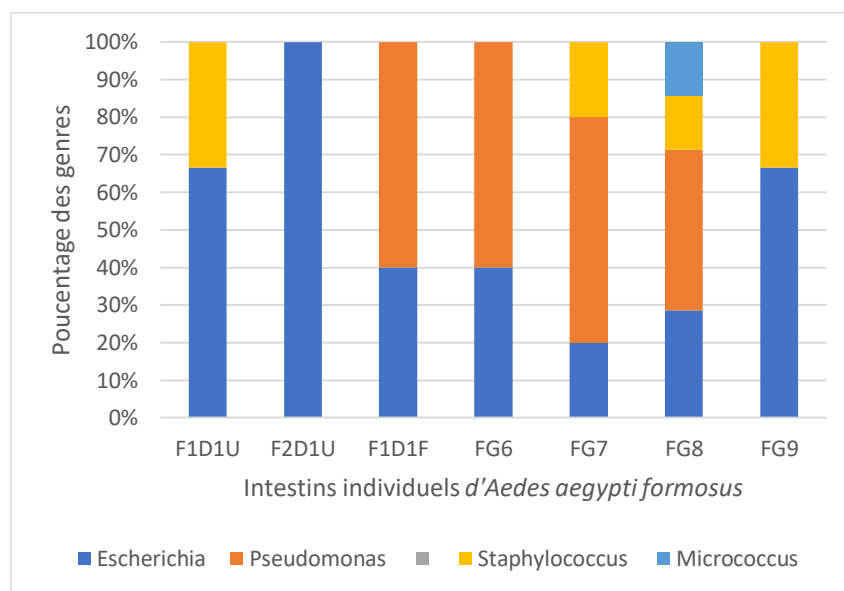


Figure 13: Analyse comparative du microbiote intestinal des individus d'*Aedes aegypti formosus*

Nous avons observé une variation et une diversité interindividuelle dans les communautés bactériennes d'une même zone géographique ou différente (Figure 13). Par exemple, dans le garage mécanique en milieu urbain un seul genre (*Escherichia*) comprend 66% des bactéries de l'intestin moyen chez l'individu FG9 et présente une faible prévalence (20%) chez l'individu FG7 de la même population. Un autre exemple est l'individu F2D1U (domaine 1 en milieu urbain), où toutes les bactéries appartiennent au genre *Escherichia* et seulement 28% dans FG8 (milieu urbain garage mécanique). La même tendance a été observée pour les autres genres. Mais une similitude des populations bactériennes entre deux individus vivant dans des zones différentes a été notée. C'est le cas de F1D1F (zone forêt) et FG6 (zone urbaine garage mécanique).

Tableau XI: Espèces bactériennes intestinales identifiées chez *Aedes aegypti formosus*.

Phylum	Classes	Espèces	Isolats identifiées	Pourcentage par classe
Actinobactéria	Actinobactéria	<i>Micrococcus spp</i>	1	3,4%
Firmicutes	Bacilli	<i>Staphylococcus aureus</i>	1	16,6%
		<i>Staphylococcus spp</i>	3	
Proteobacteria	Gamma- proteobacteria	<i>Escherichia vulneris</i>	13	80%
		<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	10	
		<i>Pseudomonas spp</i>	2	
Total des isolats Identifiées			30	

Au total, 6 espèces bactériennes différentes ont été identifiées dans l'intestin moyen d'*Aedes aegypti formosus* dont 3 espèces bactériennes du phylum Proteobacteria (50%), deux (2) espèces bactériennes différentes du phylum Firmicutes (33,3%). Les Protéobactéries étaient les plus fréquents dans *Ae.ae.formosus* suivi des Firmicutes. Le phylum le moins représenté était globalement les Actinobactéries (16,7%) représenté par une seule espèce bactérienne. Toutes les espèces bactériennes appartenant au phylum Proteobacteria se sont avérées être de la classe Gamma Proteobacteria. Parmi les isolats bactériens d'*Ae.ae.formosus*, *Escherichia vulneris* était l'espèce bactérienne la plus fréquemment isolée et était présente chez tous les individus d'*Ae.ae.formosus*, suivie de *Pseudomonas alcaligenes* (Tableau 11).

III.2. Discussion

Durant ce travail, nous avons isolé 168 colonies bactériennes de sept intestins individuels de moustiques *Ae.ae.formosus*. Ces moustiques ont été capturés par l'équipe du Pôle de Zoologie Médicale de l'IPD à Kédougou, une provenant d'une forêt, six en milieu urbain (quatre dans un garage mécanique et deux dans le domaine D1U). L'identification de 30 colonies bactériennes par des méthodes biochimiques a révélée six espèces dont *Micrococcus sp* (1), *Staphylococcus aureus* (1), *Staphylococcus spp* (3), *Escherichia vulneris* (13), *Pseudomonas alcaligenes* (10) et *Pseudomonas spp* (2). Ce projet est un travail exploratoire qui vise à mettre en place une méthode d'étude de la composition du microbiote intestinal d'*Aedes aegypti* et de son impact sur la transmission de virus pathogènes. La majorité des souches bactériennes isolées ne pouvaient être identifiées par l'approche biochimique utilisée ici. Des méthodes

d'identification plus robustes sont nécessaires pour retrouver les espèces du grand nombre de bactéries qui peuplent l'intestin de moustiques. Ces méthodes incluent la spectrométrie de masse et la métagénomique. La première est basée sur l'identification simultanée, par spectrométrie de masse, de centaines, voire de milliers de protéines provenant de bactéries cultivées, ce qui permet de remonter à l'espèce (Seng *et al.*, 2009). La seconde est basée sur le séquençage à haut débit de l'ADN et permet à partir des différents fragments d'identifier les espèces microbiennes qui composent un site écologique donnée (Garrido-Cardenas et Manzano-Agugliaro, 2017).

Il a été rapporté que les bactéries de l'intestin moyen des moustiques jouent un rôle important dans l'interaction vecteur-parasite (Dong *et al.*, 2009; Apte-Deshpande, 2014). Dans cette étude, nous nous sommes uniquement concentrés sur la caractérisation des bactéries aérobies intestinales d'*Ae. ae. formosus* dépendant de la culture, car seules les bactéries cultivables peuvent être utilisées pour d'autres applications dans la gestion de la transmission de maladies telles que la paratransgénèse.

Nous avons comparé la diversité, la composition et l'abondance relative des bactéries de l'intestin moyen au sein de ces populations de moustiques. Tous les genres bactériens identifiés avaient déjà été signalés dans l'intestin moyen de ce moustique ainsi que dans d'autres espèces. Les genres bactériens *Escherichia*, *Pseudomonas*, *Staphylococcus* et *Micrococcus* ont été isolés dans l'intestin moyen de *Aedes* et ces espèces ont été retrouvées dans d'autres études (Yadav *et al.*, 2015 ; Scolari *et al.*, 2019). Certaines espèces de bactéries sont étroitement associées à l'environnement intestinal des moustiques et aux habitats communs de *Aedes* ainsi qu'à d'autres espèces de moustiques (Chandel *et al.*, 2013). Il a été rapporté que, dans l'intestin moyen du moustique, les bactéries sont principalement acquises soit par héritage vertical, soit par acquisition dans l'environnement (Moro *et al.*, 2013). À partir de ces résultats, nous avons observé que chez les moustiques, la plupart des espèces bactériennes que nous avons identifiées appartenaient aux familles Enterobacteriaceae et Pseudomonaceae ce qui était cohérent avec d'autres études (Charan *et al.*, 2013 ; Scolari *et al.*, 2019).

Les données biochimiques ont montré une diversité similaire du microbiote de l'intestin moyen parmi les populations de moustiques (F1D1F et FG6) collectées dans divers endroits. Ce résultat n'est pas surprenant, car d'autres études ont montré que le microbiote d'*Ae. aegypti* de différents emplacements géographiques (Bennett *et al.*, 2019 ; Dickson *et al.*, 2018) ou souches (Coatsworth *et al.*, 2018; Court *et al.*, 2017) étaient très similaires. Certains auteurs ont proposé que la similitude des communautés bactériennes puisse être due aux conditions dans lesquelles les moustiques sont élevés (colonisation en

laboratoire ou collectés sur le terrain), ce qui suggère que des facteurs environnementaux ou d'hôtes pourraient façonner la structure de la communauté microbienne des moustiques (Boissière *et al.*, 2012; Coon *et al.*, 2014; Dickson *et al.*, 2018; Scolari *et al.*, 2019). Par conséquent, la raison de la similitude des communautés bactériennes parmi *Ae. aegypti* n'est pas encore claire (Scolari *et al.*, 2019).

L'origine géographique ne semble pas déterminer la diversité bactérienne et la variation interindividuelle de nos populations. Exemple : le genre *Escherichia* représente respectivement 66% et 20% des bactéries de l'intestin moyen chez l'individu FG9 et FG7 collectés dans une même zone (milieu urbain garage mécanique). Alors que chez les individus F1D1F (zone forêt) et FG6 (zone urbaine garage mécanique) ce genre présente la même proportion (40%). Des études portant sur *Ae. aegypti* adultes et larves ont démontré que la diversité bactérienne n'était pas affectée par la zone géographique et les caractéristiques de l'habitat larvaire telles que la température de l'eau et le pH, en accord avec nos observations (Cortés *et al.*, 2020). Il est possible que d'autres facteurs, y compris les interactions microbiennes, le génotype des moustiques et les voies métaboliques des acides aminés, puissent façonner les communautés microbiologiques des moustiques (Court *et al.*, 2017; Hegde *et al.*, 2018; Scolari *et al.*, 2019; Bennett *et al.*, 2019). La présence d'*Escherichia vulneris* dans chaque intestin quel que soit l'emplacement géographique montre que cette bactérie est associée au microbiote d'*Ae. ae. formosus* de façon stable. *Escherichia vulneris* est un organisme environnemental récemment identifié qui peut coloniser les humains et les animaux. Chez l'homme, elle peut coloniser les voies respiratoires, les voies génitales féminines, les voies urinaires et le tube digestif. Cependant, son association avec les blessures la conduit à être nommée «vulneris». Ces infections comprennent la bactériémie d'un cathéter intraveineux infecté, l'ostéomyélite d'un corps étranger, la septicémie urinaire et la méningite (Senanayake *et al.*, 2006). Elle présentait la plus forte parenté avec les genres *Escherichia* et *Enterobacter* (Brenner *et al.*, 1982).

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Cette étude nous a permis d'avoir un aperçu sur la composition du microbiote d'*Aedes aegypti formosus* (vecteur de la Dengue du Chukungunya de la Fièvre jaune et du Zika) dans la région de Kédougou. A notre connaissance, c'est la première tentative d'étude du microbiote de l'intestin moyen d'*Ae.ae.formosus* au Sénégal. Nos données fournissent une base de référence pour de futures études sur le microbiote, qui devraient se concentrer sur les bactéries impliquées dans les processus de la compétence vectorielle. Cette collection est d'une grande importance, car à l'heure où nous observons l'apparition de résistance des moustiques aux insecticides, elle nous offre les possibilités d'utiliser la lutte biologique comme alternative pour combattre les arbovirus dont le vecteur est *Ae.ae.formosus* dans notre pays. *Escherichia vulneris* est une bactérie répandue chez les populations bactériennes d'*Ae.ae.formosus* en milieu naturel. Sa forte prévalence suggère que cette bactérie est associée au microbiote d'*Ae.ae.formosus* de façon stable. Sa présence semble offrir les possibilités intéressantes de lutte contre ce vecteur.

En perspectives, les résultats obtenus restent préliminaires et méritent d'être approfondis et complétés par : l'identification des autres colonies bactériennes qui ont été répertoriées dont les espèces n'ont pas été identifiées et diversifier les zones de collectes dans la région de Kédougou pour bien apprécier la diversité de ces bactéries. L'étude d'un grand nombre d'individus de l'espèce d'*Aedes aegypti formosus* dans les différents stades de développement. Ceci nous permettra de renforcer notre collection de bactéries. Ensuite, confirmer l'identification des souches bactériennes par séquençage et caractérisation moléculaire (PCR et séquençage). Puis, étudier la résistance aux antibiotiques des espèces bactériennes. Enfin, étudier les variations du microbiote d'*Ae.ae.formosus* des stades larvaires aux stades adultes.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Apte-Deshpande, A., Paingankar, M.S., Gokhale, M.D., Deobagkar, D.N. (2014). Augmentation médiée par *Serratia odorifera* de la sensibilité d'*Aedes aegypti* au virus chikungunya. *Indian J Med Res*, 139, 762–8.
2. Avril, J.L., Dabernat, H., Denis, F., Monteil, H. (2000). Bactériologie clinique. *Ellipses 2ième édition, Paris, France*, 602 p.
3. Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., Kaiser, A. (2010). Mosquitoes and their control. *2nd Edition, Springer*, 28, 246p.
4. Bennett, K.L., Gómez-Martínez, C., Chin, Y., Saltonstall, K., McMillan, A.D.J., Rovira, J.R., Loaiza, J.R. (2019). Dynamique et diversité des bactéries associées aux vecteurs de maladies *Aedes aegypti* et *Aedes albopictus*. *Sci, Rep*, 9, 12160.
5. Bernáth, B., Horváth, G., Gál, J., Fekete, G., and Meyer-Rochow, V.B. (2008). “Polarized Light and Oviposition Site Selection in the Yellow Fever Mosquito: No Evidence for Positive Polarotaxis in *Aedes aegypti*.” *Vision Research*, 48 (13): 1449–55.
6. Bhatt, S., Gething, P.W., Brady, O.J., Messina, J.P., Farlow, A.W., Moyes, C.L. (2013) The global distribution and burden of dengue. *Nature*. 496(7446), 504–7.
7. Blair, E.B., Emerson, J.J., Tull, A.H. (1967). A new medium, salt mannitol plasma agar, for the isolation of *Staphylococcus aureus*. *Am. J. Clin. Path*, 47 : 30-39
8. Boissière, A., Tchioffo, M.T., Bachar, D., Abate, L., Marie, A., Nsango, S.E., Shahbazkia, H.R., Awono-Ambene, P.H., Levashina, E.A., Christen, R., et coll. (2012). Microbiote intestinal du moustique vecteur du paludisme *Anopheles gambiae* et interactions avec l'infection à *Plasmodium falciparum*. *PLoS Pathog*, 8, e1002742.
9. Brenner, D.J., McWhorter, C.A., Knutson, J.K.L., Steigerwalt, A.G. (1982). *Escherichia vulneris* : une nouvelle espèce d'entérobactérie associée à des plaies humaines. *J Clin Microbiol*, 15 (6) : 1133-1140
10. Breznak, J. A. and Brune A. (1994). "Role of microorganisms in the digestion of lignocellulose by termites." *Annual Review of Entomology*, 39(1): 453-487.
11. Brown, J.E., Evans, B.R., Zheng, W., Obas, V., Barrera-Martinez, L., Egizi, A., Zhao, H., Caccone, A., Powell, J.R. (2014). “Human Impacts Have Shaped Historical and Recent Evolution in *Aedes aegypti*, the Dengue and Yellow Fever Mosquito.” *International Journal of Organic Evolution*, 68 (2): 514–25.
12. Cazemier, A.E., Hackstein, J. H. P., Op den Camp, H. J. M., Rosenberg, J., van der Drift, C. (1997). "Bacteria in the intestinal tract of different species of arthropods." *Microb Ecol*, 33(3): 189-197.
13. Chandel, K., Mendki, M.J., Parikh, R.Y., Kulkarni, G., Tikar, S.N., Sukumaran, D. (2013). Communauté microbienne de l'intestin moyen de populations de moustiques *Culex quinquefasciatus* de l'Inde. *PLoS One*, 8: e80453.
14. Chandre, F., Darriet, F., Manguin, S., Brengues, C., Carnevale, P., (1999). Pyrethroid cross resistance spectrum among populations of *Anopheles gambiae* s.s. from Côte d'Ivoire. *Journal of the American Mosquito Control Association*, 15(1) : 53-59.

15. Chapman, G.H., (1948). An improved Stone medium for the isolation and testing of food poisoning *Staphylococci*. *Food Research*, 13: 100-105.
16. Chapman, G.H., 1945. The significance of sodium chloride in studies of *Staphylococci*. *J. Bacteriol*, 50: 201.
17. Charan, S.S., Pawar, K.D., Severson, D.W., Patole, M.S., Shouche, Y.S. (2013). Comparative analysis of midgut bacterial communities of *Aedes aegypti* mosquito strains varying in vector competence to dengue virus. *Parasitol Res*, 112(7):2627-37.
18. Cho, I. and Blaser, M. J. (2012). "The human microbiome: at the interface of health and disease." *Nat Rev Genet*, 13(4): 260-270.
19. Cirimotich, C.M., Ramirez, J.L., Dimopoulos, G. (2011). Native microbiota shape insect vector competence for human pathogens. *Cell Host Microbe*, 10(4):307–10.
20. Coatsworth, H., Caicedo, P.A., Van Rossum, T., Ocampo, C.B., Lowenberger, C. (2018). The Composition of Midgut Bacteria in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) That Are Naturally Susceptible or Refractory to Dengue Viruses. *J. Insect Sci*, 18(6): 12; 1–7.
21. Coon, K.L., Vogel, K.J., Brown, M.R., Strand, M.R. (2014). Mosquitoes dépendent de leur microbiote intestinal pour se développer. *Mol. Ecol*, 23, 2727-2739.
22. Court, S.M, Mongodin, E.F, MacLeod, H.J, Talyuli, O.A.C, Dimopoulos, G., Olson, K.E. (2017). La signalisation métabolique des acides aminés influence la variabilité du microbiome de l'intestin moyen d'*Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis*, 11, e0005677.
23. Dickson, L.B, Ghazlane, A., Volant, S., Bouchier, C., Ma, L., Vega-Rúa, A., Dusfour, I., Jiolle, D., Paupy, C., Mayanja, M., et coll. (2018). Diverses colonies de laboratoire d'*Aedes aegypti* abritent le même microbiome bactérien de l'intestin moyen adulte. *Parasit. Vecteurs*, 11, 207.
24. Dong, Y., Manfredini, F., Dimopoulos, G. (2009). Implication du microbiote de l'intestin moyen des moustiques dans la défense contre les parasites du paludisme. *PLoS Pathog*, 5: e1000423.
25. Engel, P. and Moran N. A. (2013). "The gut microbiota of insects - diversity in structure and function." *FEMS Microbiol Rev*, 37(5): 699-735.
26. Failloux, A.B., (2018). Les moustiques vecteurs d'arbovirus : une histoire sans fin. *Biologie Aujourd'hui*, 212 (3-4), 89-99.
27. Spencer, J. F. T. and Ragout de Spencer, A.L. (2001). Food Microbiology Protocols. *Totowa New jersey Argentine*, 14 : 163-171.
28. Garrido-Cardenas, J.A and Manzano-Agugliaro F. (2017). The metagenomic worldwide research. *Current Genetics*, 63(5):819-829.
29. Gratz, N.G., Steffen, R., Cocksedge, W. (2000). Pourquoi la désinsectisation des avions?. Bulletin de l'Organisation Mondiale de la Santé : *Le Journal de la Santé Publique*, 78 (8) : 995-1004.
30. Grieco, J.P., Achee, N.L., Chareonviriyaphap, T., Suwonkerd, W., Chauhan, K, Sardelis, M.R., Roberts, D.R. (2007). "A New Classification System for the Actions of IRS Chemicals Traditionally Used For Malaria Control." *PLoS ONE*, 2 (8) : e716.

31. Guillaume P. Y. (2004). Les tests en microbiologie.
<http://py.guillaume1.free.fr/pierreyves/site%20microbiologie/page%20les%20milieux%20de%20culture/Tests/O129.htm> consulté le 19/03/2020
32. Harrington, L.C., Fleisher, A., Ruiz-Moreno, D., Vermeylen F., Wa, C.V., Poulson, R.L., Edman, J.D., et al. (2014). "Heterogeneous Feeding Patterns of the Dengue Vector, *Aedes aegypti*, on Individual Human Hosts in Rural Thailand." *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 8 (8) : e3048.
33. Hegde, S., Rasgon, J.L., Hughes, G.L. (2015). The microbiome modulates arbovirus transmission in mosquitoes. *Curr Opin Virol*, 15:97–102.
34. Hegde, S., Khanipov, K., Albayrak, L., Golovko, G., Pimenova, M., Saldaña, M.A., Rojas, M.M., Hornett, E.A., Motl, G.C., Fredregill, C.L., et coll. (2018). Réseaux d'interaction du microbiome et structure communautaire à partir de vecteurs de moustiques *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus* et *Culex quinquefasciatus* élevés en laboratoire et collectés sur le terrain. *De face. Microbiol*, 10;9:2160.
35. Hemingway, J., Hawkes, N.J., McCarroll, L., et al. (2004). The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochem. Mol. Biol*, 34:653–665.
36. Heu, K., et Gendrin M., (2018). Le microbiote de moustique et son influence sur la transmission vectorielle. *Biologie Aujourd'hui*, 212 (3-4), 119-136
37. Hoffmann, A.A., Iturbe-Ormaetxe, I., Callahan, A.G., Phillips, B.L., Billington, K., Axford, J.K., Montgomery, B., Turley, A.P., O'Neill, S.L. (2014). "Stability of the wMel *Wolbachia* Infection Following Invasion into *Aedes aegypti* Populations." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 8 (9).
38. Joffin, N.J., Leyral G., (2014). Microbiologie technique : Dictionnaire des techniques. Centre régional de documentation pédagogiques d'Aquitaine, 368p.
39. Kajla, M.K., (2020). Symbiotic Bacteria as Potential Agents for Mosquito Control. *Trend in Parasitology*, Vol. 36, No. 1
40. Kraemer, Moritz, U.G., Sinka, M.E., Duda, K.A., Mylne A.Q.N., Shearer, F.M., Barker C.M., Moore, C.G., et al. (2015). "The Global Distribution of the Arbovirus Vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*." *eLife*, 4 : e08347.
41. Kroeger, A., Boyce, R., Lenhart A., et al. (2013). *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti) for the control of dengue vectors: systematic literature review. *Trop. Med. Int. Health*, 18:564–577.
42. Lambrechts, L., Ferguson, N.M., Harris, E., Holmes, E.C., McGraw, E.A., O'Neill, S.L., et al. (2015). Assessing the epidemiological effect of *Wolbachia* for dengue control. *Lancet Infect Dis*, 15(7):862– 866.
43. Lamouliatte, H., Mégrand, F., et Cayla R., (1992). *Helicobacter pylori* et pathologie gastroduodénale. Encyclopédie Médico-chirurgicale. *Editions techniques. EMC*, 9021 E10 : 2-3.
44. Li, X.L., Schuler, M.A. et Berenbaum, M.R. (2007). Mécanismes moléculaires de la résistance métabolique aux xénobiotiques synthétiques et naturels. *Revue annuelle entomologie*, 52 (1) : 231-53.
45. Lounibos, L.P. (1981). "Habitat segregation among African tree hole mosquitoes". *Ecological Entomology*, Vol. 6, pp. 129-154.
46. Lounibos, L.P. (2002). Invasions par des insectes vecteurs de maladies humaines. *Revue Annuelle d'Entomologie*, vol.47 : 233-266.

47. Martinez-Torres, D., Chandre, F., Williamson, M.S., Darriet, F., Berge, J.B., Devonshire, A.L., Guillet, P., Pasteur, N., et Pauron, D. (1998). Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* s.s. *Insect molecular biology*, 7(2) : 179-184.
48. McClelland, G.A.H. (1974). "A worldwide survey of variation in scale pattern of the abdominal tergum of *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae)." *Transaction Royal Entomological Society London*, Vol. 126, pp. 239-259.
49. McGraw, E.A., O'Neill, S.L. (2013). Beyond insecticides: new thinking on an ancient problem. *Nat Rev Microbiol*, 11(3):181–93.
50. McLaughlin, L.A., Niazi, U., Bibby, J., David, J.P., Vontas, J., Hemingway, J., Paine, M.J.I. (2008). Characterization of inhibitors and substrates of *Anopheles gambiae* CYP6Z2. *Insect Mol Biol*, 17(2), 125–135.
51. Minard, G., Mavingui, P., Moro, C.V. (2013). Diversity and function of bacterial microbiota in the mosquito holobiont. *Parasit Vectors*, 6:146.
52. Mocellin, Goulart, M., Simões, T.C., Nascimento, T.F.S., Teixeira, M.L.F., Lounibos, L.P., and Oliveira, R.L. (2009). "Bromeliad-Inhabiting Mosquitoes in an Urban Botanical Garden of Dengue Endemic Rio de Janeiro. Are Bromeliads Productive Habitats for the Invasive Vectors *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus*?. *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz*, 104 (8): 1171–76.
53. Moore, M., Sylla, M., Goss, L., Burugu, M.W., Sang, R., Kamau, L.W., Black, W.C., Kenya, E.U., Bosio, C., Munoz, M.L., Sharakova, M. (2013). "Dual African origins of global *Aedes aegypti* s.l. populations revealed by mitochondrial DNA". *PLoS Neglected Tropical Diseases*, Vol. 7, No. 4: e2175.
54. Moro, C.V., Tran, F.H., Raharimalala, F.N., Ravelonandro, P., Mavingui, P. (2013). Diversité des bactéries cultivables, y compris *Pantoea*, chez le moustique sauvage *Aedes albopictus*. *BMC Microbiol*, 13: 70.
55. Moyes, C.L., Vontas, J., Martins, A.J., et al. (2017). Contemporary status of insecticide resistance in the major *Aedes* vectors of arboviruses infecting humans. *PLoS Negl. Trop. Dis*, 11: e0005625.
56. Niang, O. (2003). Validation d'une microméthode d'identification des bacilles à Gram négatif non fermentaires, Thèse de Pharmacie, Université Cheikh Anta DIOP, Dakar, Sénégal, 60p.
57. Powell, J.R. and W.J. Tabachnick. (2013). "History of domestication and spread of *Aedes aegypti* A review". *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Vol. 108, pp. 11-17.
58. Ranson, H., Jensen, B., Vulule, J.M., Wang, X., Heminway, J., et Collins, F.H., (2000). Identification of a point mutation in the voltage-gated sodium channel gene of kenyan *Anopheles gambiae* associated with resistance to DDT and pyrethroids. *Insect molecular biology*, 9(5) 491-497
59. Reiter, P. (2007). "Oviposition, Dispersal, and Survival in *Aedes Aegypti*: Implications for the Efficacy of Control Strategies." *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 7 (2): 261–73.
60. Sabrina, B. (2020). Manuel des Travaux Pratiques de Bactériologie, Université des Frères Mantouri, 56p
61. Sawhney, D. (1986). The toxicity of potassium tellurite to *Staphylococcus aureus* in rabbit plasma fibrinogen agar. *Journal of applied bacteriology*, 61 149-155

62. Scolari, F., Casiraghi, M., and Bonizzoni, M. (2019). *Aedes spp.* and Their Microbiota: A Review. *Front. Microbiol*, 10:2036.
63. Senanayake, S.N., Jadeer, A., Talaulikar, G.S. and Roy J. (2006). First Reported Case of Dialysis-Related Peritonitis Due to *Escherichia vulneris*. *Journal Of Clinical Microbiology*, Vol. 44, No. 11, p. 4283–4284
64. Seng, P., Drancourt, M., Gouriet, F., La Scola, B., Fournier, P.E., Rolain, J.M., Raoult, D. (2009). Ongoing revolution in bacteriology: routine identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry. *Clin Infect Dis*, 49:543–551.
65. Smith, P.B., Hancock, G.A., Rhoden, D.L. (1969). Food microbiology protocols. *Appl. Microbiol*, 18 : 991-994.
66. Tortora, G.J., Funk B.R., Case C.L. (2003). Introduction à la microbiologie. *Edition du Renouveau Pédagogique Inc*, Pp. 945.
67. Urdaneta-Marquez, L., and Failloux A.B. (2011). “Population Genetic Structure of *Aedes Aegypti*, the Principal Vector of Dengue Viruses.” *Infection, Genetics and Evolution*, 11 (2): 253–61.
68. Whiteside, S.A., Razvi H., Dave S., Reid G. and Burton J. P. (2015). "The microbiome of the urinary tract [mdash] a role beyond infection." *Nat Rev Urol*, 12(2): 81-90.
69. Wilder-Smith, A., Gubler, D.J., Weaver, S.C., Monath, T.P., Heymann, D.L., Scott, T.W. (2017). Epidemic arboviral diseases: priorities for research and public health. *Lancet Infect Dis*, 17(3):e101–e6.
70. Wood, Or., Hanrahan, S., Coetzee, M., Koekemoer, L., and Brooke, B. (2010). “Cuticle Thickening Associated with Pyrethroid Resistance in the Major Malaria Vector *Anopheles Funestus*.” *Parasites & Vectors*, 3 (August): 67.
71. Yadav, K.K., Bora, A., Datta, S., Chandel, K., Gogoi, H.K., Prasad, G. B. K. S. and Veer, V. (2015). Molecular characterization of midgut microbiota of *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti* from Arunachal Pradesh, India. *Parasites & Vector*, 8:641
72. Zouache, K., Raharimalala, F.N., Raquin, V., Tran-Van, V., Raveloson, L.H., Ravelonandro, P., Mavingui, P. (2011). Bacterial diversity of field-caught mosquitoes, *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*, from different geographic regions of Madagascar. *FEMS Microbiol Ecol*, 75, 377-389

Wébographie :

<https://www.eidatlantique.eu/page.php?P=144>. Consulté le 18/07/2020

https://www.sciencesetavenir.fr/sante/les-moustiques-porteurs-de-virus-resistant-aux-insecticides_128410 Consulté le 22/07/2020

[https://fr.wikipedia.org/wiki/K%C3%A9dougou_\(r%C3%A9gion\)](https://fr.wikipedia.org/wiki/K%C3%A9dougou_(r%C3%A9gion)) . consulté le 22/07/2020

http://stl.bgb.liberte.free.fr/microbio_fiches/frottis1.pdf . consulté le 23/07/2020

<http://py.guillaume1.free.fr/pierreyves/site%20microbiologie/page%20les%20milieux%20de%20culture/Tests/O129.htm> consulté le 19/03/2020

ANNEXES

Annexes 1 : Colorants

Fuschine de ziehl

- Fuchsine basique.....0.2g
- Alcool éthylique à 90°.....10g
- Phénol.....5g
- Eau distillée.....100ml

Lugol :

- Iode.....1g
- Iodure de potassium10g
- Eau distillée300ml

Violet de gentiane

- Violet de gentiane1g
- Ethanol à 90°10g
- Phénol.....2g
- Eau d.....100ml

Annexe 02 : Milieux de culture

Milieux de l'eau physiologie

- NaCl.....0,9g
- Eau distillée.....100ml

Préparation de jaune d'oeuf.

Dans un flacon stérile, récupérez le jaune d'œuf après avoir flambé la couille avec de l'alcool pendant 30 secondes- ensuite ajoutez 4fois le

volume en eau distillée stérile, mélangez rigoureusement puis mettre le mélange à l'étuve pendant 2 heures à 30°C ensuite au réfrigérateur pendant 24 heure.

Milieu pour le test de V-P :

- Peptone5g
- K_2HPO_45g
- Glucose à 10%.....50ml
- PHà7, 6

Milieu à base de gélatine

- Extrait de levure100g
- Gélatine.....10g
- Agar20g
- PHà7, 2

Milieu de citrate

- Citrate de sodium.....1.0g
- Bleu de bromothymol0.08g
- Chlorure de sodium.....5.0g
- Sulfate de magnésium.....0.2g
- Hydrogénophosphate de potassium.....1.0g
- Dihydrogénophosphate d'ammonium...1.0g
- Agar-agar.....15g
- PH à 6.9

Milieu GCC

Pour 1 litre de milieu de base :

- Extrait cœur-cervele 17,5 g
- Peptone pancréatique de gélatine..... 10,0 g
- Chlorure de sodium 5,0 g
- Phosphate disodique..... 2,5 g
- Glucose 2,0 g

- Agar agar bactériologique 15,0 g
pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,4 ± 0,2.

Milieu ADN

COMPOSITION (en g/l d'eau distillée)

Hydrolysate tryptique de caséine20
Acide désoxyribonucléique2
Chlorure de sodium5
Agar12
pH final : 7,3 ± 0,2

Milieu Chapman (g/l)

Extrait de viande :1g
Peptone10g
Chlorure de sodium :75g
Mannitol10g
Rouge de phénol0.025g
Agar- agar18g
L'eau distillée1000ml
pH=7.2

Milieu KH

Peptone.....20g
Extrait de viande de
bœuf.....3g
Extrait de levure 3g
Chlorure de sodium5g
Sulfate ferreux.....0,2g
Thiosulfate de sodium.....0,3g
Lactose.....10g
Glucose.....1g
Rouge de phénol 25g
Agar11g
Eau distillée.....1000ml

Milieu BP

Peptone.....10g
Extrait de
viande.....5g
Extrait de levure.....1g
Chlorure de
lithium.....5g
L-Glycine.....12g

Pyruvate de
sodium.....10g

Agar.....14g

Eau distillée.....1000ml

Milieu CL

Ingrédients en grammes pour un litre d'eau distillée ou déminéralisée.

Peptone7,00
Glucose5,00
Phosphate dipotassique5,00
pH final à 25°C : 7,0 ± 0,2

Milieu urée indole

COMPOSITION (en g/l d'eau distillée)

L-Tryptophane3
KH₂PO₄1
K₂HPO₄1
Chlorure de sodium5
Urée20
Alcool à 95°10 ml
Rouge de phénol0,05
pH final : 6,8 ± 0,2

King A

COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)

Peptone20
Agar purifié12
K₂SO₄ (anhydre)10
MgCl₂ (anhydre)1,4

King B

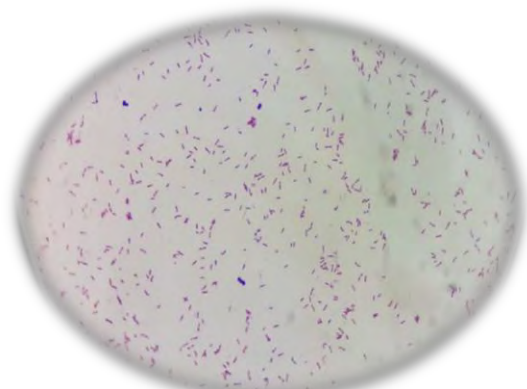
COMPOSITION THEORIQUE (en g/l d'eau distillée)

Peptone20
Agar purifié12
K₂HPO₄ (anhydre)1,5
MgSO₄ · 7 H₂O (anhydre)1,5

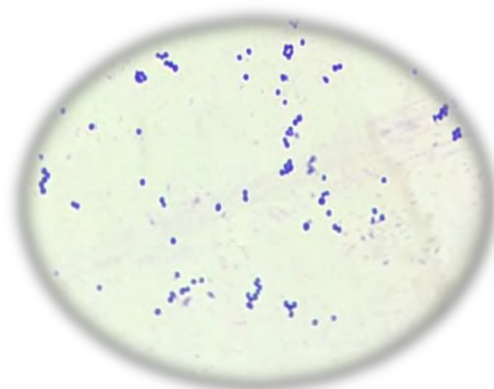
Réactifs

- α-naphtol : réactif pour la réaction de vosges –proskauer
- Naphtol6g
- Alcool éthylique à 60°100ml

Annexe 3 : Résultats des identifications microscopiques et biochimiques des isolats bactériens d'*Ae.ae.formosus*.

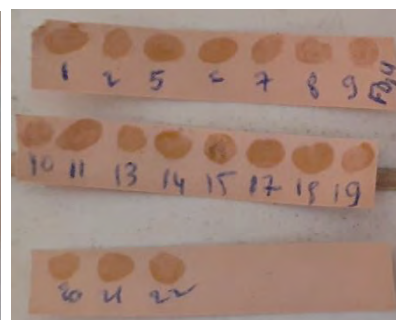
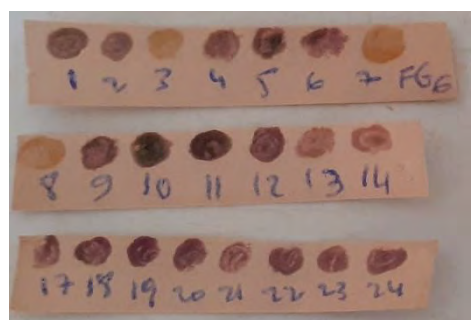


Bacilles Gram-

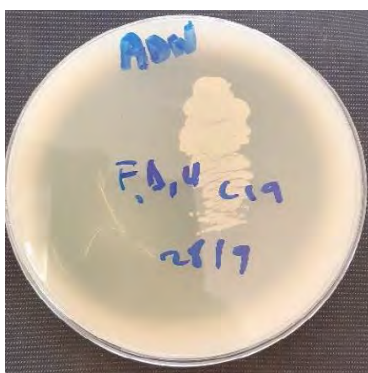


Coccis Gram+

a. Coloration de Gram sous le microscope photonique, (100X).



b. Résultats des tests oxydases sur les bandelettes : jaune = oxydase – ; Violet = oxydase +



Milieu Chapman



Milieu BP

c. Identification biochimique des coccis catalase +



d. Test urée indole et TDA



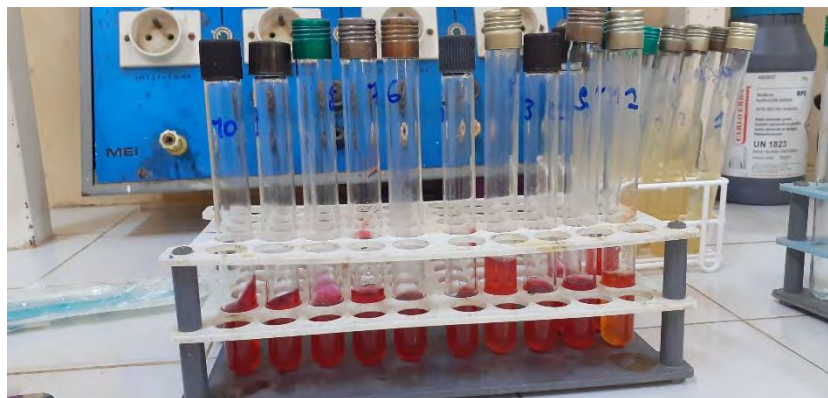
e. Test RM et VP



f. Test sur King A et King B



g. Test sur KH et CS



h. Résultat de test mannitol mobilité

i. Résultats des tests sur lesquels nous nous sommes basés pour faire la sélection des 30 colonies bactériennes pour la galerie biochimique.

F1D1F			
Colonies	Gram	catalases	Oxydases
C1	B-	+	-
C2	B-	+	-
C3	B-	+	-
C4	B-	+	-
C5	B-	+	+
C6	B-	+	+
C7	B-	+	+
C8	B-	+	-
C9	B-	+	+
C10	B-	+	-
C11	B-	+	-
C12	B-	+	-
C13	B-	+	-
C14	B-	+	-
C15	B-	+	-
C16	B-	+	-
C17	B-	+	-
C18	B-	+	-
C19	B-	+	-
C20	B-	+	-
C21	B-	+	-
C22	B-	+	-
C23	B-	+	-
C24	B-	+	-

F2D1U			
Colonies	Gram	catalases	Oxydases
C1	B-	+	-
C2	B-	+	-
C3	B-	+	-
C4	B-	+	-
C5	B-	+	-
C6	B-	+	-
C7	B-	+	-
C8	B-	+	-
C9	B-	+	-
C10	B-	+	-
C11	B-	+	-
C12	B-	+	-
C13	B-	+	-
C14	B-	+	-
C15	B-	+	-
C16	B-	+	-
C17	B-	+	-
C18	B-	+	-
C19	B-	+	-
C20	B-	+	-
C21	B-	+	-
C22	B-	+	-
C23	B-	+	-
C24	B-	+	-

F1D1U			
Colonies	Gram	catalases	Oxydases
C1	B-	+	-
C2	B-	+	-
C3	B-	+	-
C4	B-	+	-
C5	B-	+	-
C6	B-	+	-
C7	B-	+	-
C8	B-	+	-
C9	B-	+	-
C10	B-	+	-
C11	B-	+	-
C12	B-	+	-
C13	B-	+	-
C14	B-	+	-
C15	B-	+	-
C16	B-	+	-
C17	B-	+	-
C18	B-	+	-
C19	C+	+	-
C20	B-	+	-
C21	B-	+	-
C22	B-	+	-
C23	B-	+	-
C24	B-	+	-

FG6			
Colonies	Gram	catalases	Oxydases
C1	B-	+	+
C2	B-	+	+
C3	B-	+	-
C4	B-	+	+
C5	B-	+	+
C6	B-	+	+
C7	B-	+	-
C8	B-	+	-
C9	B-	+	+
C10	B-	+	+
C11	B-	+	+
C12	B-	+	+
C13	B-	+	+
C14	B-	+	+
C15	B-	+	+
C16	B-	+	+
C17	B-	+	+
C18	B-	+	+
C19	B-	+	+
C20	B-	+	+
C21	B-	+	+
C22	B-	+	+
C23	B-	+	+
C24	B-	+	+

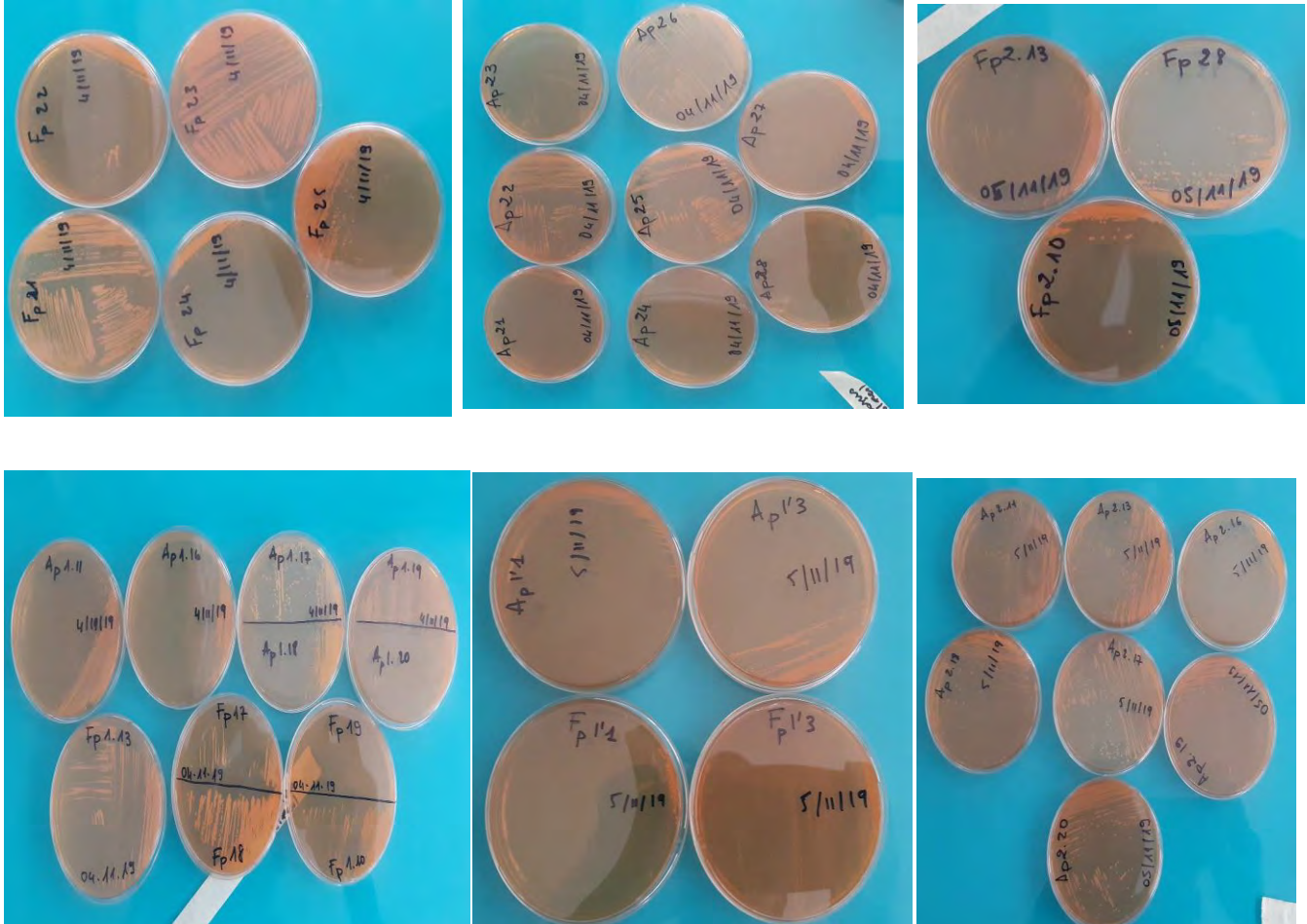
FG7			
Colonies	Gram	catalases	Oxydases
C1	B-	+	+
C2	B-	+	+
C3	B-	+	+
C4	B-	+	+
C5	B-	+	+
C6	B-	+	-
C7	B-	+	+
C8	B-	+	+
C9	C+	+	+
C10	C+	+	+
C11	B-	+	+
C12	B-	+	+
C13	B-	+	+
C14	C+	+	-
C15	C+	+	-
C16	C+	+	-
C17	C+	+	-
C18	C+	+	-
C19	C+	+	-
C20	C+	+	-
C21	C+	+	-
C22	C+	+	-
C23	C+	+	-
C24	C+	+	-

FG8			
Colonies	Gram	catalases	Oxydases
C1	B-	+	+
C2	B-	+	+
C3	B-	+	+
C4	B-	+	+
C5	B-	+	+
C6	B-	+	+
C7	B-	+	+
C8	B-	+	+
C9	B-	+	+
C10	B-	+	+
C11	C+	+	-
C12	C+	+	-
C13	B-	+	-
C14	B-	+	-
C15	B-	+	+
C16	B-	+	+
C17	B-	+	+
C18	B-	+	+
C19	B-	+	+
C20	B-	+	+
C21	B-	+	+
C22	B-	+	+
C23	B-	+	+
C24	C+	+	+

FG9			
Colonies	Gram	catalases	Oxydases
C1	B-	+	-
C2	B-	+	-
C3	B-	+	-
C4	B-	+	-
C5	B-	+	-
C6	B-	+	-
C7	B-	+	-
C8	B-	+	-
C9	B-	+	-
C10	B-	+	-
C11	B-	+	-
C12	B-	+	-
C13	B-	+	-
C14	B-	+	-
C15	B-	+	-
C16	B-	+	-
C17	B-	+	-
C18	B-	+	-
C19	C+	+	-
C20	B-	+	-
C21	B-	+	-
C22	B-	+	-
C23	B-	+	-
C24	B-	+	-

	Colonies choisies pour les tests biochimiques	Nombre
Coccis gram + catalase +	F ₁ D ₁ UC ₁₉ , FG ₇ C ₂ , FG ₇ C ₉ , FG ₈ C ₁₁ , FG ₉ C ₁₉	5
Bacilles gram-catalase+ oxydase-	Deux colonies bactériennes pour chaque intestin sauf FG7 ou nous avons choisi une seule colonie.	13
Bacilles gram-catalase+ oxydase+	Trois isolats ont été sélectionné dans chacune de ces espèces F ₁ D ₁ F, FG ₆ , FG ₇ ET FG ₈	12
Total	30	

Annexe 4 : Résultats des travaux préliminaires sur l'isolement des bactéries intestinales d'*Aedes.ae.aegypti* (22 intestins) et d'*Aedes.ae.formosus*(50 intestins) de Kédougou



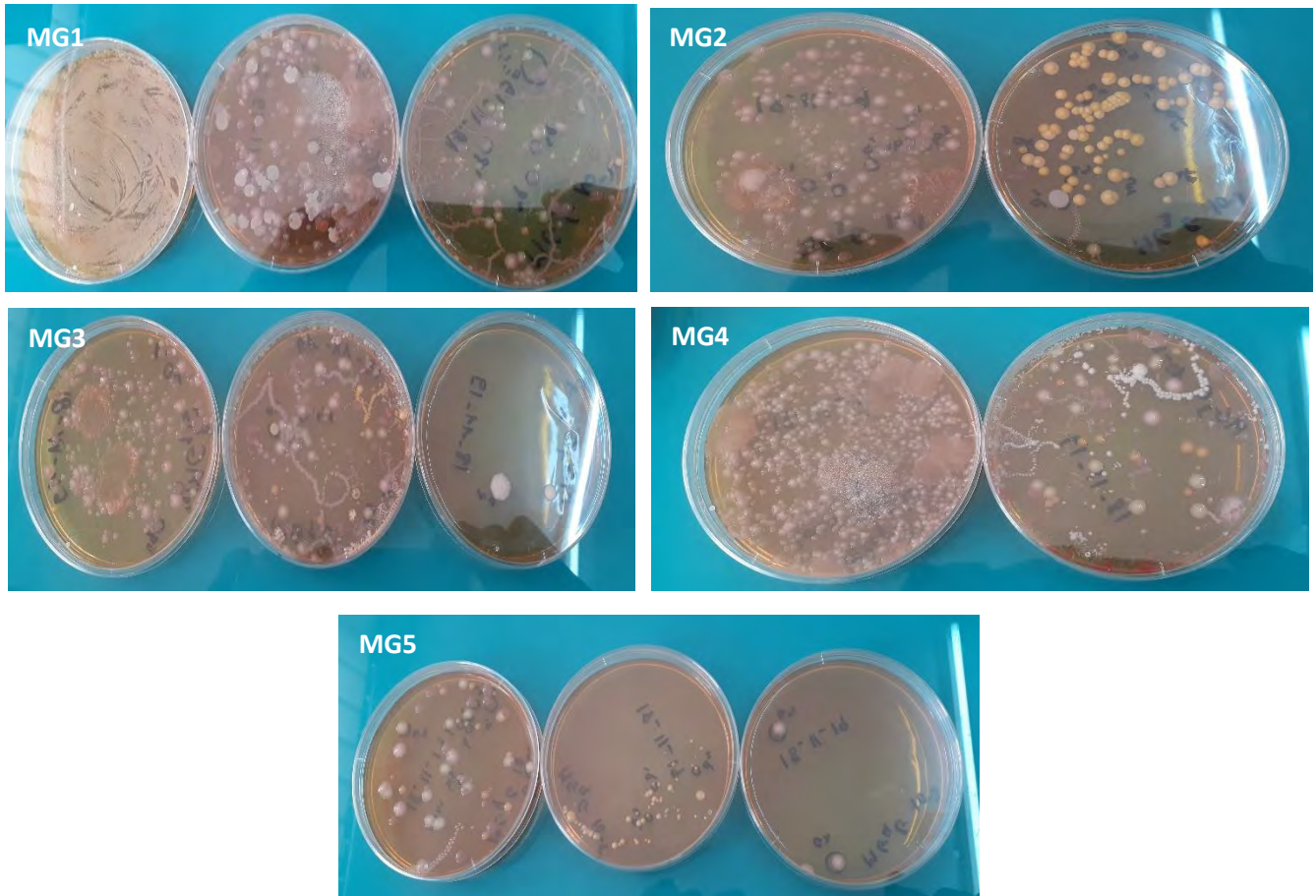
Ap1.1= *Aegypti* pool, morphotype N°1, colonie bactérienne N°1

Fp1.1= *Formosus* pool, morphotype N°1, colonie bactérienne N°1

- a. boîtes après purifications des colonies bactériennes sélectionnées à partir des boîtes de dilutions d'*Ae.ae.formosus* (50 intestins) et d'*Ae.ae.aegypti* (22 intestins).

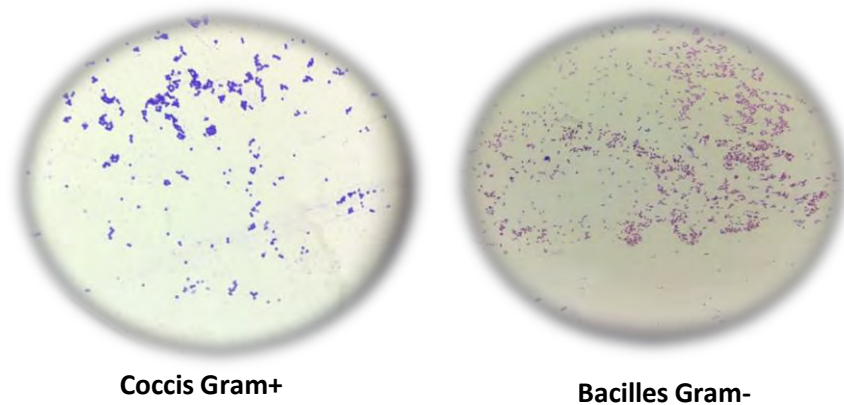
D'après cette expérience sur le microbiome intestinal d' *Ae.ae.formosus* et d'*Ae.ae.aegypti* , nous avons réalisé l'isolement de 22 isolats bactériens dont 8 chez *Ae.ae.formosus* et 14 chez *Ae.ae.aegypti*.

Annexe 5 : Résultats des travaux préliminaires sur les 5 intestins d'*Aedes.ae.formosus*



MG= Midgut en anglais qui signifie intestin moyen

a: Résultats obtenus après incubations à 37° des boîtes de dilutions.



b : résultats coloration de Gram

Rapport sur l'identification morphologique (coloration de Gram) des souches de bactéries intestinales des cinq (5) *Aedes.ae. formosus* garage après les travaux préliminaires

	Souches FG	Types de bactéries	Modes regroupements	Coloration de gram	mobilité
1	01a1	cocci	amas	+	Immobile
2	01a2	cocci	amas	+	immobile
3	01a3	cocci	chainette	-	immobile
4	02b1	cocci	amas	+	immobile
5	02b2	cocci	amas	+	Immobile
6	02b3	cocci	Amas/chainette	+	immobile
7	02c1	cocci	amas	-	immobile
8	02c2	cocci	amas	+	immobile
9	02c3	cocci	isolée	+	immobile
10	03c1	cocci	amas	+	Immobile
11	03c3	bacille		+	
12	03d2	cocci	amas	+	Immobile
13	03d3	cocci	chainette	+	Immobile
14	03e1	cocci	isolée	+	Immobile
15	03e2	cocci	chainette	+	Immobile
16	03e3	cocci	amas	+	Immobile
17	03f2	cocci	isolée	+	Immobile
18	03f3	cocci	chainette	+	Immobile
19	05a1	cocci	amas	+	Immobile
20	05a2	cocci	amas	+	Immobile
21	05a3	cocci	amas	+	Immobile
22	05b3	bacille		-	
23	05c3	cocci	diplo	+	Immobile
24	05e1	cocci	diplo	+	Immobile

FG= *Formosus Garage* c'est à dire que les espèces ont été capturé dans un garage.

01a1= boîte de dilution N°1, morphotype a, colonie bactérienne N°1.

Dans cette étude, nous nous sommes limités sur les identifications morphologiques. Il nous reste l'identification biochimique. Ces isolats ont été conservés à -80°C.

Annexe 6 : Fiche d'identification

API 10 S	V3.1	ONPG	GLU	ARA	LDC	ODC	CIT	H ₂ S	URE	TDA	IND	OX	NO ₂
<i>Citrobacter koseri/amalonaticus</i>		97	100	95	0	86	87	0	2	0	92	0	99
<i>Citrobacter braakii</i>		51	100	99	0	99	75	81	1	0	1	0	99
<i>Citrobacter farmeri</i>		98	100	99	0	100	0	0	0	0	100	0	99
<i>Citrobacter freundii</i>		90	100	94	0	0	75	65	1	0	1	0	98
<i>Edwardsiella tarda</i>		0	99	1	99	100	1	94	0	0	99	0	99
<i>Escherichia coli</i> 1		76	95	80	98	56	1	3	4	0	70	0	99
<i>Escherichia coli</i> 2		74	99	90	0	32	1	0	2	0	50	0	98
<i>Escherichia vulneris</i>		100	99	99	15	0	0	0	4	0	0	0	99
<i>Enterobacter aerogenes</i>		99	99	99	98	99	84	0	2	0	0	0	99
<i>Enterobacter amnigenus</i>		99	98	98	0	95	56	0	0	0	0	0	99
<i>Enterobacter spp/Escherichia coli/Shigella sonnei</i>		100	100	100	0	100	0	0	0	0	0	0	99
<i>Enterobacter cloacae</i>		99	99	99	1	93	94	0	1	0	0	0	99
<i>Hafnia alvei</i>		60	99	75	100	98	40	0	5	0	0	0	99
<i>Klebsiella oxytoca</i>		99	99	96	78	2	90	0	40	0	100	0	99
<i>Klebsiella pneumoniae ssp pneumoniae</i>		99	99	99	72	0	90	0	60	0	0	1	99
<i>Morganella morganii</i>		2	97	1	5	96	2	1	99	91	97	0	88
<i>Pantoea spp</i> 1		100	100	80	0	0	28	0	0	1	0	0	85
<i>Pantoea spp</i> 2		96	100	99	0	0	68	0	0	0	100	0	85
<i>Proteus mirabilis</i>		1	96	1	1	98	57	83	99	98	2	0	93
<i>Proteus penneri</i>		0	100	0	0	0	1	15	100	100	0	0	99
<i>Proteus vulgaris</i> group *		0	97	1	0	1	31	83	98	99	94	0	99
<i>Providencia rettgeri</i>		1	99	1	0	0	70	0	94	99	88	0	98
<i>Providencia stuartii/alcalifaciens</i>		1	99	2	0	0	91	0	15	100	98	0	99
<i>Salmonella choleraesuis ssp arizonae</i>		97	100	99	96	97	50	96	0	0	1	0	99
<i>Salmonella choleraesuis ssp choleraesuis</i>		0	99	0	97	97	4	70	0	0	0	1	99
<i>Salmonella ser. Gallinarum</i>		0	100	100	100	1	0	33	0	0	0	0	99
<i>Salmonella ser. Paratyphi A</i>		0	100	99	0	100	0	5	0	0	0	0	99
<i>Salmonella ser. Pullorum</i>		0	100	68	75	99	0	85	0	0	0	0	99
<i>Salmonella spp</i>		4	100	94	92	95	74	85	0	0	3	0	99
<i>Salmonella typhi</i>		0	99	0	98	0	0	8	0	0	0	0	99
<i>Serratia liquefaciens</i>		94	100	98	70	99	85	0	5	0	0	0	99
<i>Serratia marcescens</i>		94	100	19	98	95	97	0	28	0	1	0	95
<i>Serratia odorifera</i>		95	99	95	97	43	87	1	0	0	99	0	99
<i>Shigella spp</i>		26	99	40	0	0	0	0	0	0	20	0	99
<i>Yersinia enterocolitica</i> 1		41	100	98	0	74	0	0	98	0	49	0	98
<i>Yersinia enterocolitica</i> 2		85	97	0	0	58	0	0	99	0	0	0	98
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>		77	98	29	0	0	13	0	96	0	0	0	95
<i>Aeromonas hydrophila</i>		96	98	61	50	0	50	0	0	0	85	99	98
<i>Plesiomonas shigelloides</i>		95	99	0	100	100	0	0	1	0	99	99	99
<i>Vibrio alginolyticus/parahaemolyticus</i>		0	99	19	98	75	61	0	5	0	99	100	47
<i>Vibrio vulnificus/cholerae</i>		97	98	1	82	92	56	0	1	0	99	100	96
<i>Acinetobacter baumannii</i>		0	86	75	0	0	54	0	0	0	0	0	3
<i>Chryseobacterium indologenes</i>		20	0	0	0	0	14	0	92	0	70	99	20
<i>Chryseobacterium meningosepticum</i>		70	0	0	0	0	20	0	0	0	81	100	6
<i>Pseudomonas aeruginosa/fluorescens/putida</i>		0	30	11	0	0	68	1	15	0	0	99	14
<i>Pseudomonas spp</i>		1	7	8	0	0	54	1	4	0	0	98	48
<i>Shewanella putrefaciens</i> group *		0	6	1	0	80	83	90	1	0	0	100	96
<i>Sphingobacterium multivorum</i>		96	46	17	0	0	30	0	92	0	0	96	1
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		60	1	0	48	0	76	1	0	0	0	4	26

a. Fiche d'identification des entérobactéries

**b. Caractères différentiels de quelques espèces d'intérêt médical et vétérinaire
au sein des *Pseudomonas* et apparentés**

Bacilles à Gram négatif, non exigeants, aérobies stricts, non fermentatifs du glucose

		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Pseudomonas putida</i>	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	<i>Pseudomonas alcaligenes</i>	<i>Pseudomonas pseudoalcaligenes</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Burkholderia mallei</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	<i>Alcaligenes faecalis</i>	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Elisabethkingia meningoseptica</i>
Oxydase	OX	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+
NO3	NO3	+	V	-	+	+	V	V	+	+	V	-	-	-
Glucose (a)	GLUa	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	V	+
Lactose	LAC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
ONPG	ONPG	V	-	-	-	-	-	V	-	-	+	-	-	+
Mannitol (a)	MANa	+	+	V	+	-	-	+	V	+	-	-	-	+
Inositol (a)	INOa	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-		
Fructose (a)	FRUa	+	+	+	+	-	+	+	+	+	?	?	-	V
Mannose (a)	MNEa	V	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
LDC	LDC	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	?	?	?
Uréase	URE	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	V
TDA	TDA	-	-	-	V	V	V	-	-	-	-	-	-	?
Indole	IND	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	V
Gélatinase	GEL	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+
Citrate (a)	CIT	+	+	+	+	V	?	+	-	V	+	+	+	?
Pyocyanine		+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyoverdine		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lécithinase		V	+	-	-	-	-	V	V	V	-	?	?	?
DNAse		V	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	?

+	caractère positif pour plus de 90 % des souches de l'espèce
-	caractère négatif pour plus de 90 % des souches de l'espèce
V	caractère variable selon les souches de l'espèce
?	caractère non déterminé

Annexes 7 : Conservation des souches

- a. Colonies bactériennes intestinales d'*Aedes.ae.formosus* transférées sur des plaques de 96 puits après 96h d'incubation en milieu anaérobie et conservées à -80°C.

Intestins		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MG1D1U	A	F ₁ D ₁ U c ₁	F ₁ D ₁ U c ₂	F ₁ D ₁ U c ₃	F ₁ D ₁ U c ₄	F ₁ D ₁ U c ₅	F ₁ D ₁ U c ₆						
MG2D1U	B	F ₂ D ₁ U c ₁	F ₂ D ₁ U c ₂	F ₂ D ₁ U c ₃	F ₂ D ₁ U c ₄	F ₂ D ₁ U c ₅	F ₂ D ₁ U c ₆	F ₂ D ₁ U c ₇	F ₂ D ₁ U c ₈				
MG1D1F	C	F ₁ D ₁ F c ₁	F ₁ D ₁ F c ₂	F ₁ D ₁ F c ₃	F ₁ D ₁ F c ₄	F ₁ D ₁ F c ₅	F ₁ D ₁ F c ₆	F ₁ D ₁ F c ₇	F ₁ D ₁ F c ₈	F ₁ D ₁ F c ₉	F ₁ D ₁ F c ₁₀		
MG6G	D	FG ₆ c ₁	FG ₆ c ₂	FG ₆ c ₃									
MG7G	E	FG ₇ c ₁	FG ₇ c ₂	FG ₇ c ₃	FG ₇ c ₄	FG ₇ c ₅	FG ₇ c ₆	FG ₇ c ₇	FG ₇ c ₈	FG ₇ c ₉	FG ₇ c ₁₀	FG ₇ c ₁₁	FG ₇ c ₁₂
MG8G	F	FG ₈ c ₁	FG ₈ c ₂	FG ₈ c ₃	FG ₈ c ₄	FG ₈ c ₅	FG ₈ c ₆						
MG9G	G	FG ₉ c ₁	FG ₉ c ₂	FG ₉ c ₃	FG ₉ c ₄	FG ₉ c ₅	FG ₉ c ₆	FG ₉ c ₇	FG ₉ c ₈	FG ₉ c ₉	FG ₉ c ₁₀	FG ₉ c ₁₁	FG ₉ c ₁₂

- b. Colonies bactériennes intestinales d'*Aedes aegypti formosus* transférées sur des plaques de 96 puits après incubation de 72h en milieu aerobie et conservées à -80 °C.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
MG1D1	A	F ₁ D ₁ U C ₁	F ₁ D ₁ U C ₂	F ₁ D ₁ U C ₃	F ₁ D ₁ U C ₄	F ₁ D ₁ U C ₅	F ₁ D ₁ U C ₆	F ₁ D ₁ U C ₇	F ₁ D ₁ U C ₈	F ₁ D ₁ U C ₉	F ₁ D ₁ U C ₁₀	F ₁ D ₁ U C ₁₁	F ₁ D ₁ U C ₁₂
	B	F ₁ D ₁ U C ₁₃	F ₁ D ₁ U C ₁₄	F ₁ D ₁ U C ₁₅	F ₁ D ₁ U C ₁₆	F ₁ D ₁ U C ₁₇	F ₁ D ₁ U C ₁₈	F ₁ D ₁ U C ₁₉	F ₁ D ₁ U C ₂₀	F ₁ D ₁ U C ₂₁	F ₁ D ₁ U C ₂₂	F ₁ D ₁ U C ₂₃	F ₁ D ₁ U C ₂₄
MG2D1U	C	F ₂ D ₁ U C ₁	F ₂ D ₁ U C ₂	F ₂ D ₁ U C ₃	F ₂ D ₁ U C ₄	F ₂ D ₁ U C ₅	F ₂ D ₁ U C ₆	F ₂ D ₁ U C ₇	F ₂ D ₁ U C ₈	F ₂ D ₁ U C ₉	F ₂ D ₁ U C ₁₀	F ₂ D ₁ U C ₁₁	F ₂ D ₁ U C ₁₂
	D	F ₂ D ₁ U C ₁₃	F ₂ D ₁ U C ₁₄	F ₂ D ₁ U C ₁₅	F ₂ D ₁ U C ₁₆	F ₂ D ₁ U C ₁₇	F ₂ D ₁ U C ₁₈	F ₂ D ₁ U C ₁₉	F ₂ D ₁ U C ₂₀	F ₂ D ₁ U C ₂₁	F ₂ D ₁ U C ₂₂	F ₂ D ₁ U C ₂₃	F ₂ D ₁ U C ₂₄
MG1D1F	E	F ₁ D ₁ F C ₁	F ₁ D ₁ F C ₂	F ₁ D ₁ F C ₃	F ₁ D ₁ F C ₄	F ₁ D ₁ F C ₅	F ₁ D ₁ F C ₆	F ₁ D ₁ F C ₇	F ₁ D ₁ F C ₈	F ₁ D ₁ F C ₉	F ₁ D ₁ F C ₁₀	F ₁ D ₁ F C ₁₁	F ₁ D ₁ F C ₁₂
	F	F ₁ D ₁ F C ₁₃	F ₁ D ₁ F C ₁₄	F ₁ D ₁ F C ₁₅	F ₁ D ₁ F C ₁₆	F ₁ D ₁ F C ₁₇	F ₁ D ₁ F C ₁₈	F ₁ D ₁ F C ₁₉	F ₁ D ₁ F C ₂₀	F ₁ D ₁ F C ₂₁	F ₁ D ₁ F C ₂₂	F ₁ D ₁ F C ₂₃	F ₁ D ₁ F C ₂₄
MG6G	G	FG ₆ C ₁	FG ₆ C ₂	FG ₆ C ₃	FG ₆ C ₄	FG ₆ C ₅	FG ₆ C ₆	FG ₆ C ₇	FG ₆ C ₈	FG ₆ C ₉	FG ₆ C ₁₀	FG ₆ C ₁₁	FG ₆ C ₁₂
	H	FG ₆ C ₁₃	FG ₆ C ₁₄	FG ₆ C ₁₅	FG ₆ C ₁₆	FG ₆ C ₁₇	FG ₆ C ₁₈	FG ₆ C ₁₉	FG ₆ C ₂₀	FG ₆ C ₂₁	FG ₆ C ₂₂	FG ₆ C ₂₃	FG ₆ C ₂₄

MG7G	A	FG ₇ C ₁	FG ₇ C ₂	FG ₇ C ₃	FG ₇ C ₄	FG ₇ C ₅	FG ₇ C ₆	FG ₇ C ₇	FG ₇ C ₈	FG ₇ C ₉	FG ₇ C ₁₀	FG ₇ C ₁₁	FG ₇ C ₁₂
	B	FG ₇ C ₁₃	FG ₇ C ₁₄	FG ₇ C ₁₅	FG ₇ C ₁₆	FG ₇ C ₁₇	FG ₇ C ₁₈	FG ₇ C ₁₉	FG ₇ C ₂₀	FG ₇ C ₂₁	FG ₇ C ₂₂	FG ₇ C ₂₃	FG ₇ C ₂₄
MG8G	C	FG ₈ C ₁	FG ₈ C ₂	FG ₈ C ₃	FG ₈ C ₄	FG ₈ C ₅	FG ₈ C ₆	FG ₈ C ₇	FG ₈ C ₈	FG ₈ C ₉	FG ₈ C ₁₀	FG ₈ C ₁₁	FG ₈ C ₁₂
	D	FG ₈ C ₁₃	FG ₈ C ₁₄	FG ₈ C ₁₅	FG ₈ C ₁₆	FG ₈ C ₁₇	FG ₈ C ₁₈	FG ₈ C ₁₉	FG ₈ C ₂₀	FG ₈ C ₂₁	FG ₈ C ₂₂	FG ₈ C ₂₃	FG ₈ C ₂₄
MG9G	E	FG ₉ C ₁	FG ₉ C ₂	FG ₉ C ₃	FG ₉ C ₄	FG ₉ C ₅	FG ₉ C ₆	FG ₉ C ₇	FG ₉ C ₈	FG ₉ C ₉	FG ₉ C ₁₀	FG ₉ C ₁₁	FG ₉ C ₁₂
	F	FG ₉ C ₁₃	FG ₉ C ₁₄	FG ₉ C ₁₅	FG ₉ C ₁₆	FG ₉ C ₁₇	FG ₉ C ₁₈	FG ₉ C ₁₉	FG ₉ C ₂₀	FG ₉ C ₂₁	FG ₉ C ₂₂	FG ₉ C ₂₃	FG ₉ C ₂₄

Annexe 8 : Préparation des milieux de culture en poudre

Matériels : distillateur, béchers, éprouvette graduée, agitateur magnétique, balance à précision, autoclave, bec bunsen, boîtes de Pétri, des tubes à vis ou cotonnés stériles, pince en bois ou gants.

Mode opératoire :

- Peser la masse nécessaire de poudre pour un volume (ml) d'eau distillée.
- Dissoudre la poudre dans le diluant à l'aide de l'agitateur magnétique et chauffer jusqu'à l'ébullition.
- Laisser refroidir la préparation dans le cône stérile du bec bunsen.
- Lorsque la préparation a atteint une température inférieure à 60°C, verser dans des flacons et stériliser à l'autoclave (sauf indication) à 120°C pendant 20 min.
- Lorsque la préparation a atteint de nouveau une température inférieure à 60°C, coulé dans des boîtes de Pétri ou des tubes à vis stériles.
- Après refroidissement et pour éviter que l'eau de condensation dans les boîtes de Petri perturbe la surface du milieu gélosé, on place les boîtes en position retournée.

Etude du microbiome bactérien intestinal d'*Aedes aegypti formosus* vecteur de la Dengue, du Zika, de la Fièvre jaune et du Chikungunya dans la région de Kédougou

Nature du mémoire : Diplôme de Master en Biologie Animale. Spécialité : Parasitologie

Prénom et nom : Mouhamadou Moustapha DIOP

Date et lieu de naissance : 29/08/1993 à Thiès

Membres du Jury :

Président : Ngor FAYE

Maître de Conférences, FST, UCAD

Membres : Arfang DIAMANKA

Maître-Assistant, FST, UCAD

Yakhya DIEYE

Maître-Assistant, ESP/IPD

Malick FALL

Maître de Conférences, FST. UCAD

Résumé : *Aedes aegypti* est un vecteur responsable de la transmission d'arbovirus d'importance médicale y compris les virus de la Fièvre Jaune, de la Dengue, du Chikungunya et du Zika. Le microbiome bactérien intestinal influence de multiples aspects de la biologie du moustique, y compris la compétence vectorielle. Dans la présente étude, nous avons initié la caractérisation de la communauté bactérienne dans l'intestin moyen de la sous espèce *Aedes aegypti formosus* dans la région de Kédougou au Sénégal. Des femelles adultes de moustiques *Ae. ae. formosus* non nourris au sang ont été collectées dans la région de Kédougou. Des identifications morphologiques et biochimiques ont été utilisées pour caractériser la population bactérienne isolée de chaque moustique. Sur la base de l'analyse biochimique de trente (30) isolats bactériens intestinaux, un total de six (6) espèces (*Escherichia vulneris*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp* et *Micrococcus spp*) ont été identifiées. Parmi les espèces bactériennes, *Escherichia vulneris* était l'espèce bactérienne dominante et présente chez tous les individus suivi de *Pseudomonas alcaligenes*.

À notre connaissance, il s'agit de la première tentative d'étudier le microbiome de l'intestin moyen d'*Ae. ae. formosus* dans la région de Kédougou au Sénégal. *Escherichia vulneris* est une bactérie répandue chez les populations bactériennes d'*Ae. ae. formosus* en milieu naturel. Les informations sur le microbiome de l'intestin moyen pourraient conduire à l'élaboration de stratégies nouvelles, sûres et efficaces pour manipuler la capacité vectorielle des moustiques.

Mots clés : Microbiome, *Aedes aegypti formosus*, intestin moyen.

Abstract : *Aedes aegypti* is a vector responsible for the transmission of arboviruses of medical importance including yellow fever, dengue, chikungunya and zika viruses. The intestinal bacterial microbiome influences multiple aspects of mosquito biology, including vector competence. In this study, we initiated the characterization of the bacterial community in the middle intestine of the subspecies *Aedes aegypti formosus* in the Kédougou region of Senegal. Adult females of blood-fed *Ae. ae. formosus* mosquitoes were collected in the Kédougou area. Morphological and biochemical identifications were used to characterize the bacterial population isolated from each mosquito. Based on the biochemical analysis of thirty (30) intestinal bacterial isolates, a total of six (6) species (*Escherichia vulneris*, *Pseudomonas alcaligenes*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus spp*, and *Micrococcus spp*) were identified. Among the bacterial species, *Escherichia vulneris* was the dominant bacterial species and present in all species followed by *Pseudomonas alcaligenes*. To our knowledge, this is the first attempt to study the microbiome of the middle intestine of *Ae. ae. formosus* in the Kédougou region of Senegal. *Escherichia vulneris* is a widespread bacterium in natural bacterial populations of *Ae. ae. formosus*. Information on the microbiome of the middle gut could lead to the development of new, safe and effective strategies for handling the for manipulating the vector capacity of mosquitoes.

Keywords : Microbiome, *Aedes aegypti formosus*, medium intestine