

---

## Évaluation du risque de transmission de pathogènes par les moustiques des parcs urbains de Liège : diversité des Culicidae, paramètres phicochimiques des gîtes larvaires et détection de Wolbachia chez Culex pipiens

**Auteur :** Franzen, Solal

**Promoteur(s) :** Caparros Megido, Rudy

**Faculté :** Faculté des Sciences

**Diplôme :** Master en biologie des organismes et écologie, à finalité approfondie

**Année académique :** 2023-2024

**URI/URL :** <http://hdl.handle.net/2268.2/19402>

---

*Avertissement à l'attention des usagers :*

*Tous les documents placés en accès ouvert sur le site le site MatheO sont protégés par le droit d'auteur. Conformément aux principes énoncés par la "Budapest Open Access Initiative"(BOAI, 2002), l'utilisateur du site peut lire, télécharger, copier, transmettre, imprimer, chercher ou faire un lien vers le texte intégral de ces documents, les disséquer pour les indexer, s'en servir de données pour un logiciel, ou s'en servir à toute autre fin légale (ou prévue par la réglementation relative au droit d'auteur). Toute utilisation du document à des fins commerciales est strictement interdite.*

*Par ailleurs, l'utilisateur s'engage à respecter les droits moraux de l'auteur, principalement le droit à l'intégrité de l'oeuvre et le droit de paternité et ce dans toute utilisation que l'utilisateur entreprend. Ainsi, à titre d'exemple, lorsqu'il reproduira un document par extrait ou dans son intégralité, l'utilisateur citera de manière complète les sources telles que mentionnées ci-dessus. Toute utilisation non explicitement autorisée ci-avant (telle que par exemple, la modification du document ou son résumé) nécessite l'autorisation préalable et expresse des auteurs ou de leurs ayants droit.*

---

Université de Liège - Faculté des Sciences - Département de Biologie, Écologie et Évolution  
Université de Liège - Gembloux Agro-Bio Tech - Laboratoire d'Entomologie fonctionnelle et évolutive

**Évaluation du risque de transmission de pathogènes par les moustiques des parcs urbains de Liège : diversité des Culicidae, paramètres physicochimiques des gîtes larvaires et détection de *Wolbachia* chez *Culex pipiens***

Solal Franzen

Mémoire de fin d'études présenté en vue de l'obtention du grade de Master en Biologie des Organismes et Écologie, à finalité approfondie.

Janvier 2024

Promoteur : Rudy CAPARROS MEGIDO

Encadrant : Joachim CARPENTIER

# Remerciements

---

Au terme de ce mémoire de fin d'étude, je souhaite remercier toutes les personnes sans qui sa réalisation n'aurait été possible. Je remercie toutes les personnes du laboratoire d'Entomologie fonctionnelle et évolutive de Gembloux pour leur accueil chaleureux. En particulier j'aimerais remercier mon promoteur Rudy Caparros Megido pour sa supervision tout au long de ce travail et mon encadrant Joachim Carpentier pour son aide et ses conseils, pour son accompagnement tout au long de cette année, pour ses réponses à mes questions, pour sa patience, pour la relecture de mon travail et pour nous avoir accompagnés sous des pluies diluviennes pour récolter des larves de moustiques à la pipette dans des bouches d'égout. Merci à Slimane Boukraa sans qui nous aurions été incapables d'identifier le moindre moustique, merci pour son savoir et son aide. Merci à Grégoire Noël pour son aide sur les statistiques et pour ses conseils sur les présentations.

Merci aux Serres du Jardin Botanique d'avoir accepté qu'on inspecte toutes les serres et qu'on pose nos pièges dans leur enceinte. Merci pour leur gentillesse. Merci à l'école Léona Platel de Droixhe de nous avoir permis de poser nos piège chez eux. Merci à la ville de Liège d'avoir accordé le permis pour entreposer nos pièges.

Je souhaite également remercier mes parents pour leur soutien sans faille. Merci Maman pour tes conseils et pour la relecture de mon travail jusqu'à la toute fin. Merci Papa d'avoir encodé à la main tous ces noms latins quand j'étais submergé. Merci aussi à vous deux de m'avoir permis de faire ces études dans les meilleures conditions.

Merci Salomé d'être toi, merci de m'avoir accompagné, merci pour les chocolats chauds et tout le reste. Merci d'avoir coloré ces jours gris.

# Évaluation du risque de transmission de pathogènes par les moustiques des parcs urbains de Liège : diversité des Culicidae, paramètres physicochimiques des gîtes larvaires et détection de *Wolbachia* chez *Culex pipiens*

Solal Franzen | Promoteur : Rudy Caparros Megido | Encadrant : Joachim Carpentier  
Janvier 2024, Laboratoire d'Entomologie fonctionnelle et évolutive – Gembloux Agro-Bio Tech

## Résumé

---

Les moustiques sont les animaux qui transmettent le plus de maladies à l'homme. La prévention contre ces pathogènes requiert de connaître les espèces vectrices présentes dans une localité et de comprendre leur écologie, en particulier concernant l'habitat des larves. Une technique de lutte contre ces pathogènes consiste en l'introduction, dans les population de moustiques, d'une bactérie endosymbiotique connue pour pouvoir conférer une résistance virale à son hôte : *Wolbachia*.

La présente étude tend à évaluer les risques de transmission de pathogènes par les moustiques de Liège et à évaluer l'influence de paramètres physicochimiques des habitats des larves (les gîtes larvaires) sur les communautés de moustiques. Pour ce faire, nous avons décrit les communautés de moustiques de quatre parcs urbains de Liège et nous avons analysé l'influence de cinq paramètres physicochimiques des gîtes larvaires : la température, le pH, l'électroconductivité (EC), l'O<sub>2</sub> dissous (OD) et la luminosité (RAD). De plus, l'étude vise à fournir les données préliminaires nécessaires à une meilleure compréhension des effets de *Wolbachia* sur *Cx. pipiens* et nécessaires à de potentielles mises en place de techniques antivectorielles basées sur sa transmission. Dans ce but, grâce à sa protéine de surface *wsp*, nous avons évalué l'infection de *Wolbachia* et déterminé sa souche dans 11 *Cx. pipiens* des parcs.

Les communautés des parcs de Liège sont presque exclusivement composées de *Cx. pipiens* qui représentent 95,6% des individus. Cette espèce est l'espèce revêtant la plus grande importance sanitaire parmi les 10 espèces détectées dans les parcs. Nos résultats indiquent que cette espèce a une niche très large mais que sa présence serait influencée négativement par l'OD et le RAD et qu'elle est moins présente aux alentours de 22°C. Sa densité dans les gîtes, elle, serait influencée positivement par l'OD et le RAD et négativement par la température tandis que l'on retrouverait le plus d'individus aux alentours de 3000 µS/cm et d'un pH 7. *Wolbachia* était présente dans 100% des 11 *Cx. pipiens* étudiés qui présentaient tous la même souche du sous-groupe Pip dans le super-groupe B.

Étant donné la forte densité de population dans la ville de Liège, la grande proportion de *Cx. pipiens* dans ses parcs et la présence du VNO dans les pays frontaliers proches de la ville, il est possible qu'elle voie, dans les prochaines années, les premières infections au VNO. Une surveillance vectorielle préventive est donc recommandée.

# Table des matières

---

1.	Introduction .....	1
1.1.	Importance sanitaire du moustique à l'échelle globale.....	1
1.2.	Importance sanitaire des moustiques à l'échelle locale .....	2
1.3.	Influence de l'habitat sur les communautés de moustiques.....	5
1.3.1.	Ontogénèse des moustiques.....	5
1.3.2.	Caractéristiques physicochimiques des gîtes larvaires .....	7
1.4.	Microbiote du moustique.....	9
1.5.	Objectifs.....	10
2.	Matériel et méthodes .....	12
2.1.	Sites d'échantillonnage.....	12
2.2.	Méthode d'échantillonnage .....	12
2.2.1.	Gîtes larvaires.....	12
2.2.2.	Pièges pondoirs .....	14
2.2.3.	Échantillonnage des adultes .....	15
2.3.	Identifications.....	15
2.4.	Mesure des paramètres physicochimiques.....	15
2.5.	Détection et identification de <i>Wolbachia</i> .....	16
2.6.	Analyses des données .....	16
2.6.1.	Communautés.....	16
2.6.2.	Données météorologiques .....	17
2.6.3.	Paramètres physicochimiques .....	17
3.	Résultats .....	19
3.1.	Résultats généraux.....	19
3.2.	Communautés de Culicidae des différents parcs .....	23
3.4.	Paramètres physicochimiques des gîtes.....	26
3.5.	Influence des paramètres physicochimiques.....	30
3.5.1.	Influence sur la densité de <i>Cx. pipiens</i> dans les gîtes.....	30
3.5.2.	Influence sur la probabilité de retrouver des <i>Cx. pipiens</i> dans un gîte.....	32
3.6.	<i>Wolbachia</i> .....	34
4.	Discussion .....	36
4.1.	Communautés de Culicidae des parcs de Liège.....	36
4.2.	Analyses des gîtes.....	37
4.2.1.	Analyses des paramètres physicochimiques des gîtes.....	37
4.2.2.	Richesse spécifique des gîtes larvaires et pièges pondoirs.....	44
4.3.	Importance sanitaire des espèces collectées .....	45

4.4. <i>Wolbachia</i> .....	47
5. Conclusion.....	49
6. Références.....	51
7. Annexes.....	60

## Liste des abréviations

---

A	Adénine
ACP	Analyse en composantes principales
<i>Ae.</i>	<i>Aedes</i>
AIC	Critère d'information d'Aikaike
<i>An.</i>	<i>Anopheles</i>
C	Cytosine
cm	Centimètre(s)
CP	Composante principale
<i>Cs.</i>	<i>Culiseta</i>
<i>Cx.</i>	<i>Culex</i>
DENV	Virus de la dengue
EC	Électroconductivité
ECDC	European Centre for Disease Prevention and Control
Fig.	Figure
G	Guanine
GLMM	General linear mixed model
IPCC	Intergovernmental Panel on Climate Change
<i>i.e.</i>	Id est
L	Litre(s)
m	Mètre(s)
mL	Mililitre(s)
mm	Milimètre(s)
MM	Mosquito Magnet
OD	O <sub>2</sub> dissous
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase chain reaction
PP	Pièges pondoirs
ppm	Part par million
p-val	P-valeur
RAD	Irradiance
<i>s.l.</i>	Sensu lato

s.s.	Sensu stricto
T	Thymine
Tab.	Tableau
USUV	Virus d'Usutu
VNO	Virus du Nil occidental
μS	Microsiemens
°C	Degrés Celsius

# 1. Introduction

---

## 1.1. Importance sanitaire du moustique à l'échelle globale

Les maladies transmises par des vecteurs animaux représentent 17% des maladies infectieuses dans le monde et le plus grand vecteur de maladies à l'humain est le moustique (Diptère : Culicidae) (OMS, 2020). En effet, des millions de personnes sont touchées chaque année par des maladies transmises par des moustiques. De plus, ces maladies sont les maladies infectieuses les plus sensibles au changement climatique (IPCC, 2014).

C'est la malaria qui est la plus problématique à l'échelle mondiale. En effet, cette pathologie causée par les parasites du genre *Plasmodium* transmis par les moustiques *Anopheles* Meigen 1818 a touché 247 millions de personnes dans le monde, faisant 619 000 morts en 2021 (OMS, 2022c). Bien que des traitements existent, l'émergence de résistances aux médicaments renforce le besoin d'associer le contrôle vectoriel à la lutte – c'est-à-dire, ici, le contrôle des populations de moustiques dans les zones à risque (Ambroise-Thomas & Rossignol, 1986; Haldar et al., 2018; Hyde, 2005).

Une autre maladie importante à l'échelle mondiale est la filariose lymphatique. En effet, 51 millions de personnes ont été infectées en 2018 dans des pays tropicaux (OMS, 2022b). Transmise par des moustiques *Culex* L. 1758, *Anopheles* ou *Aedes* Meigen 1818, elle provoque des dommages tissulaires causant des gonflements des membres et des organes génitaux (Becker et al., 2010). Il existe des mesures d'atténuation de symptômes et le moyen de lutte recommandé par l'OMS est la chimioprévention qui consiste en l'administration de masse de médicaments à l'ensemble de la population à risque pour prévenir la transmission des parasites aux moustiques. Cependant, l'association de la lutte antivectorielle à ces mesures est cruciale, elle renforce leurs impacts et, dans certains endroits, la lutte vectorielle seule a suffi à l'élimination de la filariose lymphatique (OMS, 2022b ; Wilke et al., 2020).

Quant à la dengue, transmise par *Aedes aegypti* (L. 1762) et *Aedes albopictus* (Skuse 1894) (moustique tigre), elle touche 100 à 400 millions de personnes par an (OMS, 2022a). Il n'existe pas de traitement spécifique pour la dengue et le vaccin homologué en 2015 n'est efficace que pour les personnes de 9 à 45 ans ayant déjà été infecté par le virus de la dengue (DENV) (CDC, 2021 ; OMS, 2022a). C'est pourquoi, la méthode principale de contrôle et de prévention contre la transmission du DENV est le combat contre les moustiques vecteurs, notamment en réduisant la disponibilité en habitats adéquats pour la ponte d'œufs, la

protection personnelle contre les piqûres ainsi que le suivi des communautés de moustiques et de la prévalence du virus dans celles-ci (OMS, 2022a).

## **1.2. Importance sanitaire des moustiques à l'échelle locale**

En Belgique, les deux principales maladies transmises par les moustiques revêtant un intérêt de santé publique et vétérinaire sont causées par deux flavivirus proches phylogénétiquement : l'Usutu (USUV) et le virus du Nil occidental (VNO).

Le cycle de l'USUV implique des oiseaux en tant qu'hôtes réservoirs amplificateurs et son principal vecteur est le moustique du genre *Culex* (Gaibani & Rossini, 2017 ; Nikolay et al., 2011). Le virus a été détecté pour la première fois en Europe (Italie) en 1996 (Weissenböck et al., 2013) en causant la mort de nombreux oiseaux. Depuis, plusieurs épidémies ont éclaté à travers l'Europe : en Autriche en 2001 (Chvala et al., 2004), en Italie en 2006 (Manarolla et al., 2010) et en Allemagne de 2011 à 2014 (Becker et al., 2012 ; Ziegler et al., 2015). En Belgique, la première détection du virus date de 2012 (M.-M. Garigliany et al., 2014). Une épidémie a éclaté en 2016 (Cadar et al., 2017 ; M. Garigliany et al., 2017 ; Rouffaer et al., 2018) et le virus semble désormais être devenu endémique dans le sud du pays (Benzarti et al., 2020). Ces épidémies sont toujours accompagnées d'une forte mortalité d'oiseaux sauvages, principalement dans les populations de merles noirs (*Turdus merula*). Bien qu'il touche principalement les oiseaux, l'USUV peut aussi infecter des humains (Grottola et al., 2017; Vilibic-Cavlek et al., 2014). Ceux-ci sont souvent asymptomatiques ou présentent des symptômes modérés (éruption cutanée, fièvre, maux de tête). Rarement, chez des patients immunodéprimés, des troubles neurologiques apparaissent (Cavrini et al., 2009; Grottola et al., 2017; Pecorari et al., 2009; Vilibic-Cavlek et al., 2014). L'USUV est préoccupant pour les pays européens puisqu'on observe une extension de sa gamme d'hôtes (Benzarti et al., 2020), une augmentation du nombre de cas d'infections humaines (Aberle et al., 2018). Par ailleurs, la fréquence des épidémies devrait augmenter avec le changement climatique (Brugger & Rubel, 2009). Il n'existe pas de vaccin contre ce virus ou de traitement spécifique. Les seuls moyens de contrôle de la circulation du virus sont alors basés sur la surveillance et la lutte vectorielle (Constant et al., 2022).

De ces deux flavivirus, le VNO est celui qui a le plus d'impact sur la santé humaine. Comme pour l'USUV, les oiseaux sont ses hôtes naturels et les moustiques ornithophiles sont ses vecteurs. Les humains et d'autres mammifères peuvent devenir des hôtes accidentels en cas de forte densité de moustiques ayant pour hôtes les oiseaux et les mammifères comme le

biotype *Culex pipiens molestus* Forskal 1775 (Becker et al., 2010). En cas de forte densité humaine, les moustiques ornithophiles peuvent aussi piquer des humains. Les humains infectés sont asymptomatiques à 80% ou développent la fièvre du Nil occidental dont les symptômes principaux sont de la fièvre, des maux de tête, de la fatigue et des nausées. Dans 1 cas sur 150, principalement pour des personnes immunodéprimées, la maladie peut devenir neuro-invasive et causer une encéphalite ou une méningite qui peut se révéler fatale (ECDC, 2018; OMS, 2017).

En Europe, des centaines de cas d'infections humaines sont recensés chaque année et ce nombre augmente à cause du changement climatique et en particulier en raison des températures estivales anormalement hautes (Aberle et al., 2018; Paz, 2015). En 2022, 965 cas dont 76 morts ont été recensés dans l'Union européenne et l'espace économique européen, ce qui dépasse la moyenne des cas de 2017 à 2021 (Fig. 1 ; ECDC, 2022). Notons que ces chiffres sont voués à augmenter (Semenza et al., 2016). En Belgique, aucun cas d'infection locale n'a été recensé pour l'instant : les seuls cas recensés concernent des patients revenant de pays où la maladie est endémique (Grèce, Hongrie) (Bossche et al., 2015; Cnops et al., 2013; Wollants et al., 2018). Cependant, des infections autochtones du VNO ont été recensées dans plusieurs pays limitrophes ces dernières années (France 2022, Allemagne 2022, Pays-Bas 2020), ce qui augmente son risque d'introduction (ECDC, 2023). Or, si une épidémie venait à éclater, l'impact économique serait non négligeable. En effet, le coût de la vaccination de tous les chevaux belges reviendrait à 30 millions d'euros ou à 16 à 17 millions d'euros pour les chevaux des zones considérées à risque. La prise en charge d'une personne présentant la forme neuro-invasive de la maladie coûterait, elle, de 3600 à 4500 euros (Humblet et al., 2016).

Bien qu'il existe des vaccins pour les chevaux, il n'existe pas de traitement spécifique pour les humains (ECDC, 2018). Les moyens de lutte à notre disposition sont alors : la surveillance active de la santé animale puisque les épidémies chez les oiseaux et les chevaux précèdent les cas humains, la sensibilisation de la population aux facteurs de risque et aux mesures à mettre en œuvre pour diminuer l'exposition aux moustiques ainsi que la lutte antivectorielle (ECDC, 2018; OMS, 2017). De plus, il est nécessaire de tester les donneurs de sang car la transmission entre humains est possible lors de transfusions sanguines ou de transplantations (ECDC, 2018).

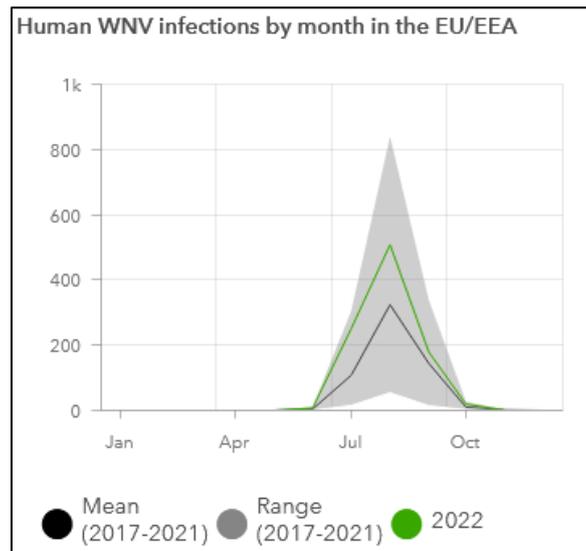


Figure 1 : Courbes des infections humaines du VNO en UE et EEE au cours d’une année. La courbe noire montre la moyenne des infections humaines au VNO entre 2017 et 2021. La courbe verte montre la moyenne des infections humaines au VNO en 2022. La zone grise est tracée du nombre de cas le plus faible au plus élevé d’infection humaines au VNO entre 2017 et 2021. Depuis [www.ecdc.europa.eu](http://www.ecdc.europa.eu).

Dans la lutte contre les zoonoses, l’étude des zones urbaines est de plus en plus importante puisque, aujourd’hui, 56% de la population mondiale vit en milieu urbain, chiffre qui devrait passer à presque 70% en 2050 (Banque Mondiale, 2022). Or, les villes représentent un milieu propice pour les zoonoses car elles présentent des habitats favorables à la vie sauvage ainsi qu’une haute densité de population humaine, ce qui multiplie les interactions entre animaux sauvages et êtres humains (Combs et al., 2022; Kolimenakis et al., 2021). Ainsi, les villes peuvent contenir de nombreux gîtes larvaires : points d’eau stagnante temporaires ou permanents favorables au développement des larves de moustiques. Ces gîtes sont de natures diverses, ce qui favorise une richesse spécifique des communautés de moustiques (Contreras-Perera et al., 2022; Semenza et al., 2016).

La ville de Liège est la quatrième ville la plus peuplée de Belgique avec 195 000 habitants et une densité de 2 845 habitants/m<sup>2</sup> (Statbel, 2023). Du fait de sa forte densité de population et de ses nombreux sites propices à abriter des gîtes larvaires divers tels que des parcs avec des étangs ou des bâtiments abandonnés, la ville pourrait être propice à la transmission de maladies par les moustiques. Cependant, il n’existe pas encore de compte rendu de la biodiversité des Culicidae de la ville de Liège.

La première condition pour la transmission de maladies vectorielles est la coprésence de vecteurs compétents et d’hôtes. Par ailleurs, les oiseaux migrateurs sont responsables de la dispersion à longue distance et de l’introduction du VNO en Europe (Becker et al., 2010;

ECDC, 2018; Randolph & Rogers, 2010). Or, la Belgique abrite de nombreuses espèces d’oiseaux migrateurs et Liège et ses alentours peuvent être sur la trajectoire d’importants couloirs migratoires (Fig. 2 ; Beckers, 2020). De plus, *Aedes cantans* (Meigen 1818), *Aedes caspius* (Pallas 1771), *Coquillettidia richiardii* (Ficalbi 1889), *Culex pipiens* L. 1758, des espèces capables de transmettre le VNO, ont déjà été recensées dans des zones urbaines en Belgique (Versteirt et al., 2013) ainsi que *Culex modestus* Ficalbi 1889 et *Ae. japonicus* (Theobald 1901) dans des zones non-urbaines (Versteirt et al., 2013 ; Wang et al., 2021 ; Wolf et al., 2021).

Enfin, la collection de données épidémiologiques telles que la présence/absence, la diversité et l’abondance de vecteurs sont capitales pour l’évaluation des risques d’épidémie de maladies à transmission vectorielle (Braks et al., 2011).

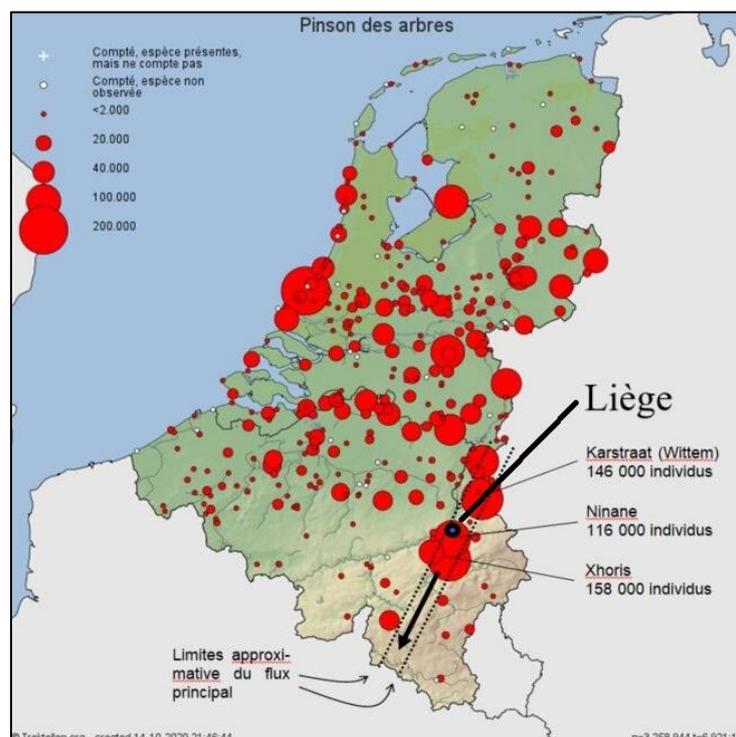


Figure 2 : Observations de pinsons des arbres sur les sites de suivis migratoires de la plateforme [www.trektellen.org](http://www.trektellen.org) entre le 01/10/2020 et le 14/10/2020 (modifié de Beckers, 2020). Les pointillés montrent un couloir migratoire de pinsons de arbres (*Fringilla coelebs*) passant par la ville de Liège.

### 1.3. Influence de l’habitat sur les communautés de moustiques

#### 1.3.1. Ontogénèse des moustiques

Comme tous les diptères, les moustiques sont des insectes holométaboles, ce qui signifie qu’ils passent par une métamorphose complète lors de leur développement. Les femelles pondent à la surface de l’eau (excepté celle du genre *Aedes*). Puis, après éclosion, les larves aquatiques s’y développent en passant par quatre stades larvaires et un stade nymphal, appelé

pupe, au cours duquel la métamorphose va se produire. Le développement embryonnaire prend de 2 à 7 jours environ selon la température et est rapidement suivi de l'éclosion des œufs pour tous les genres qui ont des œufs non dormants (*i.e.*, en Europe, *Anopheles*, *Coquillettidia* Dyar 1905, *Culex*, *Culiseta* Felt 1904, *Orthopodomyia* Theobald 1904 et *Uranotaenia* Lynch Arribálzaga 1891) (Becker et al., 2010 ; Foster & Walker, 2002). Les moustiques du genre *Aedes* ont une histoire de vie un peu différente puisque les femelles pondent leurs œufs dans un substrat humide susceptible d'être inondé et ces derniers restent dormants jusqu'à ce qu'il y ait inondation et que les conditions soient favorables pour le développement des larves. Les œufs d'*Ae. vexans* (Meigen 1830), notamment, peuvent rester dormants pendant au moins 4 ans (Becker et al., 2010 ; Horsfall, 1973).

Les larves se nourrissent de microorganismes, d'algues, de protozoaires, d'invertébrés, de détritiques et peuvent être classées selon leur comportement alimentaire. Les filtreurs se nourrissent des particules en suspension dans la colonne d'eau (*Culex*, *Coquillettidia*, *Culiseta* et *Aedes*). Les navigateurs collectent la nourriture par re-suspension, raclage ou déchetage de particules, de microorganismes, d'algues, de protozoaires (*Aedes*) ou du film microbien de la surface de l'eau (*Anopheles*). Et, enfin, les prédateurs se nourrissent d'insectes ou d'autres petites proies mobiles. Aucune espèce de ce type n'existe en Europe (Becker et al., 2010; Foster & Walker, 2019).

Au VIII<sup>e</sup> segment de leur abdomen, les larves ont un siphon respiratoire (*Culex*, *Coquillettidia*, *Culiseta*, *Aedes* et *Uranotaenia*) ou simplement des lobes spiraculaires (*Anopheles*) qui leur permettent de respirer. Ainsi, les larves collectent l'air à la surface de l'eau, exceptées celles du genre *Coquillettidia* qui ont un siphon spécialisé qui leur permet de percer des plantes aquatiques afin d'extraire l'oxygène présent dans leur aérénchyme (Becker et al., 2010). Donc, au repos, les larves sont juste sous la surface de l'eau, à l'exception des espèces du genre *Coquillettidia*.

La durée de développement du moustique dépend de l'espèce mais est aussi influencée, de manière générale, par la température. Les températures élevées sont associées à un développement rapide et les températures basses à un développement lent. Ainsi, pour des espèces pouvant se développer à de faibles températures (<10°C), le développement larvaire peut durer de 2 à 3 mois tandis que pour des espèces qui se développent à de plus hautes températures (30°C) comme *Ae. vexans*, le développement larvaire peut durer de 6 à 7 jours (Becker et al., 2010).

Le stade nymphal est aussi aquatique et dure généralement 2 jours. À l'état de repos, la puppe flotte à la surface de l'eau et respire grâce à des trompettes respiratoires connectées aux spiracles méso-thoraciques de l'adulte en développement. Cependant, contrairement à la plupart des diptères, la puppe est mobile et peut donc fuir si elle est dérangée (Becker et al., 2010).

L'émergence des adultes se fait à la surface de l'eau, généralement 1 à 2 jours plus tôt pour les mâles que pour les femelles car les mâles prennent plus de temps à atteindre la maturité sexuelle (Becker et al., 2010). Les adultes se nourrissent de fluides végétaux (nectar, jus de fruit, sève, exsudats) (Peach & Gries, 2020). La plupart des espèces sont anautogènes, c'est-à-dire que les femelles ont besoin de sang de vertébrés, en particulier des protéines présentes dans le sang, pour la maturation des œufs. Cependant, certaines femelles dites autogènes comme les femelles *Cx. pipiens molestus* sont capables de produire leur première ponte sans sang (Becker et al., 2010). L'accouplement se fait lorsqu'une femelle entre dans un essaim de mâles. Les essaims peuvent être constitués de quelques mâles à plusieurs milliers qui volent de haut en bas, de gauche à droite généralement en matinée ou en soirée, quand la luminosité est faible. Une femelle qui rentre dans cet essaim est directement saisie par un mâle et inséminée. Ensuite, la femelle va chercher un hôte (ou non si elle est autogène) sur lequel prélever du sang. Puis, une fois qu'elle s'est gorgée, la femelle gravide va chercher un point d'eau ou un substrat favorable pour pondre (Becker et al., 2010).

Les espèces belges sont adaptées au climat tempéré et ont développé différents mécanismes pour passer l'hiver. La majorité des espèces du genre *Aedes* hibernent à l'état d'œuf. D'autres espèces comme *Culiseta morsitans* (Theobald 1901) passent l'hiver à l'état de larve mais la plupart des espèces des genres *Culex*, *Culiseta*, *Uranotaenia* et *Anopheles* passent l'hiver à l'état d'adulte femelle (Becker et al., 2010). La majorité des espèces, en Belgique, sont retrouvées principalement à partir de la mi-printemps jusqu'en automne, avec un pic durant les mois d'été (Becker et al., 2010; Dekoninck et al., 2010; Schaffner et al., 2001).

### **1.3.2. Caractéristiques physicochimiques des gîtes larvaires**

Le gîte larvaire revêt une importance capitale dans la vie des moustiques puisqu'il abrite les larves tout au long de leur développement. Par conséquent, sa qualité est essentielle pour le bon développement de celles-ci (Akpodiete et al., 2019; Hery, Boullis, et al., 2021; Reiskind et al., 2009). C'est pourquoi les femelles gravides distinguent les sites bénéfiques pour le développement et la survie de leur progéniture en se basant sur des repères visuels, olfactifs, tactiles et chimiotactiles (Day, 2016). Ainsi, les indices visuels permettent d'identifier et de

séparer les habitats aquatiques (mares, cours d'eau, marais, contenants artificiels ou naturels...) (Kennedy, 1942), tandis que les indices olfactifs, tactiles et chimiotactiles propres à la qualité du site sont ressentis et évalués par des récepteurs antennaires, tarsaux, du labrum et des palpes (Choo et al., 2015 ; Day, 2016).

Ainsi, de nombreux paramètres physicochimiques de l'eau ont été mis en lien avec le choix du site d'oviposition des femelles. Ces paramètres peuvent avoir des effets différents pour différentes espèces. Selon l'OMS (1975), la température moyenne optimale pour le développement de la majorité des espèces de moustiques se situe entre 25 et 27 °C. Ainsi, on retrouverait plus de larves d'*Anopheles*, de *Culex* et d'*Aedes aegypti* dans des eaux à une haute température (Hery, Guidez, et al., 2021; Kinga et al., 2022; Lalami et al., 2010; Onchuru et al., 2016). Cependant, les larves de *Culiseta annulata* (Schrank 1776) seraient plus fréquentes dans des eaux plus froides (Golding et al., 2015). Une eau sombre et colorée serait aussi plus attirante pour les femelles gravides (Beehler et al., 1992 ; Kennedy, 1942 ; Mouatasseem et al., 2020). De même, un point d'eau ombragé serait plus attirant qu'un point illuminé (Belton, 1967; Onchuru et al., 2016). La conductivité semble être positivement associée à la présence des larves d'*Anopheles* et de *Culex* (Dejenie et al., 2011; Emidi et al., 2017 ; Mouatasseem et al., 2020) . L'effet du pH peut varier grandement d'une espèce à l'autre (Becker et al., 2010). Certaines espèces comme *Cx. pipiens* peuvent se retrouver dans des habitats acides, neutres ou basiques (Becker et al., 2010 ; Figueroa et al., 2016). D'autres, comme *Ae. cinereus* Meigen 1818, préfèrent des milieux basiques et d'autres encore, comme *Ae. communis* (De Geer 1776), préfèrent des milieux acides (Becker et al., 2010). De la même manière, l'O<sub>2</sub> dissous (OD) a un effet qui diffère selon les espèces. *Ae. aegypti* préférerait des eaux peu oxygénées voire quasiment anoxiques tandis que *Cx. pipiens*, *Cx. perexiguus* Theobald 1903 et les *Anopheles* préféreraient des eaux bien oxygénées (Dejenie et al., 2011 ; Hery, Guidez, et al., 2021 ; Kenawy et al., 2013 ; Lalami et al., 2010 ; Onchuru et al., 2016 ; Silberbush et al., 2015). De nombreux autres facteurs physicochimiques peuvent influencer l'oviposition, à savoir, notamment, la turbidité, la salinité, la dureté, le potentiel oxydo-réducteur, la demande biochimique en oxygène, la quantité de NO<sub>3</sub>, NO<sub>2</sub>, PO<sub>4</sub>, SO<sub>4</sub>, NH<sub>4</sub> et la quantité de P, N, K et Cl total (Emidi et al., 2017 ; Golding et al., 2015 ; Hery, Guidez, et al., 2021 ; Kenawy et al., 2013 ; Kinga et al., 2022 ; Lalami et al., 2010 ; Mouatasseem et al., 2020 ; Onchuru et al., 2016).

De plus, les caractéristiques physicochimiques du milieu peuvent aussi influencer la densité des larves, la taille des populations adultes et aussi leur capacité à transmettre des pathogènes

(Onchuru et al., 2016). Ces caractéristiques influencent, par ailleurs, des caractères phénotypiques tels que la fécondité, la fertilité et la taille du corps (Akpodiete et al., 2019).

#### **1.4. Microbiote du moustique**

Le microbiote est indispensable dans la vie d'un moustique. Il affecte notamment le développement larvaire, l'espérance de vie de l'adulte, la digestion du sang, la fertilité, l'oviposition, l'immunité et la capacité vectorielle (Engel & Moran, 2013 ; Vinayagam et al., 2023). Ainsi, des larves axéniques sont incapables de se développer au-delà du premier stade (Coon et al., 2014).

La résistance des moustiques aux pathogènes est régie par une relation complexe tripartite moustique – pathogène – microbiote. Le microbiote joue donc un rôle important dans l'immunité et la capacité vectorielle des moustiques. Les microorganismes peuvent réguler positivement ou négativement la résistance aux pathogènes (Vinayagam et al., 2023). Par exemple, dans *Anopheles gambiae* Giles 1902, vecteur de la malaria, les bactéries du genre *Enterobacter* suppriment un des parasites responsables de la maladie, *Plasmodium falciparum*, et *Escherichia coli* inhibe *Plasmodium berghei* (Cirimotich et al., 2011 ; Meister et al., 2009). À l'inverse, le champignon *Penicillium chrysogenum* rend cette espèce plus sensible aux infections de *Plasmodium* (Angleró-Rodríguez et al., 2016).

*Wolbachia pipientis* est une bactérie endosymbiotique qui infecte un grand nombre d'arthropodes terrestres (Duron et al., 2008). Elle se transmet verticalement dans les moustiques par transmission transovarienne (Clements, 2000) et est liée à de nombreux phénomènes impactant la biologie du moustique, notamment dans sa résistance aux pathogènes et dans sa capacité vectorielle. En effet, cette bactérie peut réduire la durée de vie et le succès des repas sanguins (McMeniman et al., 2009; Turley et al., 2009) et causer des altérations reproductives dans les hôtes : féminisation, parthénogénèse, dégénérescence des embryons mâles et incompatibilité cytoplasmique (Stouthamer et al., 1999). L'incompatibilité cytoplasmique est le phénomène qui fait que les mâles infectés ne peuvent pas produire de descendance avec des femelles non infectées (Clements, 2000). Ceci confère un avantage reproductif aux femelles infectées et, ce faisant, permet à *Wolbachia* d'envahir rapidement des populations non infectées (Sinkins et al., 2005).

Les effets de *Wolbachia* sur l'immunité et la capacité vectorielle des moustiques vont d'une réduction de la prolifération et de la transmission de pathogènes à une augmentation du taux d'infection (Novakova et al., 2017). Par exemple, l'introduction de la souche wMelPop dans

*Aedes aegypti* réduit de moitié son espérance de vie, inhibe le développement de nématodes filaires et limite les infections au virus de la dengue (DENV), au virus du chikungunya (CHIKV) et aux *Plasmodium sp.* (Kambris et al., 2009 ; Moreira et al., 2009). Ainsi, de nouveaux moyens de contrôle vectoriel peuvent être mis en place. Grâce à l'incompatibilité cytoplasmique, l'introduction d'adultes infectés dans une population vectrice permet l'infection d'une grande majorité de la population et peut conduire à rendre celle-ci plus résistante face à un pathogène et à en réduire la capacité vectorielle ou la taille (O'Connor et al., 2012 ; Hoffmann et al., 2011 ; O'Neill et al., 2019). Ainsi, dans la ville de Townsville en Australie, l'introduction de la souche wMel de *Wolbachia* dans la population d'*Ae. aegypti* a permis une importante baisse du nombre de personnes infectées par la dengue (O'Neill et al., 2019). À l'inverse, l'introduction de la souche wAlbB augmente l'infection du VNO dans *Culex tarsalis* Coquillett 1896 et augmente l'infection de *Plasmodium berghei* dans *Anopheles gambiae* (Dodson et al., 2014 ; Hughes et al., 2012). L'effet de *Wolbachia* dépend donc de la souche de celle-ci, de l'espèce dans laquelle elle est introduite et du pathogène. C'est pourquoi ce type d'introduction dans les populations sauvages doit être réalisé avec précaution. Ces exemples concernent l'introduction d'une souche de *Wolbachia* dans un hôte hétérologue mais une souche native peut aussi conférer une résistance. La souche native de *Culex quinquefasciatus* Say 1823, notamment, inhibe l'infection par le VNO (Glaser & Meola, 2010).

Évaluer l'infection des moustiques de terrain et identifier la souche qui les infecte est important pour fournir les informations basiques nécessaires en vue de déterminer si l'endosymbionte natif des populations de terrain réduit la capacité vectorielle des moustiques ou de mettre en place des stratégies de contrôle vectoriel basées sur *Wolbachia*.

## **1.5. Objectifs**

Dans un but d'évaluer le risque de transmission de maladies par les moustiques dans la ville de Liège (Belgique), de déterminer des caractéristiques des gîtes qui influenceraient la composition des communautés culicidiennes dans les parcs de la ville et de fournir des informations préliminaires nécessaires à une meilleure compréhension de l'effet de *Wolbachia* sur les populations de terrain et à la potentielle mise en place de techniques de contrôle vectoriel basé sur cette bactérie, ce travail vise à déterminer la composition des communautés de moustiques dans les parcs liégeois, à évaluer l'influence de paramètres

physicochimiques sur ces communautés et, enfin, à détecter l'infection de *Wolbachia* ainsi que la souche de celle-ci parmi la population de *Cx. pipiens* de Liège.

## 2. Matériel et méthodes

### 2.1. Sites d'échantillonnage

Les moustiques ont été collectés dans la ville de Liège (50°38'1.43"N, 5°34'2.96"E), dans l'est de la Belgique. La ville se situe à 60 m au-dessus du niveau de la mer et abrite près de 200 000 habitants pour une superficie de 69 km<sup>2</sup> (2845 habitants/m<sup>2</sup> ; Statbel, 2023). Elle a un climat océanique tempéré avec une moyenne annuelle de température de 11,2°C et une moyenne de 853 mm de précipitations totales annuelles. Le mois le plus chaud est le mois de juillet avec 19,3°C en moyenne et le plus froid est le mois de janvier avec 3,7°C en moyenne (Climat.be, 2019 ; IRM, 2021). Les 4 parcs choisis présentent un point d'eau permanent (étang) : il s'agit des parcs d'Avroy, de la Boverie, de Droixhe et du Jardin Botanique (Fig. 3).

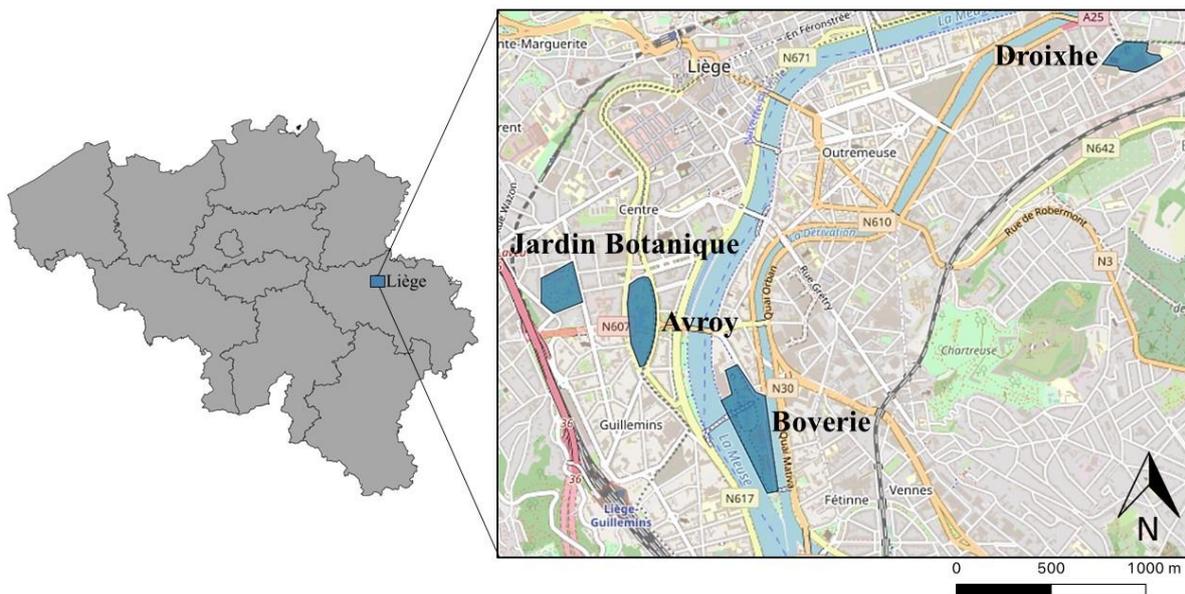


Figure 3 : Localisation des sites d'étude. Liège, Belgique. Modifié depuis OpenStreetMap <https://www.openstreetmap.org/>

### 2.2. Méthode d'échantillonnage

#### 2.2.1. Gîtes larvaires

Tous les points d'eau stagnante, temporaires ou permanents et de toutes tailles, ont été considérés comme de potentiels gîtes larvaires et ont été sondés pour la présence de larves et de pupes de Culicidae (Fig. 4). Nous avons utilisé la méthode de la louche : un poêlon en émail blanc de 15 cm de diamètre et de 7,5 cm de hauteur (00020807, Dille & Kamille, Utrecht, Pays-Bas) accroché au bout d'un manche en bois (Fig. 4 b,h) est utilisé pour prélever les larves dans les gîtes. Pour ceux de plus de 20 m<sup>2</sup> (les étangs), des louchées ont été

prélevées tout le long des berges en faisant attention à la présence de larves et en tentant de ne pas les effrayer. Deux louchées ont été prélevées dans chaque gîte de moins de 20 m<sup>2</sup>. Toutes les larves et pupes contenues dans une louche ont été collectées soit à l'aide d'une pipette pasteur, soit en les filtrant avec une épumette d'aquarium. Dans les gîtes trop petits pour prélever l'eau avec la louche, toute l'eau a été siphonnée à l'aide d'une pompe manuelle. Les larves ainsi collectées ont été triées en fonction du stade de développement. Les larves de 4<sup>ème</sup> stade ont été conservées dans de l'éthanol à 70% tandis que les stades inférieurs et les pupes ont été conservés dans de l'eau afin de les faire se développer jusqu'au stade 4 ou en adultes afin de les identifier. L'échantillonnage a été réalisé une semaine sur deux du 08/05/2023 (semaine 19 de 2023) au 07/07/2023 (semaine 27 de 2023), le lundi dans le parc de la Boverie, le mardi dans le parc d'Avroy, le jeudi dans le Jardin Botanique et le vendredi dans le parc de Droixhe.



Figure 4 : Exemples de gîtes larvaires retrouvés dans les parcs : (a) étang ; (b) égout ; (c) bac en plastique ; (d) bac en pierre ; (e) broméliacée ; (f) trou dans la terre ; (g) cavité d'arbre ; (h) bâche en plastique.

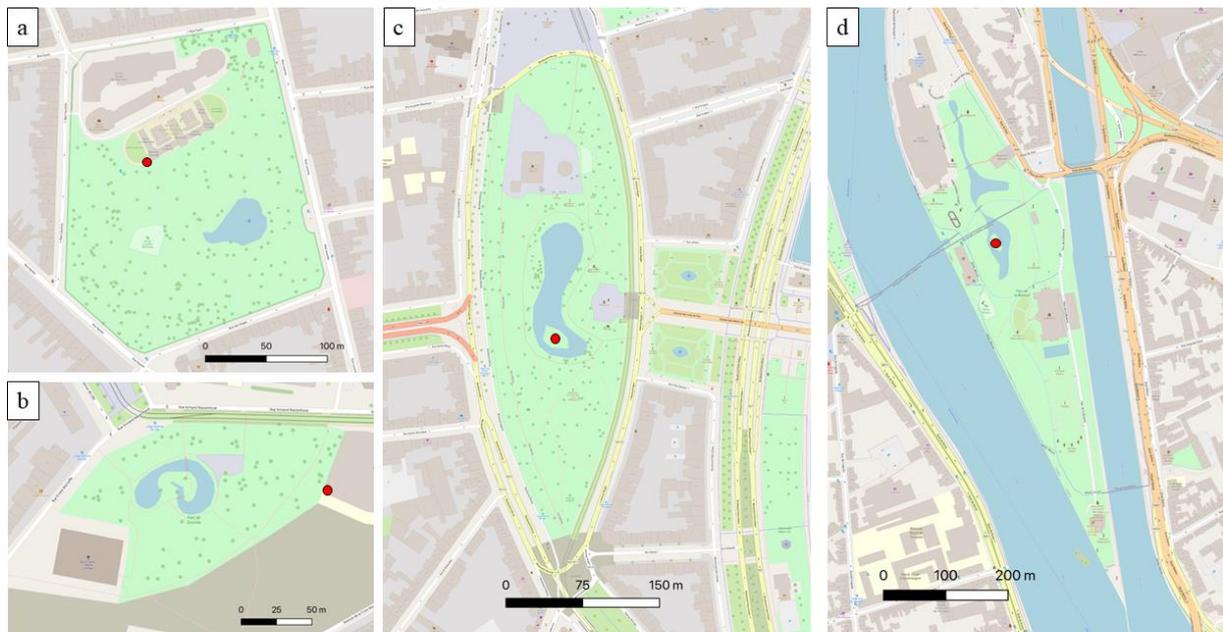
### 2.2.2. Pièges pondoirs

Afin de garantir la présence de gîtes similaires dans chaque parc à chaque récolte, 3 types de pièges pondoirs (PP) ont été créés, inspirés des méthodes décrites par Becker et al. (2010), Reiter (1991) et Wan-Norafikah et al. (2018).

Quatre gobelets noirs (3000687, Action, Zwaagdijk, Pays-Bas) de 5,5 cm de diamètre à la base, 8 cm de diamètre au sommet et 10 cm de hauteur sont placés dans une caisse en plastique peinte en noir (HOBOS G.E., Cosy&Trendy, Tielt, Belgique) de 26 cm de hauteur, 43 cm de longueur et 35,5 cm de largeur percée de trous à sa base pour éviter l'inondation de la caisse. Les gobelets sont remplis de 250mL d'une infusion de foin préparée selon la méthode décrite par Reiter (1991) : 500g de foin sont placés dans 60 L d'eau pendant 7 jours dans une cuve opaque hermétique (63,2 x 38,9 x 32,8 cm, Superplastic, Liège, Belgique). De plus, un trou est percé au-dessus de la surface de la solution (8,8 cm de hauteur) afin d'éviter les débordements en cas de fortes pluies. Il est recouvert d'une bande de gaze (Peha-Mullbinden, Hartmann, Heidenheim, Allemagne) pour éviter les pertes d'œufs et de larves. Une bande d'isorel (703007, Mr.Bricolage, Naninne, Belgique) de 10 cm x 2,5 cm est posée en oblique dans le gobelet, face rugueuse vers le haut pour servir de substrat pour la ponte des *Aedes*. Toutes les larves et les œufs des gobelets sont récoltés dans l'infusion et sur la bande d'isorel lors de la visite des parcs et l'infusion et les bandes d'isorel sont changées à chaque fois. Les œufs ont été récoltés pour les faire se développer afin de pouvoir les identifier. Les larves ont été conservées comme décrit ci-dessus.

En outre, deux seaux noirs de 20 L (RESE20M3, Superplastic, Liège, Belgique) sont placés dans chaque parc. L'un est rempli de 6 L d'eau du robinet et l'autre de 6 L d'infusion de foin. L'eau et l'infusion ne sont pas changées mais, en cas d'évaporation, elles sont portées à 6L avec de l'eau et de l'infusion respectivement. Deux louchées ont été prélevées dans chaque seau, à chaque visite et les larves ont été collectées comme décrit ci-dessus.

Les seaux et les gobelets ont été placés dans les parcs, à l'abri du public, à l'endroit le plus proche possible du point d'eau principal. Pour le parc d'Avroy et celui de la Boverie, ils ont été placés sur l'îlot au milieu de l'étang (Fig. 5c,d), au Jardin Botanique, ils ont été placés derrière les barrières, à côté des serres (Fig. 5a) et pour le parc de Droixhe, ils ont été placés sur le toit de l'école Léona Platel donnant sur le parc (Fig. 5b).



● Emplacements des pièges de ponte

Figure 5 : Emplacements des pièges de ponte dans les parcs. (a) Jardin Botanique, (b) Droixhe, (c) Avroy, (d) Boverie.

### 2.2.3. Échantillonnage des adultes

Les adultes ont été échantillonnés à l'aide de pièges à CO<sub>2</sub> (Executive, Mosquito Magnet, Lancaster, PA, USA) placés à l'abri du public, le plus près possible des étangs, au même endroit que les pièges pondoirs (Fig. 5). Comme pour les larves, l'échantillonnage s'est fait une semaine sur deux du 08/05/2023 au 07/07/2023. Les pièges étaient placés pendant 48h dans chaque parc : du lundi au mercredi dans les parcs d'Avroy et de la Boverie et du mercredi au vendredi dans le Jardin Botanique et dans le parc de Droixhe. Les moustiques ainsi capturés ont été tués en plaçant le panier récolteur du piège pendant 25 minutes dans un congélateur à -17°C puis ont été conservés dans de l'éthanol à 70%.

## 2.3. Identifications

Les larves de 4<sup>ème</sup> stade et les adultes ont été identifiés jusqu'à l'espèce sur base de traits morphologiques avec des clés taxonomiques (Becker et al., 2010) et le programme d'identification MousEurope (Schaffner et al., 2001).

## 2.4. Mesure des paramètres physicochimiques

Les mesures de température, de pH, d'électroconductivité (EC) et d'O<sub>2</sub> dissous (OD) ont été prises sur le terrain dans chaque gîte présentant des larves et/ou des pupes et dans certains gîtes ne présentant pas de larves à l'aide d'un analyseur multiparamètre (C562, Consort, Turnhout, Belgique ; sondes : ST10N, SP10T, SK10T, SZ20T). Les mesures ont été prises juste sous la surface de l'eau, là où se trouvent les larves au repos. Les mesures de luminosité,

quantifiée en irradiance (RAD), ont été prises avec un luxmètre portable (HD2302.0, DeltaOHM, Caselle di Selvazzano, Italie) en ciblant la surface de l'eau, à la verticale et à environ 5 cm au-dessus de la surface.

## 2.5. Détection et identification de *Wolbachia*

Pour la détection et l'identification de *Wolbachia*, des pontes de *Culex*, ont été prélevées dans les seaux servant de pièges pondoires dans les quatre parcs. Elles ont ensuite été élevées jusqu'au stade adulte où l'identification de l'espèce a été faite morphologiquement sur les mâles comme décrit ci-dessus. La détection et l'identification de *Wolbachia* a été faite sur les femelles *Cx. pipiens*. L'ADN total des femelles a été extrait avec le kit DNeasy Blood & Tissue selon le protocole du kit et conservé à -20°C en vue de l'amplification par PCR. Les primers 183F: 5'-AAGGAACCGAAGTTCATG-3' et 691R : 5'-AAAATTAACGCTACTCCA-3' ont été utilisés pour amplifier le gène de la protéine de surface de *Wolbachia* : *wsp* (Bozorg-Omid et al., 2020 ; Zhou et al., 1998). La PCR a été réalisée avec l'enzyme Q5 du kit High-Fidelity PCR. Les conditions de PCR sont les suivantes : 30 s de dénaturation à 98°C suivie de 35 cycles de 10 s à 98°C, 30 s à 58°C, 30 s à 72°C. Après les 35 cycles, 2 min d'élongation à 72°C. Un extrait d'ADN total de *Drosophila melanogaster* Meigen 1830 a été utilisé comme témoin négatif. Les amplicons obtenus, faisant 501bp, ont été séquencés dans les deux sens (*forward* et *reverse*), afin de garantir la robustesse du séquençage, par méthode de Sanger par Eurofins Genomics (Ebersberg, Allemagne). Les séquences ont ensuite été éditées grâce au programme Serial Cloner 2.6.1 (Perez, 2013) et les séquences consensus, ainsi obtenues, ont été alignées avec des séquences de *Wolbachia* disponibles dans la base de données NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) dans le programme Mega version 11 (Tamura et al., 2021). Pour l'analyse phylogénétique, l'histoire évolutive a été inférée en utilisant la méthode du Neighbor-joining.

## 2.6. Analyses des données

### 2.6.1. Communautés

Tous les tests statistiques et les modèles ont été réalisés dans le programme R 4.3.0 (R Core Team, 2023). Pour évaluer la qualité d'échantillonnage, nous avons tracé une courbe d'accumulation des espèces à l'aide du package *vegan* (Oksanen et al., 2022). Pour estimer le nombre d'espèces totales par parc, nous avons utilisé l'estimateur de Chao via la fonction *specpool* du package *vegan* (Oksanen et al., 2022).

Pour comparer les données d'abondance de *Cx. pipiens* (non normales), nous avons utilisé le test non paramétrique de Kruskal-Wallis et lorsque celui-ci était significatif, nous avons utilisé le test post-hoc de Dunn pour les comparaisons par paires via les fonctions *kruskal.test* et *dunn.test* de R et du package *dunn.test* (Dinno, 2017).

### **2.6.2. Données météorologiques**

Les données météorologiques ont été relevées par la station météorologique de la Boverie, Liège (50°37'58.8"N 5°34'58.8"E) et récupérées sur le site <https://www.historique-meteo.net/>. Afin d'évaluer l'influence de la météo sur l'abondance de *Cx. pipiens* dans les parcs, pour chaque semaine d'échantillonnage, nous avons calculé les températures moyennes sur deux semaines : la semaine d'échantillonnage et la semaine précédente. De la même manière, les précipitations totales ont, à chaque fois, été calculées sur ces deux semaines. Ensuite, la relation entre le nombre de *Cx. pipiens* récoltés par parc/par semaine et les températures moyennes ainsi que les précipitations totales ont été évaluées à l'aide de la corrélation de Pearson via la fonction *cor.test* de R.

### **2.6.3. Paramètres physicochimiques**

Les corrélations entre les variables physicochimiques ont été calculées par la méthode non-paramétrique de Spearman via la fonction *cor.test* de R.

Nous avons effectué une analyse en composantes principales (ACP) grâce au package *FactoMineR* (Husson et al., 2023) pour évaluer si les différents types de gîtes présentaient des caractéristiques physicochimiques différentes.

Les comparaisons des variables par type de gîte ont été faites grâce au test de Kruskal-Wallis et au test de Wilcoxon-Mann-Whitney via les fonctions *kruskal.test* et *wilcox.test* de R.

Deux modèles ont été ajustés afin d'évaluer l'influence des paramètres physicochimiques sur la densité et sur la présence et de *Cx. pipiens* dans les points d'eau. Les variables physicochimiques, d'ordres de grandeur bien différents, ont été standardisées avec la fonction *scale* de R pour les deux modèles.

Pour évaluer l'influence des paramètres physicochimiques des gîtes sur la densité de *Cx. pipiens*, nous avons ajusté un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM) via la fonction *glm* et selon une distribution de Poisson avec le nombre de *Cx. pipiens* en variable indépendante. Nous avons pris comme variables explicatives le logarithme de l'OD et de l'irradiance - dont les distributions étaient trop asymétriques - la température, le pH, l'EC ainsi que le carré du pH et de l'EC pour tenir compte d'un potentiel effet de maximum ou de minimum de ces

variables. Le choix d'utiliser ces variables transformées pour le modèle a été fait suite au fait que le modèle ajusté en utilisant les variables uniquement de manière linéaire a montré une faible capacité à produire des coefficients significatifs. Seuls les points d'eau où nous avons retrouvé des larves ont été sélectionnés pour cette analyse.

Pour évaluer l'influence des paramètres physicochimiques sur la probabilité de retrouver des *Cx. pipiens* dans un gîte, nous avons ajusté une régression logistique où la variable dépendante est la présence de *Cx. pipiens* (0 = absence, 1 = présence) et les variables explicatives sont une combinaison de paramètres physicochimiques. Nous avons utilisé la fonction *bestglm* du package *bestglm* (McLeod & Lai, 2020) pour déterminer le meilleur modèle avec comme critère de sélection, le critère d'information d'Akaike (AIC) des modèles. Pour tenir compte du potentiel effet d'un maximum ou d'un minimum dans les variables explicatives, nous avons aussi pris les carrés des variables en variables explicatives. Pour ce modèle, nous avons sélectionné tous les points d'eau, avec et sans larves.

## 3. Résultats

### 3.1. Résultats généraux

Au total, 12 526 moustiques ont été collectés et identifiés dont 116 dans les Mosquito Magnet, 3782 dans les pièges pondoirs et 8798 dans 108 gîtes larvaires de 9 types différents retrouvés dans les parcs (Tab. 1). En dehors des PP, 39 gîtes larvaires de trois types ont été identifiés dans le parc d'Avroy (Fig. 6a), 43 de deux types pour la Boverie (Fig. 6b), 30 de cinq types pour le Jardin botanique (Fig. 6c) et seulement 4 de trois types pour le parc de Droixhe (Fig. 6d).

Tableau 1 : Nombre de gîtes dans lesquels des larves/pupes ont été retrouvées et total de larves et pupes échantillonnées par type de gîtes.

	Étang	Égout	Bac en plastique	Bac en pierre	Bâche	Cavité d'arbre
<b>Nombre de gîtes échantillonnés</b>	1	62	12	15	9	4
<b>Nombre de larves/pupes</b>	4	5726	1089	132	1218	347

	Pièges pondoirs			Trou dans la terre	Flaque d'eau	Broméliacée
	Eau claire	Infusion de foin	Gobelets			
<b>Nombre de gîtes échantillonnés</b>	4	4	4	2	1	2
<b>Nombre de larves/pupes</b>	253	1958	1571	23	16	243

Nous avons identifié 10 espèces de Culicidae reprises dans le tableau 2. L'espèce *Culex pipiens*, vecteur principal du VNO en Europe (Vogels et al., 2017), représente l'écrasante majorité des individus échantillonnés (95,6% de l'échantillonnage total). *Culiseta annulata* est la deuxième espèce la plus représentée avec 4% des individus totaux. Toutes les autres espèces cumulées ne représentent même pas 1% de l'échantillonnage total (Fig. 7).

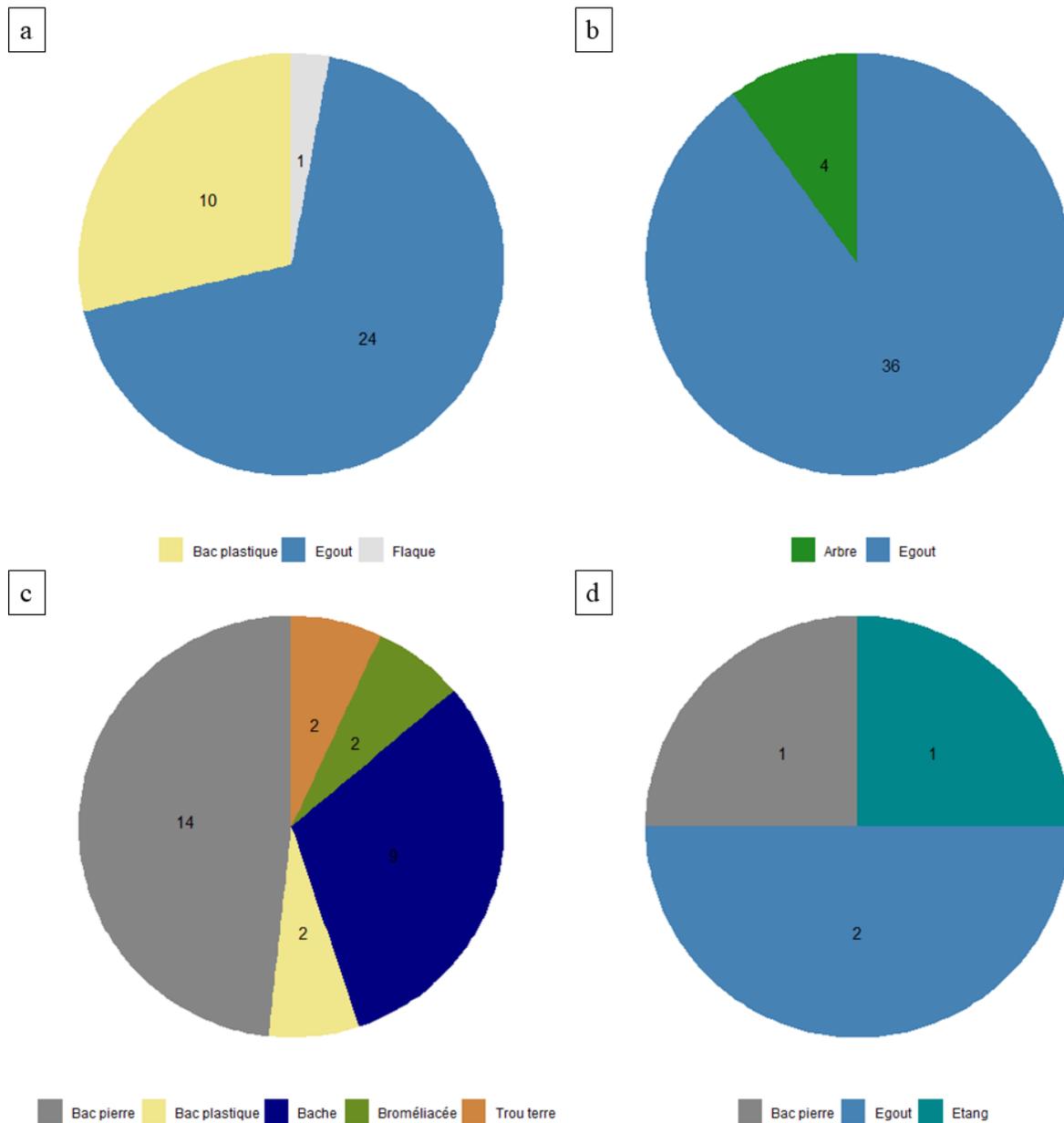


Figure 6 : Quantités de gîtes larvaires identifiés retrouvés dans chaque parc par type. (a) Parc d'Avroy, (b) Parc de la Boverie, (c) Jardin Botanique, (d) Parc de Droixhe. Le nombre dans les quartiers est le nombre de gîtes larvaires différents d'un même type relevés dans un parc.

La figure 8 montre l'évolution du nombre de *Cx. pipiens* collectés dans les quatre parcs sur les cinq semaines d'échantillonnage. Le nombre de *Cx. pipiens* collectés varie selon le parc et la semaine de collecte. Globalement, ce nombre a tendance à augmenter pour l'ensemble des parcs tout au long de la période d'échantillonnage. Cependant, individuellement, les parcs suivent une évolution différente.

Tableau 2 : Nombre total d'individus collectés par espèce dans quel(s) parc(s) et type(s) de gîtes(s) larvaire(s) ou Mosquito Magnet.

	<b>Nombre total d'individus collectés (% du total)</b>	<b>Retrouvé(s) dans quel(s) Parc(s)</b>	<b>Type de gîtes ou Mosquito Magnet (MM)</b>
<i>Cx. pipiens</i>	11 971 (95,6 %)	Tous	Tous sauf étang.
<i>Cx. torrentium</i>	16 (0,1 %)	Avroy, Boverie, Jardin Botanique	Égout, bac en pierre, bâche, MM.
<i>Cx. territans</i>	3 (<0,1 %)	Jardin Botanique	Bac en pierre.
<i>Cx. hortensis</i>	2 (<0,1 %)	Avroy	PP eau claire.
<i>Cs. annulata</i>	522 (4%)	Tous	Égout, PP eau claire, PP infusion, bac en plastique, bac en pierre, bâche, MM.
<i>Cs. morsitans</i>	1 (<0,1 %)	Boverie	MM.
<i>An. maculipennis complexe</i>	6 (<0,1 %)	Avroy, Boverie, Droixhe	Étang, MM.
<i>An. plumbeus</i>	3 (<0,1 %)	Boverie, Jardin Botanique	MM.
<i>An. claviger</i>	1 (<0,1 %)	Avroy	PP gobelet.
<i>Ae. cinereus</i>	1 (<0,1 %)	Avroy	MM.

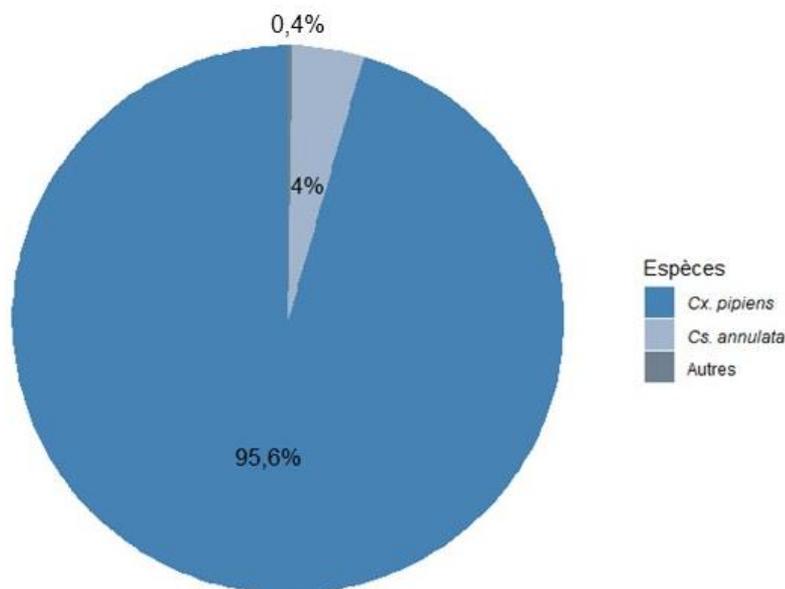


Figure 7 : Abondances relatives des espèces retrouvées.

Le calcul des corrélations de Pearson a montré une corrélation positive significative entre l'abondance de *Cx. pipiens* par semaine et la température moyenne extérieure (Fig. 9) dans le parc de la Boverie ( $r = 0,90$  ;  $p\text{-val} = 0,035$ ). Toutes les autres corrélations sont positives mais non-significatives : ensemble des quatre parcs ( $r = 0,61$  ;  $p\text{-val} = 0,273$ ), Avroy ( $r = 0,39$  ;  $p\text{-val} = 0,517$ ), Botanique ( $r = 0,34$  ;  $p\text{-val} = 0,573$ ), Droixhe ( $r = 0,77$  ;  $p\text{-val} = 0,230$ ). Aucune relation significative n'a été trouvée entre les précipitations et l'abondance de *Cx. pipiens*.

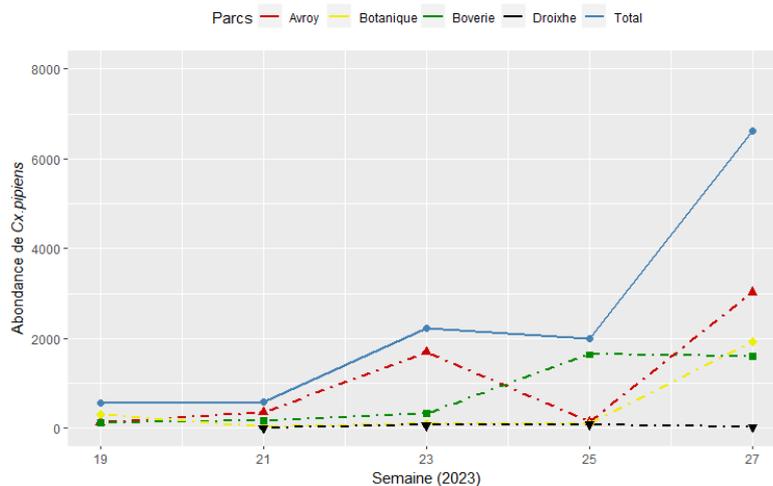


Figure 8 : Abondance de *Cx. pipiens* récoltés par semaine dans chaque parc et total pour l'ensemble des parcs.

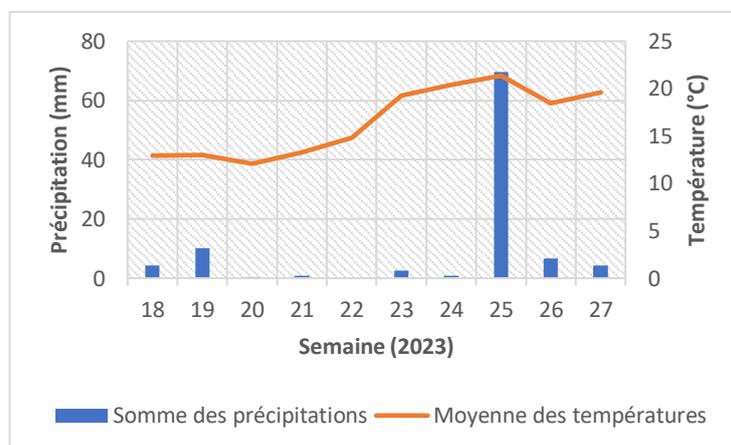


Figure 9 : Températures moyennes et précipitations totales par semaine sur la période d'échantillonnage à Liège. Données collectées par la station météo de la Boverie, Liège (50°37'58.8"N 5°34'58.8"E).

La courbe d'accumulation (Fig. 10) n'atteint pas l'asymptote, ce qui veut dire que l'on n'aurait pas atteint le nombre d'espèces total et qu'avec un effort d'échantillonnage plus grand, on devrait retrouver plus d'espèces. Cependant, l'inclinaison de la fin de la courbe se rapproche d'un plateau, ce qui montre que l'effort d'échantillonnage devrait être bien plus grand pour détecter d'autres espèces. Ceci s'explique par le fait qu'une espèce est surreprésentée et que toutes les autres sont alors des espèces rares. C'est aussi pourquoi l'estimateur de chao, qui accorde une importance aux espèces rares, indique que le nombre d'espèces total devrait s'approcher de 20 espèces (chao = 19,96, écart-type = 10,13).

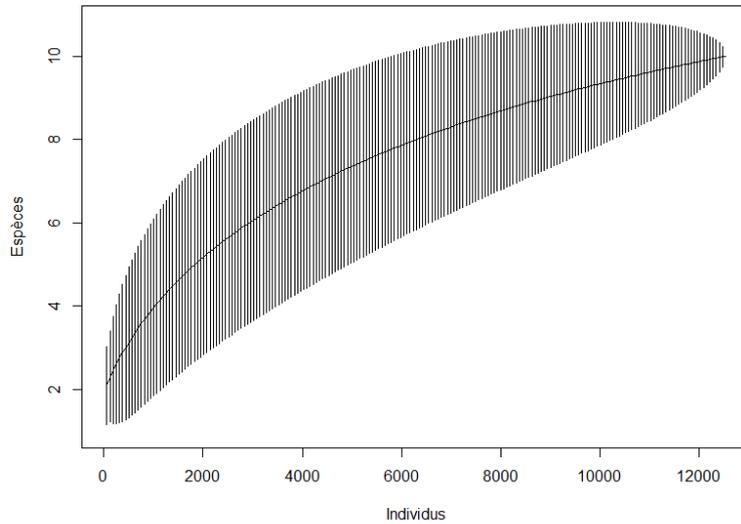


Figure 10 : Courbe d'accumulation des espèces de Culicidae de l'ensemble des parcs selon l'effort d'échantillonnage (nombre d'individus collectés) obtenue selon la méthode de raréfaction.

### 3.2. Communautés de Culicidae des différents parcs

Le parc d'Avroy montre la plus grande richesse spécifique (7), suivi du parc de la Boverie (6), du Jardin Botanique (5) et de Droixhe (3) (Fig. 11). Le nombre d'espèces relevées ainsi que l'estimation du nombre d'espèces total sont repris en annexe dans le Tableau S1.

Étant donné que le nombre de *Cx. pipiens* écrase totalement le nombre d'individus des autres espèces, nous avons décidé de calculer l'abondance des *Cx. pipiens* uniquement. Au total, 5428 (dont 64 dans les MM) *Cx. pipiens* ont été capturés dans le parc d'Avroy, 3885 (22 MM) dans le parc de la Boverie, 2474 (12 MM) dans le Jardin Botanique et 184 (8 MM) dans le parc de Droixhe (Fig. 12).

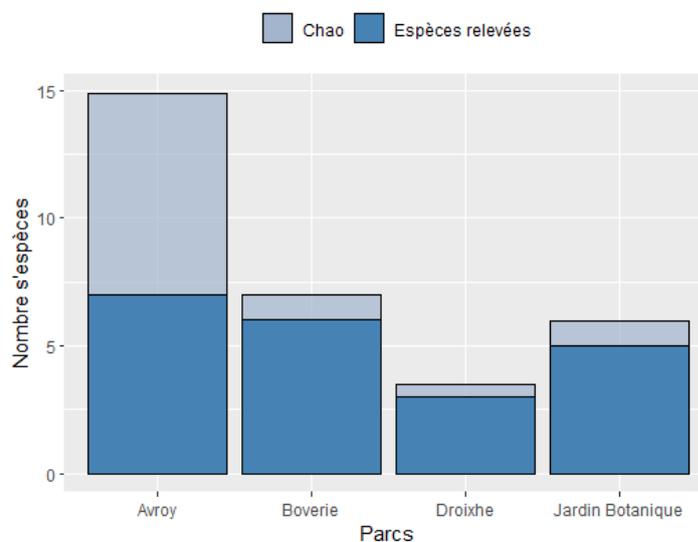


Figure 11 : Nombre d'espèces relevées par parc et estimateurs de Chao.

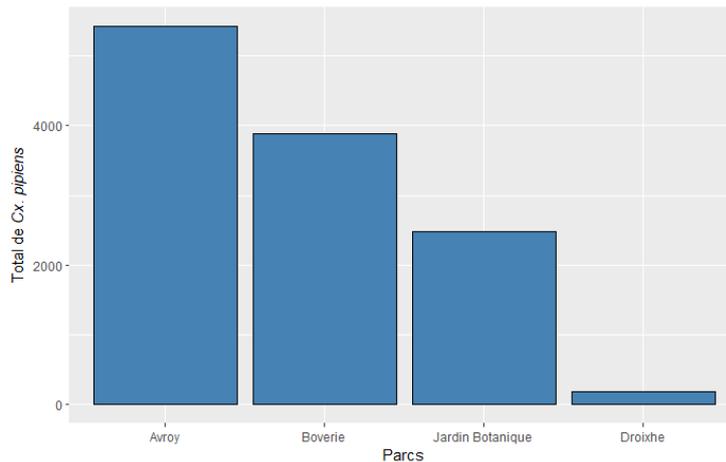


Figure 12 : Nombre total de *Cx. pipiens* par parc (gîtes + MM).

La densité de *Cx. pipiens* par gîtes et MM semble plus élevée dans les parcs d'Avroy et de la Boverie que dans les deux autres (Fig. 13). Ceci se vérifie par le test de Kruskal-Wallis qui montre qu'il y a une différence significative entre les densités de *Cx. pipiens* dans les gîtes et MM des différents parcs ( $\chi^2 = 25,175$  ; p-val =  $1,42 \times 10^{-5}$ ). De plus, le test post-hoc de Dunn a permis de montrer que ces densités sont similaires entre les parcs d'Avroy et de la Boverie et entre le parc de Droixhe et le Jardin Botanique mais qu'elles sont plus élevées dans les deux premiers que dans les deux derniers (Tab. 3).

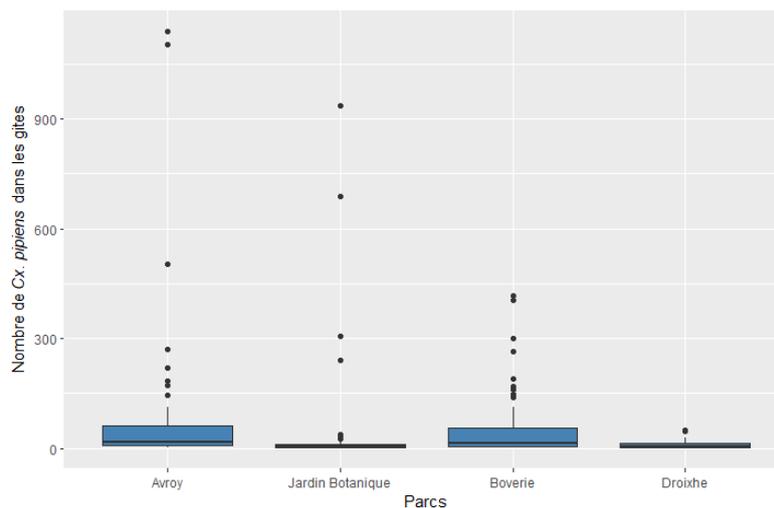


Figure 13 : Densité de *Cx. pipiens* des gîtes par parc. Les rectangles sont tracés du premier au troisième quartile et sont coupés par la médiane. Le segment supérieur va du 3<sup>ème</sup> quartile à la valeur la plus grande ne dépassant pas le 3<sup>ème</sup> quartile de 1,5 fois l'écart interquartile. Le segment inférieur va du 1<sup>er</sup> quartile à la valeur la plus basse ne dépassant pas le 1<sup>er</sup> quartile de 1,5 fois l'écart interquartile. Les points sont les valeurs extrêmes qui dépassent ces segments.

Tableau 3 : Résultats du test de Dunn. Une case présente le résultat de la comparaison via le test Z de Dunn d'un type (colonne) avec un autre (ligne) ainsi que la p-valeur. \* montre une différence significative ( $\alpha = 0,05$ ).

Différence entre la moyenne des colonnes et la moyenne des lignes	Avroy		Jardin Botanique		Boverie	
	Z	p-val	Z	p-val	Z	p-val
Jardin Botanique	4,497	0,000*				
Boverie	1,534	0,062	-3,175	0,001*		
Droixhe	3,134	0,001*	0,066	0,474	2,220	0,013*

### 3.3. Communautés des différents types de gîtes

La richesse spécifique est la plus élevée dans les bacs en pierre (4 espèces), ensuite dans les bâches, les PP eau claire et les égouts (3), puis dans les bacs en plastique, les PP infusion et les gobelets (2). Quant aux cavités d'arbres, broméliacées, étang, flaques et trous dans la terre, ils ne présentent qu'une seule espèce (Fig. 14).

La densité de *Cx. pipiens* par type de gîte est reprise dans la figure 15. Le test de Kruskal-Wallis montre une différence entre les types de gîtes ( $\chi^2 = 20,524$  ; p-val = 0,025). Le test de Dunn montre que ces différences sont dues à 2 types de gîtes avec une faible densité. Les bacs en pierre ont une densité moyenne plus faible que les bacs en plastique ( $Z = -3,26$  ; p-val < 0,001), que les égouts ( $Z = -3,78$  ; p-val < 0,001), que les PP d'eau claire ( $Z = -1,83$  ; p-val = 0,034), que les PP d'infusion ( $Z = -2,82$  ; p-val = 0,002) et que les PP gobelets ( $Z = -2,98$  ; p-val = 0,001). Les trous dans la terre ont une densité plus faible que les bacs en plastique ( $Z = -1,89$  ; p-val = 0,029), que les égouts ( $Z = -1,79$  ; p-val = 0,037), que les PP gobelets ( $Z = 1,79$  ; p-val = 0,037) et infusion ( $Z = 1,68$  ; p-val = 0,047).

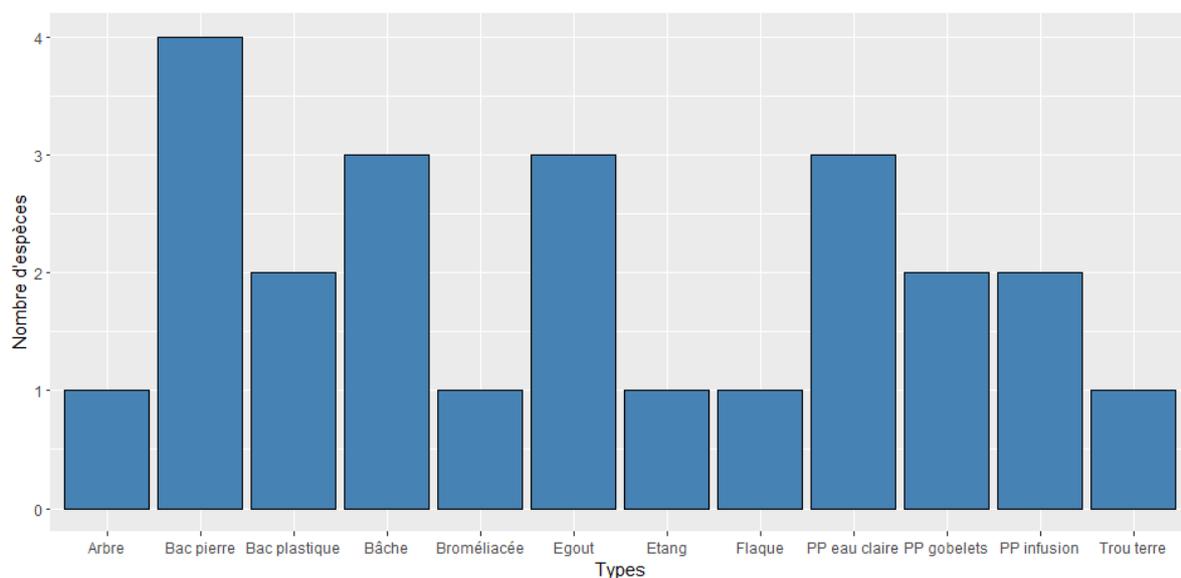


Figure 14 : Richesse spécifique de Culicidae des parcs de Liège par type de gîtes.

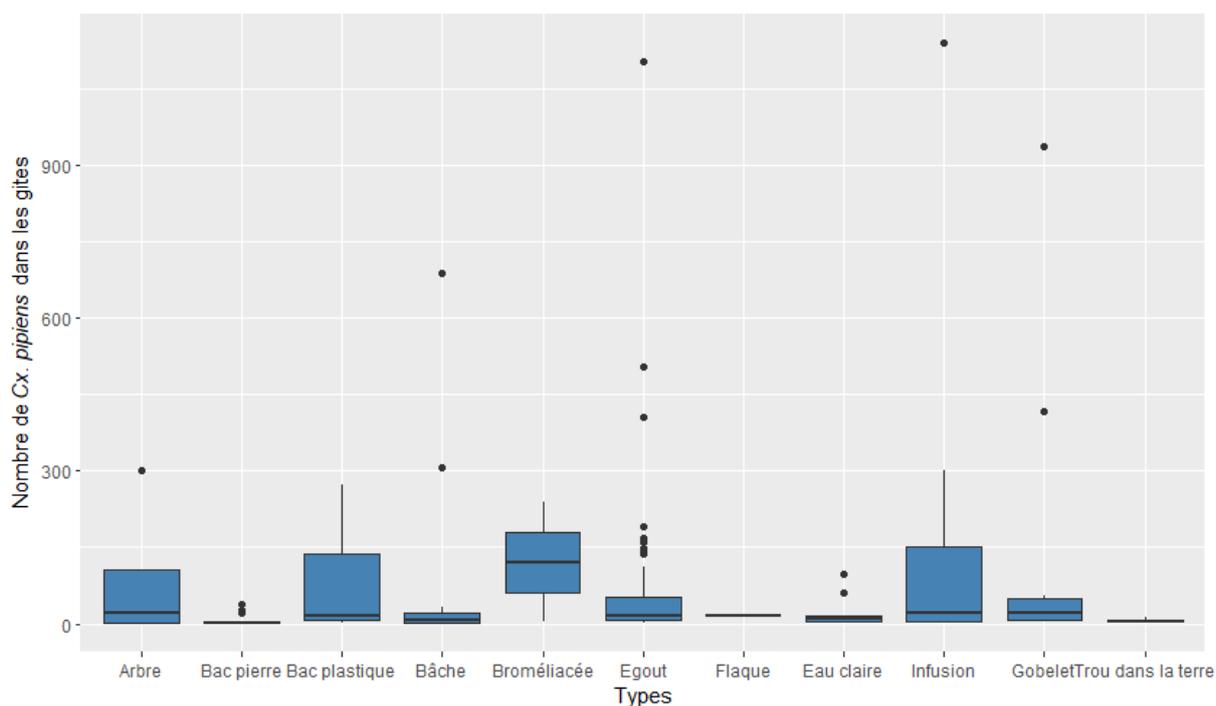


Figure 15 : Densité de *Cx. pipiens* par type de gîte. Les rectangles sont tracés du premier au troisième quartile et sont coupés par la médiane. Le segment supérieur va du 3<sup>ème</sup> quartile à la valeur la plus grande ne dépassant pas le 3<sup>ème</sup> quartile de 1,5 fois l'écart interquartile. Le segment inférieur va du 1<sup>er</sup> quartile à la valeur la plus basse ne dépassant pas le 1<sup>er</sup> quartile de 1,5 fois l'écart interquartile. Les points sont les valeurs extrêmes qui dépassent ces segments.

### 3.4. Paramètres physicochimiques des gîtes

Les paramètres physicochimiques des gîtes sont illustrés dans la figure 17. Seul le pH, l'OD et le RAD sont statistiquement différents pour les types de gîtes (Kruskal-Wallis : pH :  $\chi^2 = 107,72$ , p-val < 0,001 ; OD :  $\chi^2 = 95,90$ , p-val < 0,001 ; RAD :  $\chi^2 = 73,84$ , p-val < 0,001). Les différences de ces paramètres entre les types de gîtes (test de Dunn) sont reprises en annexe dans les tableaux S2 – S4.

Les corrélations entre les paramètres physicochimiques sont reprises dans la figure 16. L'EC n'est corrélée à aucune variable. L'OD et le pH ne sont pas corrélés ensemble mais sont bien corrélés positivement à la température et à la luminosité. Ces dernières sont, en plus, corrélées positivement entre elles.

L'ACP (Fig. 18) nous montre que les 2 premières composantes principales (CP) expliquent 35% et 21% de la variance totale, soit 56% de variance cumulée. Leurs formules sont : CP1 =  $0,621 \text{ pH} + 0,036 \text{ EC} + 0,678 \text{ OD} + 0,690 \text{ Température} + 0,653 \text{ RAD}$  ; CP2 =  $-0,031 \text{ pH} + 0,953 \text{ EC} + 0,160 \text{ OD} + 0,119 \text{ Température} - 0,314 \text{ RAD}$ . Le cercle de corrélation (Fig. 19) indique que la première CP est corrélée positivement au pH, à l'OD, à la température et à la luminosité tandis que la seconde est fortement corrélée positivement à l'EC, ce qui est

cohérent avec la corrélation des variables entre elles. L'ACP permet de regrouper les types de gîtes en fonction de leurs paramètres.

Bien que certains types soient un peu plus étalés sur la deuxième CP, tous ont des valeurs semblables sur cet axe. En effet, les médianes d'EC des groupes sont semblables pour tous les types (Kruskal-Wallis :  $\chi^2 = 5,81$  ; p-val = 0,832).

Les égouts ont plutôt des valeurs faibles sur la première CP par rapport aux autres gîtes (test de Wilcoxon :  $W = 1399$  ; p-val < 0,001), ce qui indiquerait que la combinaison des valeurs de pH, d'OD, de température et de luminosité est plus faible pour ces gîtes.

Les étangs, quant à eux, ont des valeurs plus élevées sur la première CP comparée aux autres ( $W = 2137$ , p-val < 0,001). Les bacs en pierre présentent aussi, sur la première CP, une médiane plus élevée que la médiane de tous les autres ( $W = 3908$ , p-val < 0,001). Idem pour les bâches ( $W=1758$ , p-val < 0,001). Ceci indiquerait que la combinaison des valeurs de pH, d'OD, de température et de luminosité de ces gîtes est globalement plus élevée que l'ensemble des autres gîtes.

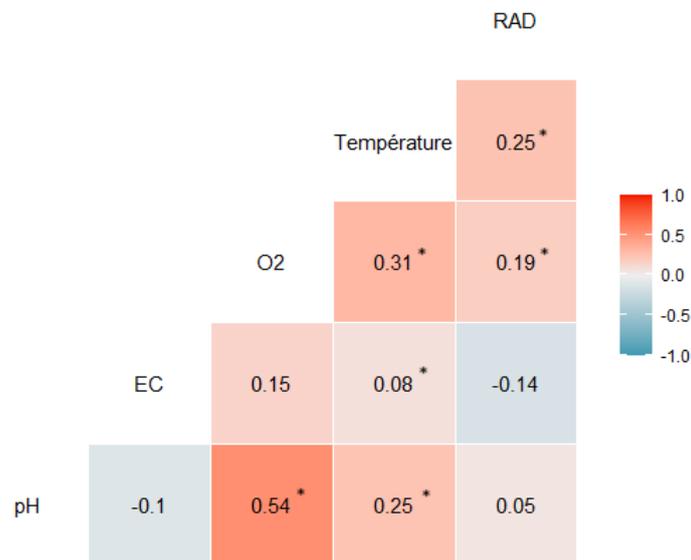


Figure 16 : Corrélations entre les paramètres physicochimiques. Une tuile comprend le coefficient de corrélation de Spearman. \* indique une valeur significative à  $\alpha = 0,05$ .

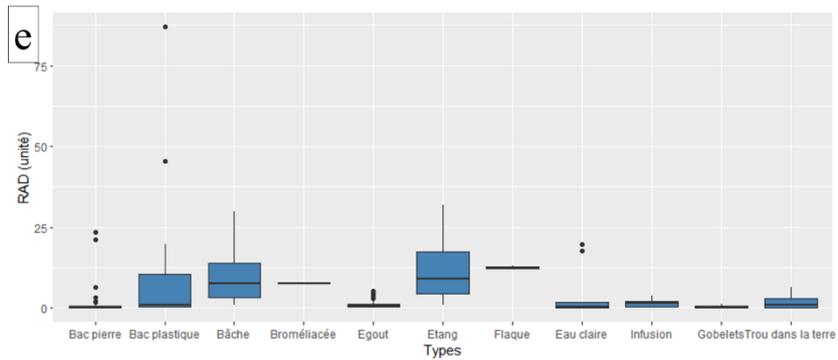
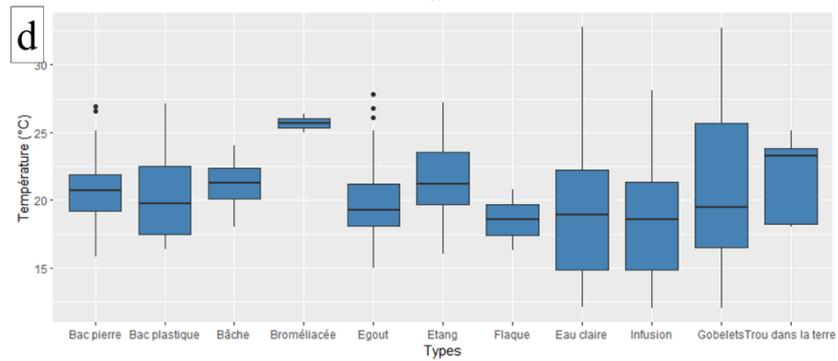
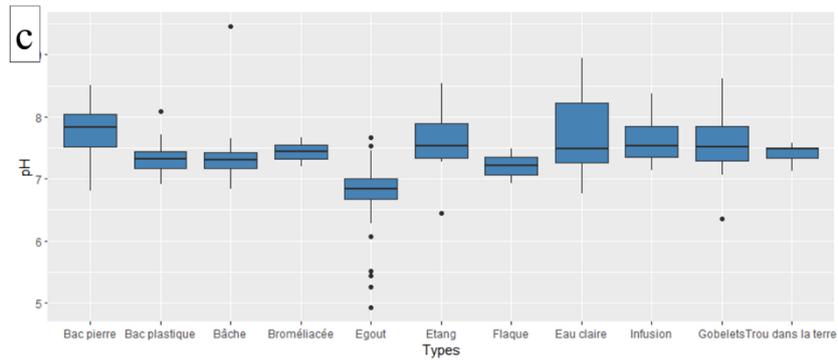
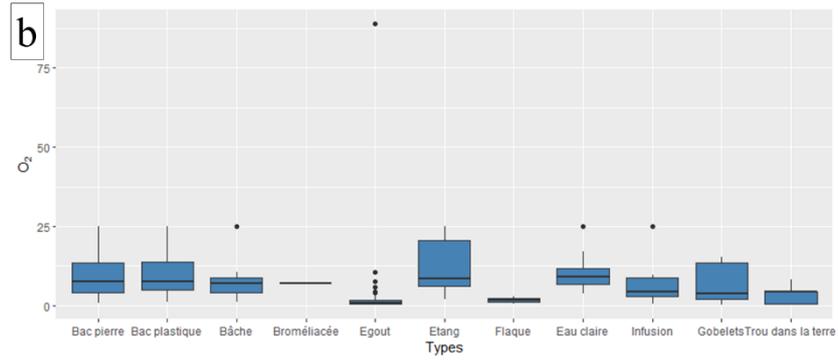
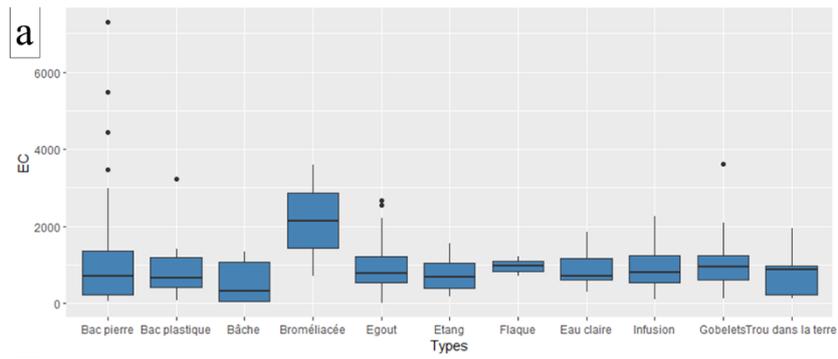


Figure 17 : Représentation en boîtes à moustaches des paramètres physicochimiques ((a) EC ; (b) OD ; (c) pH, (d) température ; (e) RAD) des gîtes larvaires des parcs de Liège. Les rectangles sont tracés du premier au troisième quartile et sont coupés par la médiane. Le segment supérieur va du 3<sup>ème</sup> quartile à la valeur la plus grande ne dépassant pas le 3<sup>ème</sup> quartile de 1,5 fois l'écart interquartile. Le segment inférieur va du 1<sup>er</sup> quartile à la valeur la plus basse ne dépassant pas le 1<sup>er</sup> quartile de 1,5 fois l'écart interquartile. Les points sont les valeurs extrêmes qui dépassent ces segments.

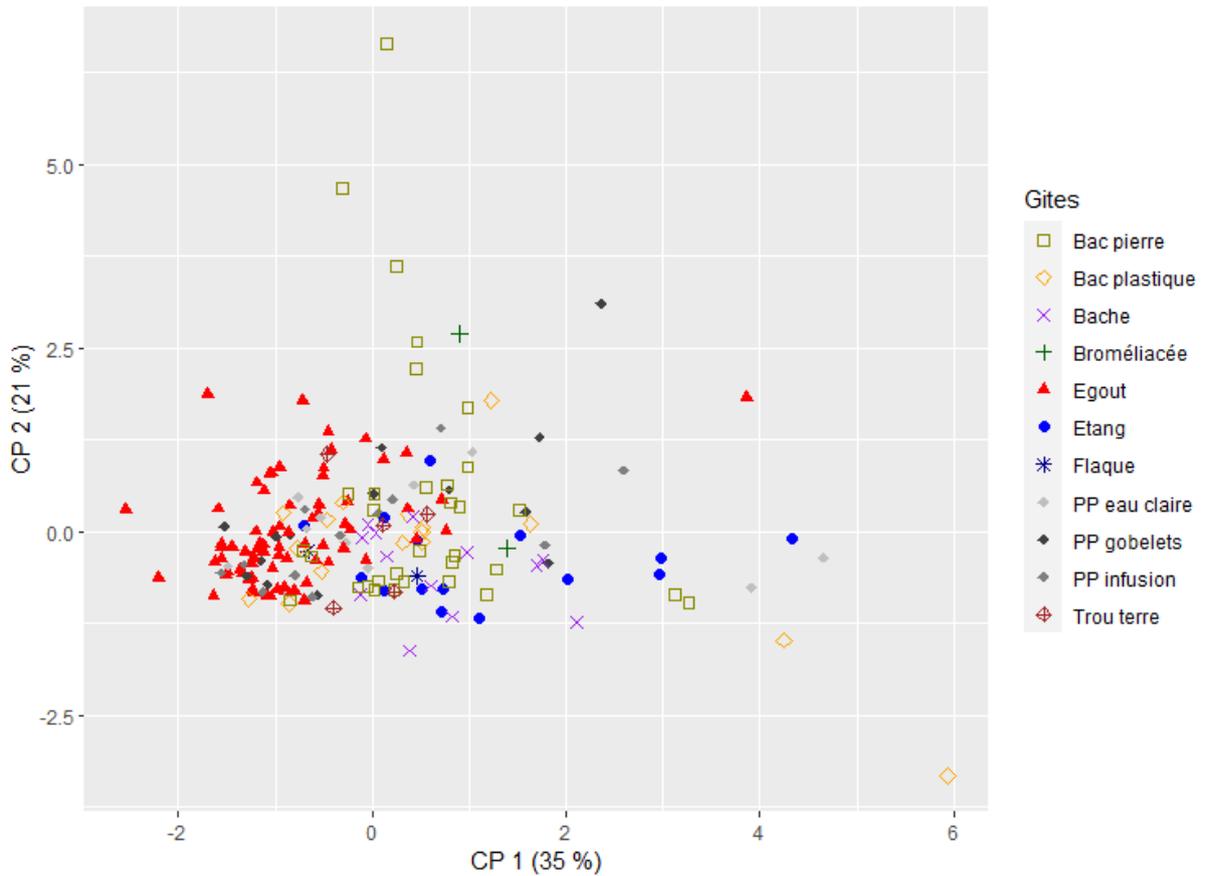


Figure 18 : Analyse en composantes principales des paramètres des gîtes. La 1<sup>ère</sup> composante principale est portée en abscisse et explique 35% de la variance totale. La 2<sup>ème</sup> composante principale est portée en ordonnée et explique 21% de la variance totale.

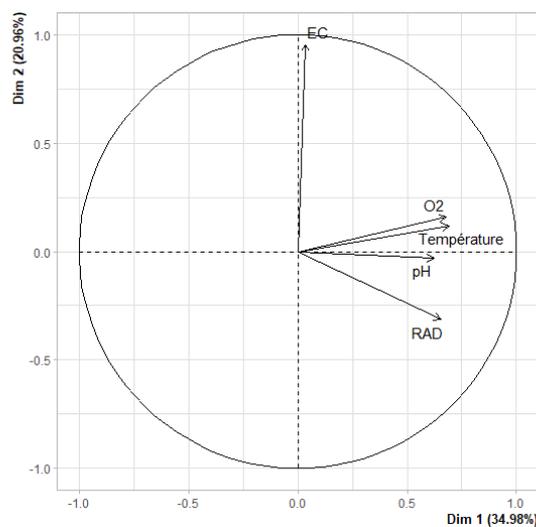


Figure 19 : Cercle de corrélation des deux premières composantes principales de l'ACP sur les paramètres des gîtes. Les flèches sont tracées du centre du cercle (0;0) au coefficient de corrélation de Pearson de chaque variable avec la 1<sup>ère</sup> CP en abscisse et la 2<sup>ème</sup> CP en ordonnée.

### 3.5. Influence des paramètres physicochimiques

Étant donné que le nombre de *Cx. pipiens* écrase totalement le nombre d'individus des autres espèces, nous avons décidé de calculer uniquement les modèles pour *Cx. pipiens*. Pour évaluer l'influence des paramètres physicochimiques sur les populations de *Cx. pipiens* dans les parcs, nous avons construit un modèle linéaire généralisé mixte (GLMM) pour leur influence sur la densité de *Cx. pipiens* (Tab. 4) par gîte mais aussi une régression logistique pour la probabilité de retrouver des larves de *Cx. pipiens* dans un gîte (Tab. 5).

#### 3.5.1. Influence sur la densité de *Cx. pipiens* dans les gîtes

Tous les paramètres sont des variables significatives pour le modèle (Tab. 4). La température influence négativement la densité (Fig. 20f). Le logarithme de l'O<sub>2</sub> dissous et de l'irradiance l'influence positivement (Fig. 20c,e). Le pH et l'EC ont un effet linéaire et quadratique (Fig. 20b,d). Pour apprécier la qualité du modèle, un graphique de la densité prédite par le modèle en fonction de la densité observée a été tracé (Fig. 20a).

Tableau 4 : Modèle linéaire généralisé mixte (distribution de Poisson) inférant la densité de *Cx. pipiens* dans un gîte larvaire. Les variables sont les paramètres physicochimiques et les transformations de ceux-ci utilisés pour le modèle. Les coefficients représentent la contribution de chaque paramètre sur la densité de *Cx. pipiens*. La z-valeur est obtenue en divisant le coefficient par l'écart-type. La p-valeur permet d'apprécier la significativité du coefficient dans le modèle. \* indique une p-valeur significative ( $\alpha = 0,05$ ).

Variable	Coefficient	Écart-type	z-val	p-val
<b>Intercept</b>	- 41.51	2.29	-18.10	<2e-16*
<b>pH</b>	13.61	0.63	21.61	<2e-16*
<b>pH<sup>2</sup></b>	- 0.96	0.04	-22.09	<2e-16*
<b>EC</b>	1.30e-03	3.46e-05	37.56	<2e-16*
<b>EC<sup>2</sup></b>	- 2.23e-07	7.78e-09	-28.76	<2e-16*
<b>log(O<sub>2</sub>)</b>	0.39	0.01	37.22	<2e-16*
<b>Température</b>	- 0.18	4.19e-03	-43.21	<2e-16*
<b>log(RAD)</b>	0.17	8.49e-03	20.12	<2e-16*

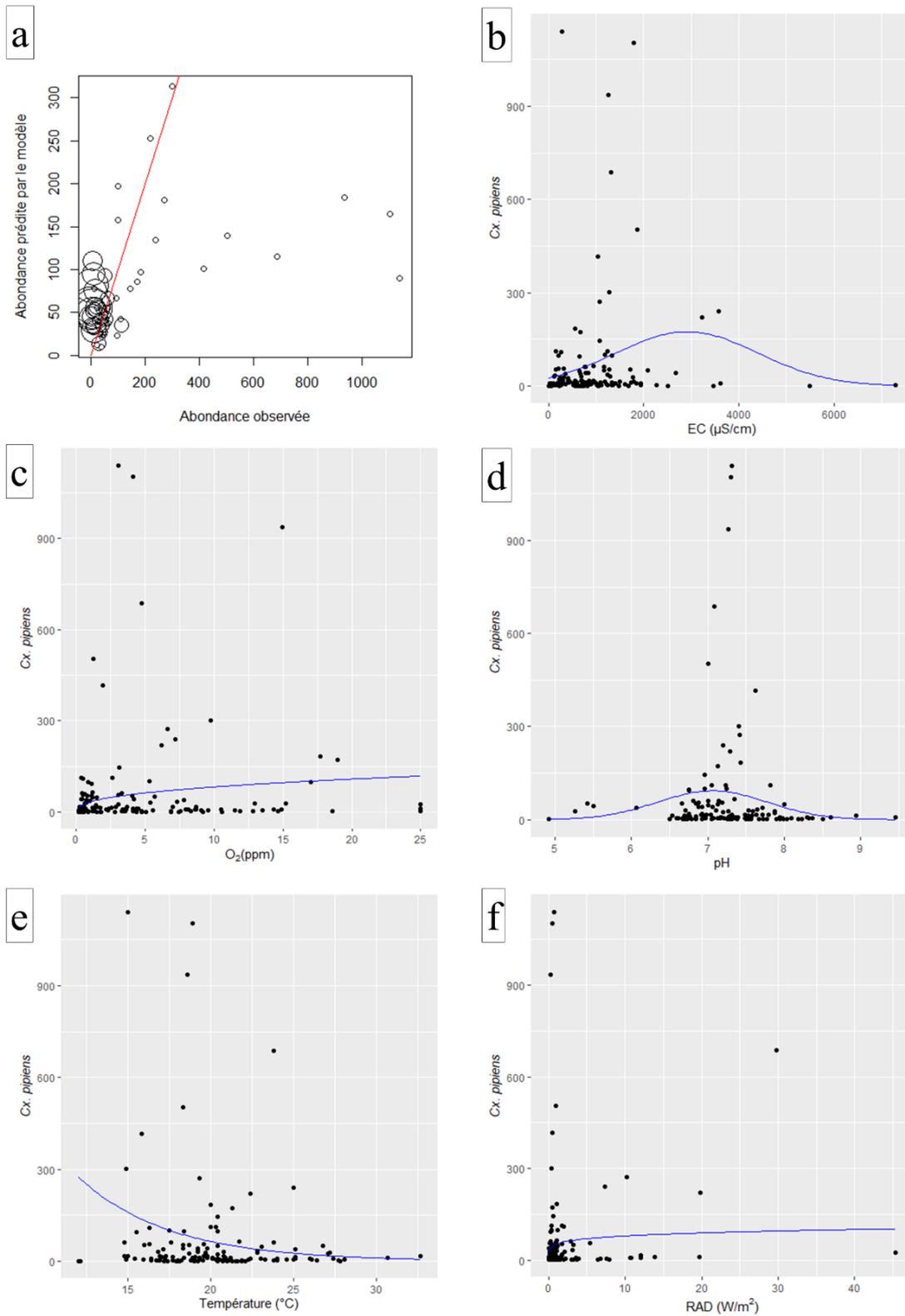


Figure 20 : Représentations graphiques du modèle linéaire généralisé mixte sur la densité de *Cx. pipiens* dans les parcs urbains de Liège. (a) Densité de *Cx. pipiens* dans les gîtes larvaires vs densité prédite par le modèle. b,c,d,e,f : densités relevées de *Cx. pipiens* dans les gîtes selon les variables (points noirs) et densités prédites par le modèle (ligne bleue) en faisant varier une seule variable et en fixant les autres à leurs moyennes : EC (b),  $\text{O}_2$  (c), pH (d), irradiance (e), température (f).

### 3.5.2. Influence sur la probabilité de retrouver des *Cx. pipiens* dans un gîte

Pour déterminer l'influence des paramètres physicochimiques des gîtes sur la présence de *Cx. pipiens*, nous avons mesuré les caractéristiques physicochimiques de 51 points d'eau stagnante ne présentant pas de larves ou de pupes de moustiques. Pour servir à la régression logistique, ces données sont ajoutées aux gîtes présentant des larves de moustiques, qui représentent 183 prises de mesures.

Les trois meilleurs modèles obtenus avec la fonction *bestglm* sont :  $Y = a1O_2 + a2RAD + a3EC^2 + b$  (AIC = 191,2762) ;  $Y = a1EC + a2O_2 + a3RAD + b$  (AIC = 191,2902) ;  $Y = a1EC + a2O_2 + a3T^\circ + a4RAD + a5T^{\circ 2} + b$  (AIC = 191,3986). Nous avons choisi le troisième car il présente plus de variables explicatives significatives pour une AIC très proche des deux premiers (Tab. 5).

Les variables influençant significativement la probabilité de trouver des *Cx. pipiens* dans un point d'eau sont : l' $O_2$  qui influence négativement cette probabilité (Fig. 21a), le RAD qui l'influence négativement (Fig. 21b) et la température qui l'influence selon une équation du second degré représentée en Figure 21c.

Tableau 5 : Régression logistique sur la présence de *Cx. pipiens* dans les gîtes larvaires des parcs urbains de Liège. Les variables sont les paramètres physicochimiques et les transformations de ceux-ci utilisés pour le modèle. Les coefficients représentent la contribution de chaque paramètre sur la présence de *Cx. pipiens* (0 = absence, 1 = présence). La z-valeur est obtenue en divisant le coefficient par l'écart-type. La p-valeur permet d'apprécier la significativité du coefficient dans le modèle. ° indique une p-valeur significative à  $\alpha = 0,1$  et \* une p-valeur significative à  $\alpha = 0,05$ .

Variable	Coefficient	Écart-type	z-val	p-val
<b>Intercept</b>	1,259	0,202	6,221	4,93e-10*
<b>EC</b>	0,352	0,248	1,421	0,155
<b>O<sub>2</sub></b>	-0,771	0,253	-3,052	0,002*
<b>T<sup>°</sup></b>	-3,620	2,056	-1,761	0,078°
<b>RAD</b>	-0,401	0,233	-1,719	0,086°
<b>T<sup>° 2</sup></b>	3,647	2,033	1,794	0,073°

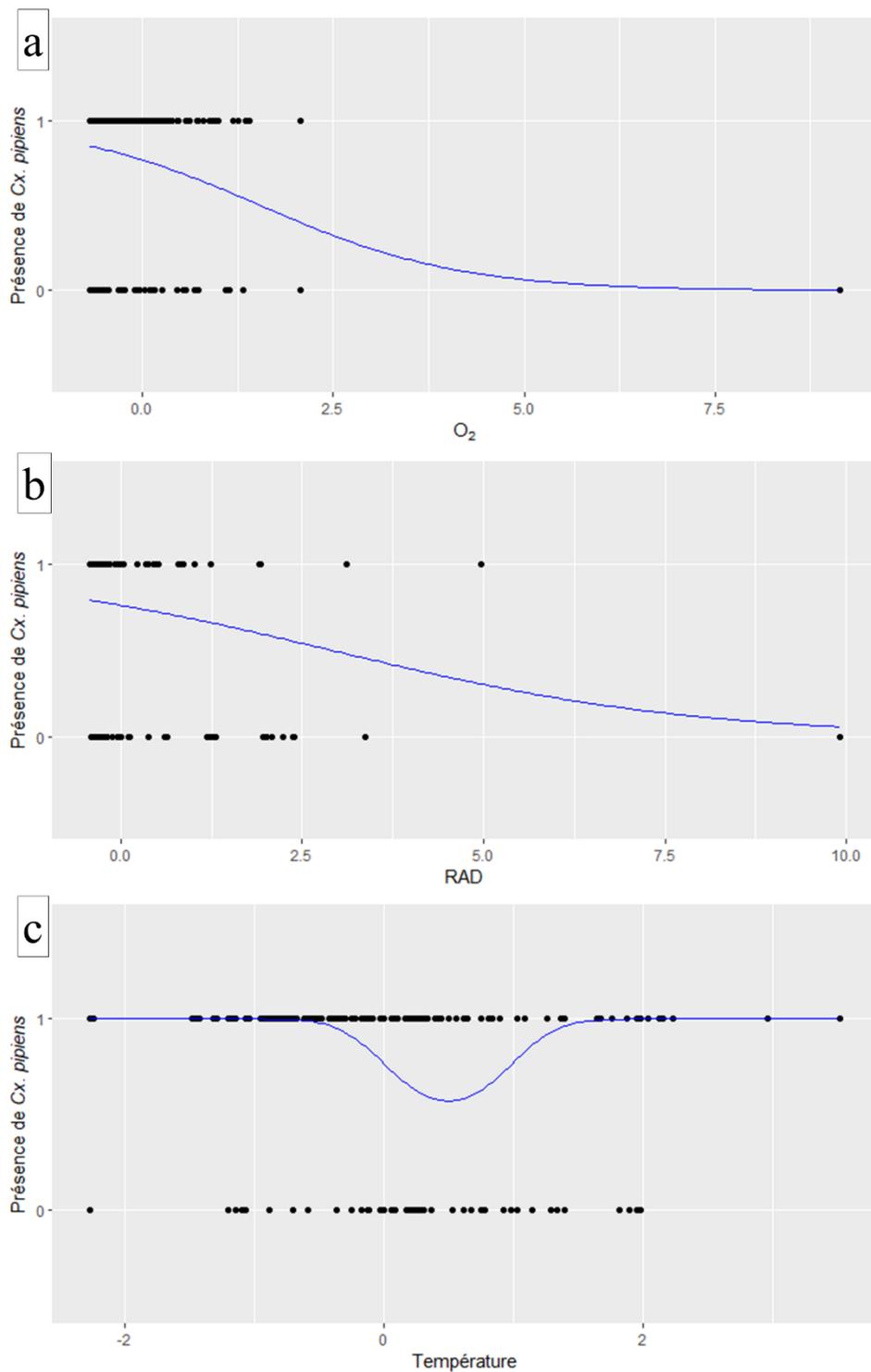


Figure 21 : Représentations graphiques du modèle logistique sur la présence de *Cx. pipiens* dans les gîtes larvaires des parcs urbains de Liège par variable standardisée. Les points noirs représentent la présence (1) ou l'absence (0) de *Cx. pipiens* dans un point d'eau. Les courbes bleues sont les valeurs prédites par le modèle en faisant varier une seule variable et en fixant les autres à leurs moyennes. (a)  $O_2$  (Moyenne  $\pm$  Ecart-type =  $6,33 \pm 9,05$ ), (b) RAD ( $3,55 \pm 8,42$ ), (c) Température ( $20,1 \pm 3,58$ ).

### 3.6. Wolbachia

L'ADN total de 11 femelles *Cx. pipiens* a été extrait : 4 de la Boverie, 3 du parc d'Avroy, 2 du Jardin Botanique et 2 du parc de Droixhe. La PCR a confirmé la présence de *Wolbachia* dans les 11. Le séquençage du gène de la protéine *wsp* a donné des séquences pratiquement identiques pour les 11 individus. Les séquences sont reprises en annexe S5. Les différences viennent du fait que, à la même position, la séquence *forward* de 5 individus (Droixhe-C2, Boverie-C1/C4/I2, Botanique-I1) indique un G tandis que la *reverse* indique un T. De même, la séquence *forward* de Avroy-I1 indique un C là où la *reverse* indique un A. Dans les séquences consensus utilisées pour l'alignement des séquences, un K a été attribué aux positions incertaines pour Droixhe-C2, Boverie-C1/C4/I2 et Botanique-I1 et un M a été attribué à la position incertaine pour Avroy-I1 (Fig. 22). Cependant, la qualité du séquençage, appréciée à l'aide du score phred, est mauvaise pour les positions incertaines des séquences *forward* : <20 pour Avroy-I1 et <10 pour les autres, alors qu'elle est bonne pour celles des séquences *reverse* : >= 30. Ceci étant donné, nous avons remplacé les K par des T et le M par un A pour l'analyse phylogénétique.

L'analyse phylogénétique a indiqué que les onze moustiques étaient porteurs de la même souche de *Wolbachia pipientis* et que celle-ci pouvait être classée dans le super groupe B et dans le sous-groupe Pip (Fig. 23).

Species/Abbrv	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
1. Culex pipiens (Droixhe-C2)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	A	C	A	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	K	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																							
2. Culex pipiens (Droixhe-C1)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	T	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																								
3. Culex pipiens (Boverie-I2)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	K	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																									
4. Culex pipiens (Boverie-C4)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	K	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																									
5. Culex pipiens (Boverie-C3)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	T	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																									
6. Culex pipiens (Boverie-C1)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	K	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																									
7. Culex pipiens (Botanique-I1)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	T	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																									
8. Culex pipiens (Botanique-C1)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	T	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																									
9. Culex pipiens (Avroy-I3)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	T	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																									
10. Culex pipiens (Avroy-I1)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	M	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	T	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																								
11. Culex pipiens (Avroy-C1)	T	G	T	T	G	A	G	G	G	A	C	T	T	T	A	C	T	C	A	C	A	A	C	T	A	A	C	A	A	A	A	C	G	A	C	G	T	T	A	G	T	G	G	T	G	C	A	A	C	A	T	T	T	A	C	T	C	C	A	A	C	A	A	C	T	G	T	T	G	C	A	A	C	A	G																									

Figure 22 : Partie de l'alignement des séquences du gène de *wsp* de *Wolbachia* des 11 individus étudiés montrant les positions incertaines des séquences consensus en gris.

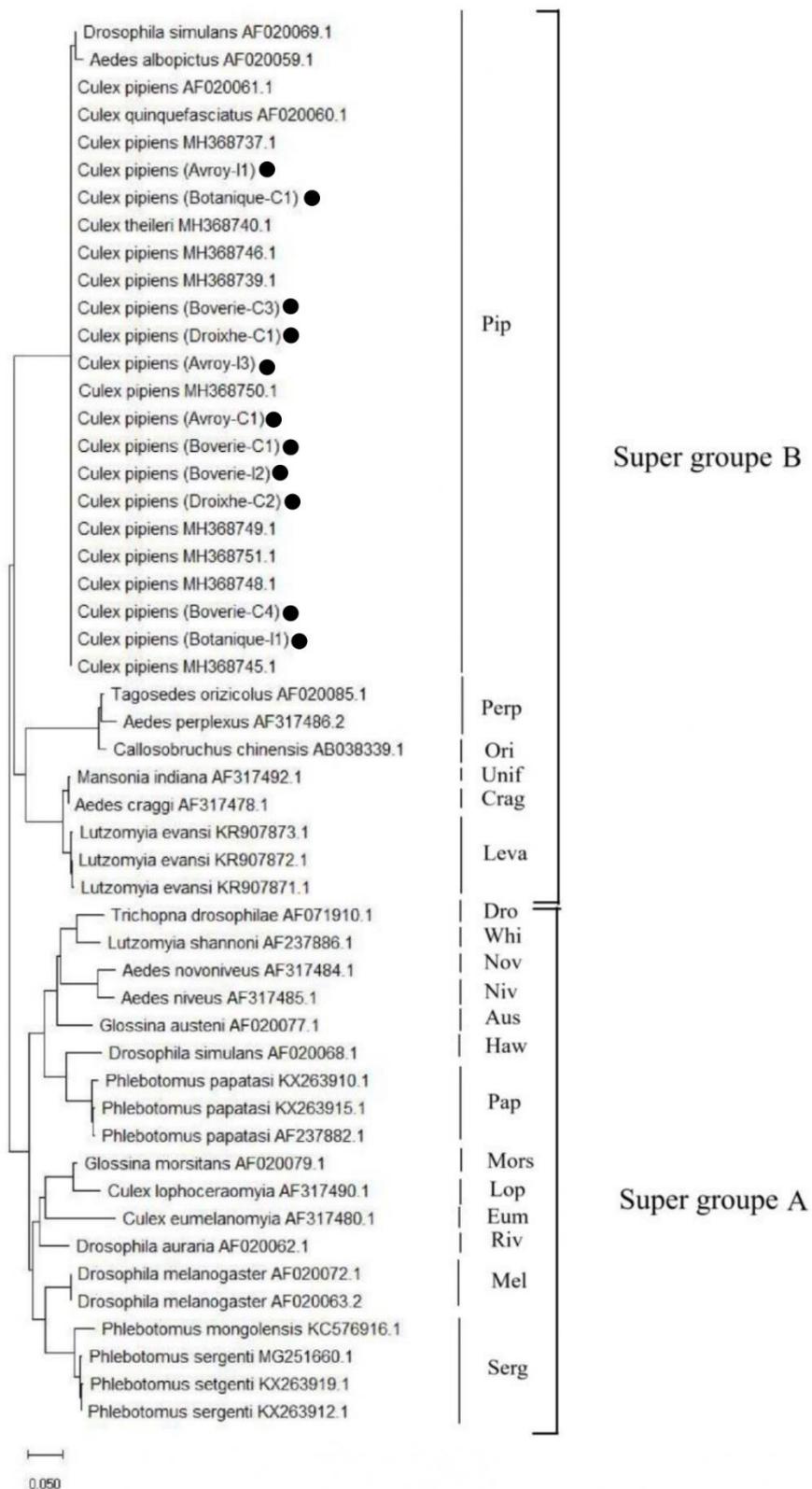


Figure 23 : Analyse en neighbor-joining des séquences d'ADN de *wsp* de *Wolbachia* extraites des moustiques de Liège et d'autres insectes. Les isolats de cette étude sont indiqués par un rond noir.

## 4. Discussion

---

### 4.1. Communautés de Culicidae des parcs de Liège

L'abondance de *Cx. pipiens* des parcs suit une tendance thermophile classique. On retrouve plus de moustiques dans les parcs lorsque la température extérieure moyenne augmente comme c'est habituellement le cas (Boukraa et al., 2016 ; Dekoninck et al., 2010). Il a été en effet montré que les larves de *Cx. pipiens* sont plus abondantes lorsque les températures extérieures augmentent (Gardner et al., 2012). Nous n'avons pas trouvé de relation entre les précipitations et l'abondance de *Cx. pipiens*. Cependant, certaines études ont trouvé une relation négative entre les précipitations et leur abondance (Gardner et al., 2012).

L'abondance absolue de *Cx. pipiens* récoltés est la plus élevée dans les parcs d'Avroy et de la Boverie : 5428 et 3885 respectivement (Fig. 12). Cela est dû au grand nombre de gîtes larvaires présents dans ces parcs : 39 pour Avroy et 43 pour la Boverie. De plus, l'abondance est plus élevée dans le parc d'Avroy car deux de ces gîtes ont fourni plus de 1000 larves lors d'un prélèvement. Il y a moins de gîtes dans le Jardin botanique (30) et ceux-ci abritent généralement moins de larves (Fig. 13) car la majorité sont des bacs en pierre (Fig. 6c). Cependant, l'abondance absolue de *Cx. pipiens* dans ce parc n'est tout de même pas extrêmement faible (2474) car quelques gîtes autres que des bacs en pierre ont fourni beaucoup de larves à un moment donné. 936 larves ont notamment été prélevées dans les PP gobelets et 688 dans une bâche lors d'un prélèvement. Le parc de Droixhe a la plus faible abondance absolue (184) car il abrite très peu de gîtes larvaires (7) et ceux-ci abritant moins de larves (Fig. 13). Il est difficile d'expliquer avec nos données pourquoi les gîtes du parc de Droixhe abritaient moins de larves : les types de gîtes ne sont pas forcément des types présentant généralement peu de larves et les paramètres de ceux-ci ne permettent pas de les différencier de ceux des autres parcs. Des données supplémentaires comme la concentration en certains composés antagonistes pourraient peut-être permettre d'expliquer cette faible densité dans les gîtes de Droixhe.

Par ailleurs, la richesse spécifique semble aussi dépendre du nombre de gîtes larvaires des parcs. Le parc de Droixhe, qui présente très peu de gîtes, a la plus petite richesse spécifique. Cependant, le fait que les espèces autres que *Cx. pipiens* soient des espèces rares dans les parcs de Liège fait que leur détection est aussi en partie stochastique. Il est donc difficile de tirer des conclusions claires.

Nos résultats indiquent que le nombre de gîtes larvaires présents dans les parcs urbains et leur nature déterminent l'abondance de *Cx. pipiens* ainsi que la richesse spécifique des communautés de Culicidae de ces parcs. Pour éviter d'avoir des populations de *Cx. pipiens* trop grandes, il faut donc réduire au minimum le nombre de gîtes des parcs. Globalement, à ce niveau-là, les parcs de Liège semblent bien gérés. Une forte abondance de moustiques en milieu urbain est habituellement due à un nombre élevé de contenants artificiels comme des pots de fleurs, des pneus abandonnés, des canettes de boisson ou des avaloirs (Kolimenakis et al., 2021). Hormis les avaloirs qui sont nécessaires à l'évacuation des eaux de ruissellement, nous n'avons pas retrouvé ce type de gîtes dans les parcs. Les avaloirs composent la majeure partie des gîtes des parcs d'Avroy, de la Boverie et de Droixhe (Fig. 6a,b,d). Seul le parc d'Avroy comporte un nombre non négligeable de gîtes qui pourraient être supprimés : les bacs en plastiques. Ces bacs en plastique, qui sont entreposés négligemment, se remplissent d'eau dès qu'il pleut et peuvent abriter une grande quantité de larves de *Cx. pipiens* et de *Cs. annulata*. Pour éviter cela, il suffirait de les entreposer à l'envers ou dans un endroit couvert. Le Jardin botanique est un cas particulier puisque quasiment tous les gîtes ont été trouvés dans et autour des serres. Généralement, ces gîtes abritaient assez peu de larves (Fig. 13) mais au cas où le nombre de moustiques viendrait à augmenter à cet endroit et deviendrait problématique, le fait de changer l'eau des bacs en pierre régulièrement ou de vider l'eau des bâches là où c'est possible devrait suffire à diminuer le nombre de moustiques.

## **4.2. Analyses des gîtes**

Nous avons inspecté les parcs urbains de Liège afin de déterminer quels y étaient les habitats propices au développement des larves de Culicidae ainsi que leurs caractéristiques physicochimiques. Nous y avons identifié des gîtes larvaires de 9 types différents (Tab. 1).

### **4.2.1. Analyses des paramètres physicochimiques des gîtes**

L'ACP (Fig. 17) a permis de montrer qu'il y a une variation des paramètres physicochimiques dans les différents types de gîtes larvaires, ce qui en fait des habitats différents qui sont colonisés par différentes espèces (Tab. 1).

#### **4.2.1.1. Gîtes abritant *Culex pipiens***

Des larves de *Cx. pipiens* ont été retrouvées dans tous les types de gîtes excepté les étangs (Tab. 1). Ceci est cohérent car elles sont capables d'habiter pratiquement tous les types de source d'eau (Becker et al., 2010). On les a retrouvées dans des gammes de variables très larges.

Les larves et pupes de *Cx. pipiens* ont été retrouvées dans des gammes de pH allant de 4,92 à 9,46 et la GLMM indiquerait un maximum d'individus aux alentours d'un pH 7 (Fig. 18d). Cette gamme est plus large que celle observée par Kenawy et al. (2013) mais concorde avec d'autres observations où des larves de *Cx. pipiens* ont pu être retrouvées dans des habitats dont le pH peut aller de 2 à 9,8 (Figueroa et al., 2016). Nous n'avons pas trouvé d'études indiquant un pH optimal pour la densité de *Cx. pipiens*. La plupart montrent des relations linéaires entre le pH et la densité de *Cx. pipiens* : certaines indiquent une relation négative (Kinga et al., 2022 ; Mouatassem et al., 2020), d'autres une relation positive (Kenawy et al., 2013 ; Lalami et al., 2010). Nous pensons que la manière quadratique, qui permet d'estimer un maximum, est la meilleure façon de représenter l'effet du pH sur la densité de *Cx. pipiens* dans un habitat.

L'EC des gîtes de *Cx. pipiens* avaient des valeurs allant de 62  $\mu\text{S}/\text{cm}$  à 7300  $\mu\text{S}/\text{cm}$  et la GLMM indiquerait un pic d'individus aux alentours de 3000  $\mu\text{S}/\text{cm}$  (Fig. 18b). Ceci correspond aux résultats obtenus par Nikookar et al. (2017) qui ont trouvé une relation linéaire positive entre l'EC et la densité de *Cx. pipiens* pour des valeurs allant de  $\sim 50$   $\mu\text{S}/\text{cm}$  à  $\sim 3500$   $\mu\text{S}/\text{cm}$ . Ceci pourrait s'expliquer par le fait que l'EC est directement proportionnelle à la quantité de solides dissous dans l'eau, elle-même corrélée à la pollution organique de l'eau. Une haute EC indiquerait donc une grande concentration en nutriments favorisant les algues et les microorganismes qui peuvent servir de nourriture pour les larves (Kibuthu et al., 2016).

Les larves de *Cx. pipiens* ont été retrouvées dans des eaux montrant de 0,60 ppm à plus de 20 ppm d'OD et le logarithme de l'OD influencerait positivement leur densité (Fig. 18c). Cependant, la régression logistique indique que, à des quantités d'OD trop élevées, on aurait moins de probabilité de retrouver des larves (Fig. 19a). Cette grande gamme est plus large que celle de Kenawy et al. (2013) mais cohérente avec le fait qu'on puisse retrouver les larves de *Cx. pipiens* dans des eaux oxygénées ou quasiment anoxiques (Figueroa et al., 2016). De même, d'autres études rapportent une association positive entre la densité de *Cx. pipiens* et l'OD (Dejenie et al., 2011 ; Kenawy et al., 2013). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les larves de plusieurs espèces de moustiques sont capables d'utiliser l'oxygène dissous en plus de l'oxygène atmosphérique. Or, il a été montré que de plus faibles niveaux d'OD provoquent une réduction de la survie et une prolongation du temps de développement des larves de *Cx. pipiens* (Silberbush et al., 2015). Le fait d'avoir un bon niveau d'OD donnerait alors plusieurs avantages aux larves, notamment celui d'augmenter la prise d'oxygène ou de permettre aux

larves de moins remonter à la surface, ce qui leur offrirait un gain de temps tout en impliquant un risque moindre de prédation.

Les gîtes abritant des larves de *Cx. pipiens* avaient des températures allant de 12,0°C à 32,7°C et la GLMM indique que la densité de *Cx. pipiens* aurait tendance à diminuer lorsque la température augmente (Fig. 18e). Cette gamme est plus large que celle trouvée par Kenawy et al. (2013) mais reste cohérente avec les résultats de Figueroa et al. (2016) qui indiquent que des larves de *Cx. pipiens* peuvent être trouvées dans des eaux de 5°C à 34°C. Contrairement à nos résultats, plusieurs études indiquent que la température influence positivement la densité de *Cx. pipiens* (Ibrahim et al., 2011 ; Kenawy et al., 2013 ; Kinga et al., 2022). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les femelles préféreraient pondre dans ces gîtes plus chauds qui confèrent un avantage aux larves puisqu'elles s'y développent en général plus rapidement (Becker et al., 2010). Cependant, il a été montré que cette réduction du temps de développement est bien moindre lorsque la température dépasse les 24°C pour les *Cx. pipiens* et que le taux de mortalité de leurs larves augmente avec l'augmentation de la température (Ciota et al., 2014 ; Ruybal et al., 2016). Le taux de mortalité peut en effet tripler pour une différence de 15°C (de 16°C à 31°C), ce qui pourrait expliquer en partie nos résultats (Ruybal et al., 2016). Étonnamment, la régression logistique nous indique une probabilité plus faible de retrouver des larves de *Cx. pipiens* aux alentours de 22°C (Fig. 19c), ce qui contredit les résultats de nombreuses études (Ibrahim et al., 2011 ; Kenawy et al., 2013 ; Kinga et al., 2022 ; Onchuru et al., 2016). Ces résultats proviennent probablement d'un manque de données sur les points d'eau non occupés par *Cx. pipiens*.

La luminosité reflétée par la surface des gîtes de *Cx. pipiens*, mesurée en irradiance, allait de 0,011 W/m<sup>2</sup> à 45,39 W/m<sup>2</sup> et son logarithme influence positivement la densité de *Cx. pipiens*, indiquant de petits nombres de larves pour des très petites RAD. Puis, une fois ces petites valeurs dépassées, la luminosité semble avoir un effet positif assez faible (Fig. 18f). Ces très faibles valeurs, symptomatiques des gîtes très peu ensoleillés tels que les avaloirs très profonds ou des bacs en pierre complètement ombragés, impliqueraient une forte réduction d'algues photosynthétiques, ce qui induirait une source de nourriture très réduite pour les larves et réduirait ainsi leur densité. D'un autre côté, la régression logistique indique qu'une trop forte luminosité réduirait la probabilité de présence de larves de *Cx. pipiens* dans un point d'eau (Fig. 19b), comme c'est le cas pour les larves du genre *Aedes* (Onchuru et al., 2016). La productivité de pupes de *Cx. pipiens* serait pratiquement deux fois plus grande dans des gîtes

ombragés plutôt que dans des gîtes ensoleillés, ce qui pourrait expliquer pourquoi les femelles semblent préférer des gîtes moins lumineux pour l'oviposition (Vezzani & Albicocco, 2009).

Nos résultats indiquent donc que *Cx. pipiens* est une espèce très généraliste avec de larges intervalles de tolérance pour les paramètres étudiés, comme démontré précédemment (Becker et al., 2010; Figueroa et al., 2016). C'est pourquoi on retrouve les gîtes présentant des larves de *Cx. pipiens* partout sur les deux premières composantes principales calculées précédemment (Fig. 24).

La densité de *Cx. pipiens* dans les gîtes ne varie pas trop en fonction du type de gîtes - si ce n'est dans les bacs en pierre et dans les trous dans la terre où elle est faible. Ces gîtes étaient généralement très peu éclairés (Fig. 17e), ce qui pourrait expliquer la faible quantité de larves présents dans ceux-ci. De plus, ces deux types de gîtes ont été retrouvés principalement dans les serres du Jardin Botanique dans lesquelles on pourrait trouver un élément caractéristique qui expliquerait cette faible densité. Ainsi, les serres abritent de nombreuses plantes carnivores, parfois juste au-dessus des gîtes (Fig. 4f) : elles pourraient éventuellement en être responsables.

Nos modèles ont été ajustés pour évaluer l'influence de la température, du pH, de l'EC, de l'OD et du RAD sur la densité et la présence de larves de *Cx. pipiens*. Cependant, il est possible que les larves elles-mêmes influent sur ces paramètres. Il pourrait alors être intéressant d'étudier cette possibilité par une expérience menée dans des conditions contrôlées de laboratoire. Nous avons construit les modèles sur base de cinq variables généralement associées à des effets sur les larves de Culicidae dans les études de terrain mais ces variables ne reflètent pas exhaustivement la réalité étant donné que beaucoup d'autres facteurs peuvent entrer en compte dans le choix d'oviposition des femelles sur le terrain ou dans le développement et le taux de survie des larves. De plus, suite à de nombreux problèmes liés aux sondes de l'analyseur multiparamètre, nous avons perdu un nombre conséquent de données portant sur les paramètres de plusieurs gîtes et points d'eau, ce qui fait que les modèles sont moins robustes. Ceci pourrait expliquer pourquoi la GLMM surestime les valeurs très basses mais sous-estime la plupart des valeurs hautes (Fig. 18a). De même, cela , ajouté au nombre relativement réduit de points d'eau vides de larves par rapport aux gîtes larvaires, pourrait expliquer pourquoi la régression logistique semble assez peu convaincante avec, outre l'intercept, une seule variable significative pour un  $\alpha = 0,05$  et trois pour un  $\alpha = 0,10$ .

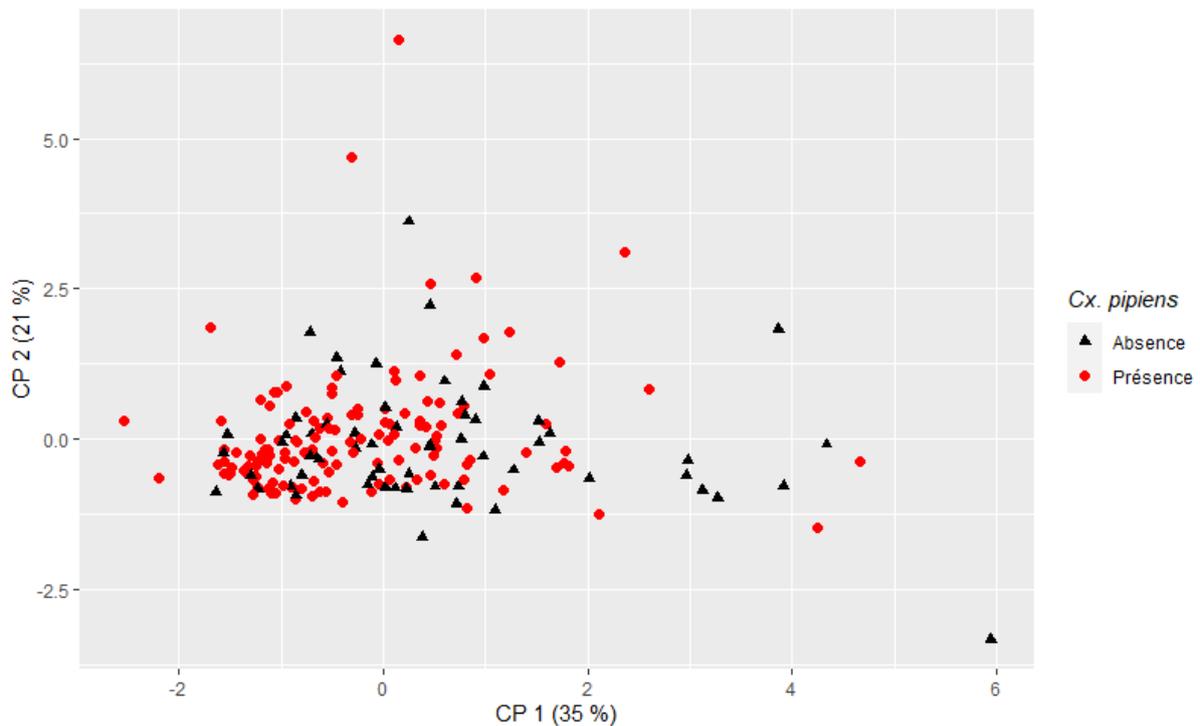


Figure 24 : Analyse en composantes principales des paramètres des gîtes. La 1<sup>ère</sup> composante principale est portée en abscisse et explique 35% de la variance totale. La 2<sup>ème</sup> composante principale est portée en ordonnée et explique 21% de la variance totale. Les gîtes présentant des *Cx. pipiens* sont mis en évidence.

#### 4.2.1.2. Gîtes abritant d'autres espèces

Des larves de *Cs. annulata* ont été retrouvées dans 6 types de gîtes différents (Tab. 2) et, à une exception près, nous les avons toutes retrouvées dans des gîtes où des larves de *Cx. pipiens* étaient aussi présentes. Ces gîtes présentaient d'assez larges gammes de variables : le pH allant de 6,46 à 8,34, l'EC allant de 116  $\mu\text{S}/\text{cm}$  à 3200  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , l'OD allant de 1,22 ppm à 17,05 ppm, la température allant de 13,9 °C à 23,8°C et l'irradiance allant de 0,251  $\text{W}/\text{m}^2$  à 29,8  $\text{W}/\text{m}^2$ . On peut donc retrouver les gîtes présentant des *Cs. annulata* assez dispersés sur les deux premières composantes principales calculées précédemment (Fig. 25). En concordance avec les connaissances déjà établies (Becker et al., 2010), nos résultats indiquent que c'est aussi une espèce généraliste avec de plutôt larges intervalles de tolérance pour les paramètres étudiés, qui peut habiter une relativement grande variété de gîtes et qu'on retrouve souvent en association avec *Cx. pipiens*.

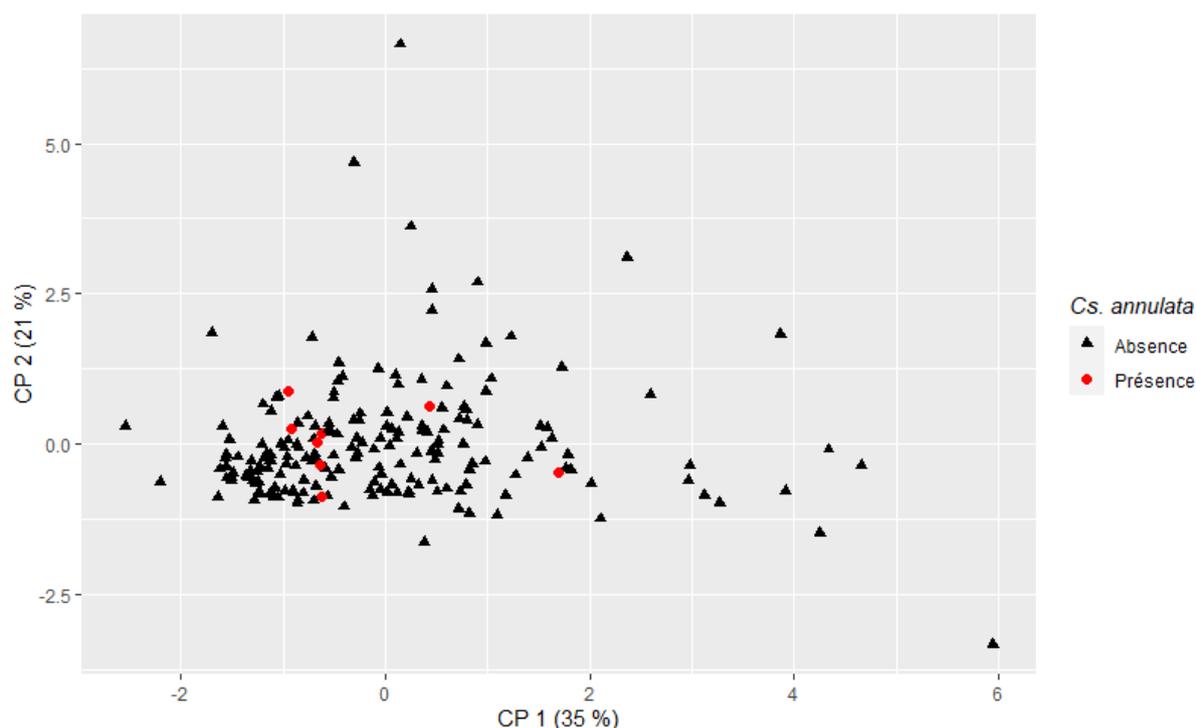


Figure 25 : Analyse en composantes principales des paramètres des gîtes. La 1<sup>ère</sup> composante principale est portée en abscisse et explique 35% de la variance totale. La 2<sup>ème</sup> composante principale est portée en ordonnée et explique 21% de la variance totale. Les gîtes présentant des *Cs. annulata* sont mis en évidence.

Des larves de *Culex torrentium* Martini 1925 ont été retrouvées dans 3 types de gîtes différents (Tab. 2), toujours en association avec *Cx. pipiens* - excepté dans un gîte - ce qui est en accord avec les résultats de Lühken et al. (2015). Elles ont aussi été retrouvées dans de plutôt larges gammes pour certaines variables : le pH allant de 5,26 à 8,23, l'EC allant de 242  $\mu\text{S}/\text{cm}$  à 3470  $\mu\text{S}/\text{cm}$ , l'irradiance allant de 0,028  $\text{W}/\text{m}^2$  à 29,8  $\text{W}/\text{m}^2$ . Par contre, d'autres variables avaient des gammes plus étroites que celles des espèces précédentes : l'OD allant de 0,63 ppm à 4,75 et la température allant de 17,7 °C à 23,8 °C. Toutefois, lorsqu'on étudie la combinaison de ces variables avec une ACP, on peut voir qu'on retrouve des *Cx. torrentium* dans des gîtes avec des caractéristiques bien différentes (Fig. 26). Nos résultats semblent indiquer que l'espèce est relativement généraliste avec toutefois des intervalles de tolérance de température et d'OD relativement étroits et assez bas pour l'OD. Cependant, du fait du nombre faible de gîtes présentant ces larves, il est difficile d'établir une conclusion certaine pouvant s'appliquer à l'ensemble des populations de *Cx. torrentium*.

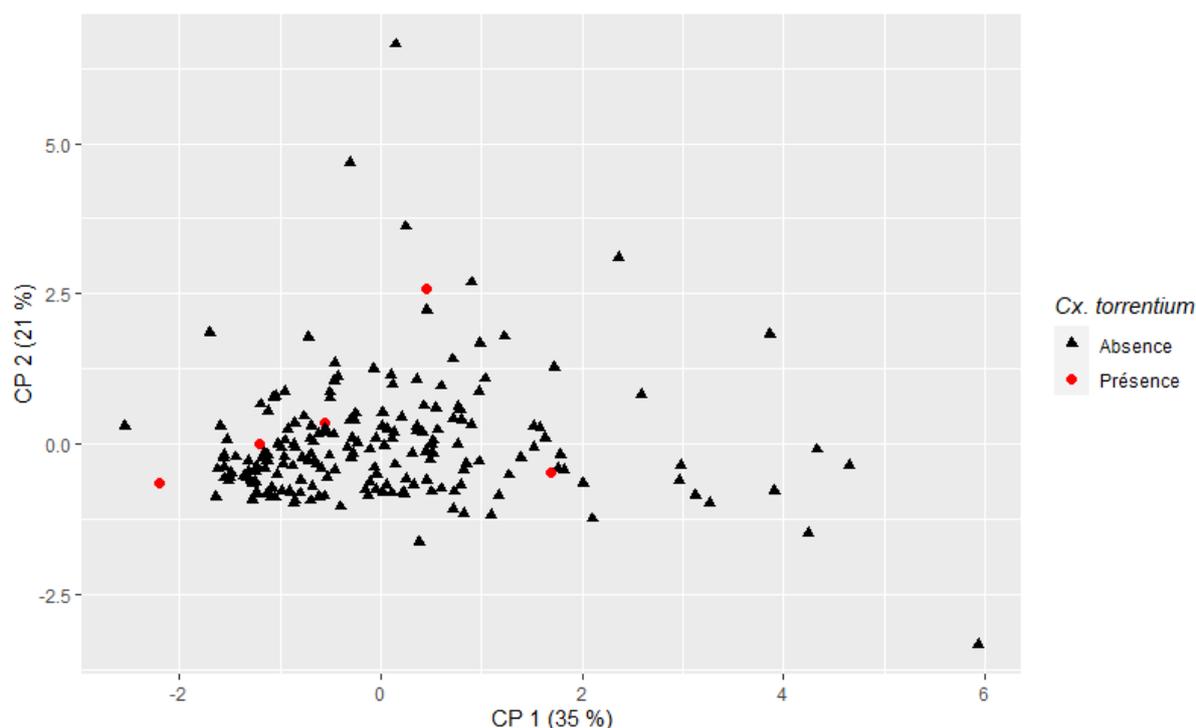


Figure 26 : Analyse en composantes principales des paramètres des gîtes. La 1<sup>ère</sup> composante principale est portée en abscisse et explique 35% de la variance totale. La 2<sup>ème</sup> composante principale est portée en ordonnée et explique 21% de la variance totale. Les gîtes présentant des *Cx. torrentium* sont mis en évidence.

Les 4 dernières espèces ont été tellement peu retrouvées qu'il est compliqué d'estimer les préférences de celles-ci pour des gîtes larvaires. Cependant, les larves d'*Anopheles maculipennis s.l.* ont été retrouvées uniquement à deux reprises dans l'étang de Droixhe qui est très clair et avec très peu de végétation immergée, ce qui est concordant avec les connaissances déjà établies sur les préférences d'habitat des larves de *An. maculipennis s.s.* Meigen 1818 (Becker et al., 2010). Ceci pourrait indiquer que ces larves appartiendraient à cette espèce.

*Culex hortensis* Ficalbi 1889 a été retrouvé une seule fois dans un piège pondoir d'eau claire, ce qui est concordant avec ce que nous savons des *Cx. hortensis* (Becker et al., 2010).

*Culex territans* Walker 1856 a été retrouvé une seule fois dans un bac en pierre avec beaucoup de lentilles d'eau en surface, faiblement exposé à la lumière (RAD = 0,256 W/m<sup>2</sup>), ce qui correspond aux préférences documentées des larves de *Cx. territans* (Becker et al., 2010).

*Anopheles claviger* (Meigen 1804) a été retrouvé une seule fois dans un gobelet d'infusion de foin. Les larves de cette espèce sont retrouvées dans une grande variété d'habitats mais montrent une préférence pour les sources d'eau propre plus ou moins permanentes (Becker et al., 2010). Il est donc plutôt étonnant de retrouver une larve dans un de ces gobelets puisque

l'eau y est très chargée en matière organique, n'est pas claire et est changée toutes les deux semaines. Cependant, des *An. claviger* ont déjà été capturés par ce type de piège pondoir en Suisse (Wagner et al., 2018).

#### 4.2.2. Richesse spécifique des gîtes larvaires et pièges pondoirs

Les étangs, desquels nous pensions, en élaborant l'étude, qu'ils allaient être le gîte principal des parcs d'où nous allions tirer le plus de larves et d'espèces différentes, n'ont fourni, au final, que 4 larves d'une seule espèce : *An. maculipennis s.l.*. Plusieurs raisons pourraient expliquer l'absence de larves dans les étangs de Liège. Premièrement, les caractéristiques physicochimiques des étangs les différencient des autres gîtes sur l'ACP, ce qui est dû, notamment, à leur OD, à leur RAD et à leur température élevée. Ceci concorde les résultats de la régression logistique qui indiquent que lorsque ces variables sont trop élevées, on aurait moins de chance de retrouver des larves de *Cx. pipiens* (Fig. 19). Deuxièmement, de nombreux prédateurs de larves de moustique comme des poissons et des larves de zygoptères étaient présents dans les étangs lors des collectes. On y retrouvait aussi énormément de daphnies qui pourraient entrer en compétition avec les larves de moustiques, rendant les étangs moins accueillants pour elles (Thakur & Kocher, 2022). Enfin, il est possible que la gestion des étangs ait aussi joué un rôle. Les étangs de la ville de Liège sont tous gérés de la même manière : ils sont traités avec un oxygénant et une solution bactérienne qui permettent d'avoir une eau très claire : Biobooster + et Clean-Lac (ichiPond, Herstal, Belgique). Il est possible que les bactéries ou les composés chimiques de ces produits aient un effet antagoniste sur les larves ou sur l'attraction des femelles gravides. L'utilisation de ces produits a notamment pour effet de réduire la concentration en nutriments tels que l'ammoniaque, le nitrite, le nitrate et le phosphate, ce qui réduit l'accumulation d'algues qui peuvent être sources de nourriture et servir de refuge contre les prédateurs. De plus, les algues filamenteuses flottantes sont retirées des étangs plusieurs fois par semaine à l'épuisette. Ceci pourrait expliquer en partie aussi l'absence de larves puisque ces algues peuvent avoir un effet bénéfique sur l'oviposition et la densité de larves de certains moustiques (Bond et al., 2005; Rejmankova et al., 1991).

Ensemble, les pièges pondoirs ont fourni 4 espèces, ce qui en fait les gîtes les plus riches avec les bacs en pierre mais cela ne représente que 57% des espèces retrouvées dans les gîtes du parc et 40% des espèces totales retrouvées dans les parcs. Les PP utilisés pour cette étude sont une bonne aide pour évaluer la composition d'une communauté culicidienne d'un site mais n'est pas suffisante pour en avoir une estimation parfaite.

### 4.3. Importance sanitaire des espèces collectées

Les espèces retrouvées dans cette étude comptent pour 32% (10/31) des espèces précédemment recensées Belgique (Boukraa et al., 2015). Parmi celles-ci, *Cx. pipiens* est de loin la plus fréquente (95,6%). La discrimination entre les biotypes *Cx. pipiens pipiens* L. 1758 et *Cx. pipiens molestus* n'a pu être faite car il n'existe pas de caractéristiques morphologiques fiables permettant leur distinction (Becker et al., 2010). Toutefois, cette identification aurait été intéressante car les deux biotypes sont bien différents dans leur biologie ainsi que dans leur importance vectorielle. Les moustiques *Cx. p. pipiens* sont anautogènes, ornithophiles, eurygames et ont une diapause en hiver. Ils ont un rôle mineur en tant que vecteurs bien qu'ils puissent transmettre le VNO. Les *Cx. p. molestus*, quant à eux, sont autogènes, sténogames (capables de copuler dans des petits espaces, sans besoin d'essaim), anthropophiles et ont une diapause facultative. Mondialement, c'est un des vecteurs majeurs du VNO. Avec *Culex restuans* Theobald 1901, ils sont responsables de plus de 80% du risque total (Kilpatrick et al., 2005). On les retrouve plus fréquemment dans des environnements humains (Becker et al., 2010) et en plus grand nombre dans les milieux urbains que l'autre biotype (Osório et al., 2014). Nous supposons donc que la majorité des *Cx. pipiens* identifiés sont du biotype *molestus* ou sont des hybrides entre les deux biotypes. Ces formes hybrides ont une grande importance épidémiologique car elles ont un comportement alimentaire opportuniste et piquent des oiseaux et des humains, ce qui les rend plus propices à transmettre des maladies entre ces deux hôtes (Osório et al., 2014).

Dans le genre *Culex*, la deuxième espèce la plus abondante est *Cx. torrentium* (0,1%). L'abondance relative de cette espèce est très faible par rapport au *Cx. pipiens* mais il est possible que certaines femelles aient été identifiées en tant que *Cx. pipiens* car la différenciation entre elles est très compliquée car, pour ce faire, il est nécessaire qu'elles soient en très bon état. La différenciation des mâles est bien plus aisée grâce à des caractéristiques des genitalia et les larves sont différenciables grâce aux soies thoraciques 1-T, à des soies des segments abdominaux III-V et aux soies latérales du siphon. Les femelles peuvent être vectrices du virus Sindbis mais n'ont pas d'influence sur la santé humaine puisqu'ils sont exclusivement ornithophiles (Becker et al., 2010).

Trois larves de *Cx. territans* ont été identifiées. Cette espèce batracophile n'a pas d'importance épidémiologique. Il est possible qu'elle puisse transmettre des arboviroses à des animaux à sang froid mais cela n'a jamais été pleinement documenté (Wayne, 2023).

Nous avons identifié 2 larves de *Cx. hortensis* dont la phénologie et la biologie générale est peu connue car l'espèce est assez peu commune. Son importance épidémiologique est très faible puisque les femelles ne piquent généralement pas les hommes et qu'on en retrouve peu (Becker et al., 2010). Ces résultats confirment ceux de Versteirt et al. (2013) et Boukraa et al. (2016) indiquant son établissement en Belgique.

La deuxième espèce la plus abondante est *Culiseta annulata* (4%). Elle pique les humains et autres mammifères et occasionnellement les oiseaux. On peut fréquemment retrouver ces moustiques dans les maisons où ils rentrent pour se nourrir d'humains ou d'animaux domestiques ou pour chercher un refuge pour l'hiver. C'est un potentiel vecteur du virus Tahyna et ils peuvent transmettre des *Plasmodium* aviaires (Becker et al., 2010).

Un adulte *Cs. morsitans* a été capturé par un Mosquito Magnet. C'est étonnant d'en retrouver en milieu urbain puisque cette espèce préfère habituellement les milieux sauvages ou ruraux (González et al., 2020; Versteirt et al., 2013). *Cs. morsitans* est un vecteur du virus Sindbis.

Six moustiques du complexe *Anopheles maculipennis* ont été prélevés. La détermination de l'espèce des individus de ce complexe n'a pas été possible car les caractères morphologiques ne permettent pas de différencier les espèces pour un individu. La distinction peut se faire morphologiquement sur les œufs mais nous n'avons retrouvé que des larves et des adultes. Le complexe est impliqué dans la transmission de la malaria mais les espèces ont une importance différente dans cette transmission, c'est pourquoi l'identification des espèces est intéressante dans l'évaluation d'un risque de transmission. Toutefois, nous suspectons que les individus récoltés soient des *An. maculipennis* s.s. et/ou *An. messae* Falleroni 1926. Les autres espèces ont des aires de répartition qui sont plus méridionales (*An. labranchiae* Falleroni 1926, *An. melanoon* Hackett 1934, *An. sacharovi* Favre 1903, *An. subalpinus* Hackett & Lewis 1935) ou plus septentrionales (*An. beklemishevi* Stegnii & Kabanova 1976) ou sont des espèces côtières (*An. atroparvus* van Thiel 1927). *An. maculipennis* s.s. et *An. messae* sont des espèces essentiellement zoophiles qui ont un rôle mineur dans la transmission de la malaria. Elles piquent principalement des animaux domestiques d'élevage mais peuvent piquer les humains en cas de faible densité d'animaux domestiques et de forte densité de ces *Anopheles*. Cela fait qu'ils peuvent être responsables de transmissions de malaria dans des régions limitées (Becker et al., 2010). En milieu urbain, il y a plutôt une faible densité d'animaux domestiques puisqu'il n'y a pas d'élevages mais nos résultats montrent qu'il y a aussi une faible densité de ces moustiques, ce qui fait que la probabilité ils puissent transmettre le pathogène est faible même s'il était présent dans la région.

Trois adultes *An. plumbeus* Stephens 1828 ont été piégés dans les Mosquito Magnet. Ces moustiques piquent les mammifères dont les humains et se retrouvent habituellement dans les forêts ou en milieu rural car leurs larves se développent presque exclusivement dans des cavités d'arbres. Cependant, il n'est pas étonnant de les avoir retrouvés dans les parcs de la Boverie et du Jardin Botanique qui ont beaucoup d'arbres. Ils peuvent être vecteurs de la malaria mais ont une importance épidémiologique mineure du fait de leur écologie (Becker et al., 2010).

Une larve d'*An. claviger* a été collectée. C'est une espèce zoophile dont les hôtes principaux sont de grands animaux domestiques. Cependant, ces moustiques peuvent occasionnellement piquer des humains. C'est un vecteur potentiel de la malaria mais son importance épidémiologique est faible en raison de la petite taille de ses populations (Becker et al., 2010).

Un adulte *Ae. cinereus* a été piégé dans un Mosquito Magnet. Cette espèce pique les humains et d'autres mammifères. On a déjà identifié des individus porteurs du VNO mais du fait de leur faible capacité vectorielle et de leur préférence d'hôtes, ils jouent un rôle très mineur dans la transmission du VNO (Andreadis et al., 2004; Becker et al., 2010).

Dans les parcs de Liège, l'espèce revêtant la plus grande importance épidémiologique est *Cx. pipiens* en raison de sa surreprésentation dans les parcs et de sa capacité à transmettre le VNO dont elle est le vecteur principal en Europe (Vogels et al., 2017). Elle est considérée comme une des principales espèces de Culicidae nuisibles en Europe pouvant causer des nuisances sévères (ECDC., 2014). L'importance épidémiologique de *Cs. annulata* est plutôt faible du fait de la taille relativement petite de sa population et de la faible menace représentée par le pathogène qu'elle peut transmettre : le virus Tahyna. Bien qu'en circulation en Europe, celui-ci n'est pas considéré comme une priorité pour la surveillance épidémiologique (ECDC, 2014). L'importance des autres espèces est pratiquement nulle car leurs populations ont une capacité vectorielle nulle ou très faible du fait de leur écologie et/ou de leur petite taille.

#### **4.4. *Wolbachia***

Nous avons étudié l'infection de *Wolbachia* dans la population de *Cx. pipiens* de la ville de Liège car cette bactérie est bien connue pour altérer la biologie des moustiques, notamment en réduisant leur durée de vie et en interférant avec leur transmission de pathogènes (McMeniman et al., 2009; Turley et al., 2009; O'Neill et al., 2019; Dodson et al., 2014; Hughes et al., 2012 ; Glaser & Meola, 2010). De plus, *Cx. pipiens* est le vecteur principal du VNO en Europe (Vogels et al., 2017). Nous avons détecté la bactérie dans 100% des

individus testés, ce qui est cohérent avec plusieurs études de différents pays indiquant une haute prévalence de *Wolbachia* dans *Cx. pipiens* (Bozorg-Omid et al., 2020; Khrabrova et al., 2009; Leggewie et al., 2018) et qui confirme les résultats de plusieurs études l'ayant détectée dans *Cx. pipiens* à plusieurs endroits en Belgique, notamment à Chênée, c'est-à-dire à seulement 4 km du parc de la Boverie (Raharimalala et al., 2016; Soto et al., 2023). Néanmoins, le faible nombre de moustiques testés ne permet pas de généraliser la prévalence de *Wolbachia* à l'ensemble de la population de *Cx. pipiens* de Liège.

Nos résultats constituent, à notre connaissance, le premier séquençage de *Wolbachia* infectant des moustiques de Belgique. L'analyse phylogénétique place la souche identifiée dans le sous-groupe Pip (wPip) du super-groupe B (Fig. 21) en accord avec les résultats de Soto et al. (2023) qui ont trouvé que la souche de *Wolbachia* infectant les *Cx. pipiens* de Louvain (Belgique) appartenait aussi au sous-groupe Pip. Parmi les 17 super-groupes de *Wolbachia*, les super-groupes A et B, largement répandus parmi les arthropodes, sont bien connus pour altérer le système reproducteur de leur hôte (Werren et al., 2008). La plupart des souches dont on a montré qu'elles induisaient une résistance virale font partie du super-groupe A. Par exemple, la souche wMel qui infecte normalement *Drosophila melanogaster* est utilisée en Australie pour réduire les cas de dengue car, lorsqu'elle est introduite dans *Ae. aegypti*, elle leur confère une résistance au DENV (O'Neill et al., 2019). Cependant, des souches du super-groupe B peuvent aussi conférer des résistances virales. C'est le cas de la souche wAlbB d'*Ae. albopictus* qui confère une résistance au DENV dans l'hôte hétérologue *Ae. aegypti* (Bian et al., 2010). De plus, il a été montré que la souche native de *Cx. quinquefasciatus* qui fait partie du sous-groupe Pip induit une résistance au VNO dans son hôte natif (Glaser & Meola, 2010). Il serait donc possible que la souche identifiée ici confère une résistance au VNO au *Cx. pipiens* de terrain. Cela dit, une étude récente n'a pas trouvé de d'effet significatif de wPip sur la répllication du VNO et USUV dans des *Cx. p. pipiens* de Belgique bien que les auteurs ne tirent pas de conclusion claire faute d'individus négatifs à *Wolbachia* (Soto et al., 2023). L'effet de wPip sur la résistance virale est encore peu connu. Il semble ne pas avoir d'effet concernant l'infection d'USUV et du VNO pour les *Cx. pipiens* mais pourrait avoir un effet sur un hôte hétérologue. De plus amples recherches sont nécessaires, notamment pour évaluer l'effet d'une introduction de wPip dans des populations d'un autre vecteur du VNO : *Cx. modestus*.

## 5. Conclusion

---

Nos résultats constituent la première caractérisation de communautés de moustiques de la ville de Liège ainsi que le premier séquençage de *Wolbachia* infectant des moustiques belges. Nous avons aussi déterminé les gîtes larvaires responsables de la présence de moustiques dans les parcs urbains de Liège et analysé l'influence de paramètres physicochimiques de ceux-ci sur la composition des communautés culicidiennes ainsi que sur la présence et la densité de *Cx. pipiens*.

Les gîtes larvaires les plus fréquents et qui ont fourni la majorité des moustiques relevés dans les parcs sont les avaloirs d'égout. Les parcs abritant le plus de moustiques sont ceux avec le plus d'avaloirs. Ceux-ci constituent l'habitat principal des larves de Culicidae des parcs de Liège et devraient être considérés en priorité pour la surveillance et le contrôle vectoriel. Par ailleurs, mis à part le parc d'Avroy où des gîtes pourraient être supprimés, les parcs de Liège semblent être gérés de manière adéquate pour éviter une trop grande quantité de moustiques.

Les communautés des parcs liégeois sont complètement dominées par *Cx. pipiens*, le vecteur principal du VNO en Europe. C'est la seule espèce revêtant une importance épidémiologique dans ces parcs. Nos résultats confirment sa grande plasticité de niche. Les modèles que nous avons construits indiqueraient que sa présence serait influencée par l'O<sub>2</sub> dissous, la luminosité et la température et que sa densité est influencée par l'électroconductivité, l'O<sub>2</sub> dissous, le pH, la température et la luminosité. Malgré une relative faiblesse des modèles, en particulier du modèle logistique évaluant l'influence des paramètres sur la présence de *Cx. pipiens*, nos résultats contribuent à la compréhension de la préférence d'habitat de l'espèce qui est une ressource clé pour la surveillance et le contrôle des espèces vectrices. L'analyse d'autres facteurs tels que la turbidité, la salinité ou la concentration en certains ions pourrait améliorer nos modèles.

Nous avons trouvé que des *Cx. pipiens* de Liège étaient porteurs d'une souche de *Wolbachia* appartenant au sous-groupe Pip. Les résultats disponibles à ce jour semblent indiquer que cette souche ne leur confère pas de résistance virale mais de plus amples recherches sont nécessaires pour mieux comprendre ses effets sur les traits de vie de *Cx. pipiens* ainsi que sur d'autres hôtes hétérologues, notamment *Cx. modestus*, elle aussi vectrice du VNO.

Étant donné la présence en grand nombre de *Cx. pipiens* dans la ville, sa proximité avec les frontières allemande et néerlandaise et la présence du VNO dans ces pays, il est possible que

les prochaines années voient les premiers cas d'infection au VNO à Liège. Une surveillance préventive de la population de *Cx. pipiens* liégeois et en particulier de la prévalence du VNO dans celle-ci est donc recommandée. Les pièges pondoirs élaborés pour cette étude peuvent être un outil utile pour cette surveillance.

## 6. Références

---

- Aberle, S. W., Kolodziejek, J., Jungbauer, C., Stiasny, K., Aberle, J. H., Zoufaly, A., Hourfar, M. K., Weidner, L., & Nowotny, N. (2018). Increase in human West Nile and Usutu virus infections, Austria, 2018. *Eurosurveillance*, 23(43), 1800545. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.43.1800545>
- Akpodiete, N. O., Diabate, A., & Tripet, F. (2019). Effect of water source and feed regime on development and phenotypic quality in *Anopheles gambiae* (s.l.) : Prospects for improved mass-rearing techniques towards release programmes. *Parasites & Vectors*, 12(1), 210. <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3465-0>
- Ambroise-Thomas, P., & Rossignol, J. F. (1986). Chemotherapy of resistant falciparum malaria. *Parasitology Today*, 2(3), 79-80. Scopus. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(86\)90163-8](https://doi.org/10.1016/0169-4758(86)90163-8)
- Andreadis, T. G., Anderson, J. F., Vossbrinck, C. R., & Main, A. J. (2004). Epidemiology of West Nile Virus in Connecticut : A Five-Year Analysis of Mosquito Data 1999–2003. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 4(4), 360-378. <https://doi.org/10.1089/vbz.2004.4.360>
- Angleró-Rodríguez, Y. I., Blumberg, B. J., Dong, Y., Sandiford, S. L., Pike, A., Clayton, A. M., & Dimopoulos, G. (2016). A natural *Anopheles*-associated *Penicillium chrysogenum* enhances mosquito susceptibility to *Plasmodium* infection. *Scientific Reports*, 6, 34084. <https://doi.org/10.1038/srep34084>
- Banque Mondiale. (2022, octobre 6). *Développement urbain*. World Bank. <https://www.banquemondiales.org/fr/topic/urbandevelopment/overview>
- Becker, N., Jöst, H., Ziegler, U., Eiden, M., Höper, D., Emmerich, P., Fichet-Calvet, E., Ehichioya, D. U., Czajka, C., Gabriel, M., Hoffmann, B., Beer, M., Tenner-Racz, K., Racz, P., Günther, S., Wink, M., Bosch, S., Konrad, A., Pfeffer, M., ... Schmidt-Chanasit, J. (2012). Epizootic Emergence of Usutu Virus in Wild and Captive Birds in Germany. *PLOS ONE*, 7(2), e32604. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032604>
- Becker, N., Petric, D., Zgomba, M., Boase, C., Madon, M., Dahl, C., & Kaiser, A. (2010). *Mosquitoes and Their Control* (2nd ed. 2010.). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-540-92874-4>
- Beckers, A. (2020, octobre 15). *Une migration 2020 exceptionnelle ? Aves - Natagora*. <http://blog.aves.be/aves/2020/10/15/une-migration-2020-exceptionnelle>
- Beehler, J., Lohr, S., & DeFoliart, G. (1992). Factors influencing oviposition in *Aedes triseriatus* (Diptera : Culicidae). *The Great Lakes Entomologist (USA)*. [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Factors+influencing+oviposition+in+Aedes+triseriatus+%28Diptera%3A+Culicidae%29&author=Beehler%2C+J.+%28University+of+California%2C+Riverside%2C+CA%29&publication\\_year=1992](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Factors+influencing+oviposition+in+Aedes+triseriatus+%28Diptera%3A+Culicidae%29&author=Beehler%2C+J.+%28University+of+California%2C+Riverside%2C+CA%29&publication_year=1992)
- Belton, P. (1967). The effect of illumination and pool brightness on oviposition by *Culex restuans* (Theo.) in the field. *Mosquito News*, 27(1). <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19691000064>
- Benzarti, E., Sarlet, M., Franssen, M., Cadar, D., Schmidt-Chanasit, J., Rivas, J. F., Linden, A., Desmecht, D., & Garigliany, M. (2020). Usutu Virus Epizootic in Belgium in 2017 and 2018 : Evidence of Virus Endemization and Ongoing Introduction Events. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 20(1), 43-50. <https://doi.org/10.1089/vbz.2019.2469>
- Bian, G., Xu, Y., Lu, P., Xie, Y., & Xi, Z. (2010). The endosymbiotic bacterium *Wolbachia* induces resistance to dengue virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Pathogens*, 6(4), e1000833. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000833>
- Bond, J. G., Arredondo-Jiménez, J. I., Rodríguez, M. H., Quiroz-Martínez, H., & Williams, T. (2005). Oviposition habitat selection for a predator refuge and food source in a mosquito. *Ecological Entomology*, 30(3), 255-263. <https://doi.org/10.1111/j.0307-6946.2005.00704.x>

- Bossche, D. V. D., Cnops, L., Meersman, K., Domingo, C., Gompel, A. V., & Esbroeck, M. V. (2015). Chikungunya virus and West Nile virus infections imported into Belgium, 2007–2012. *Epidemiology & Infection*, *143*(10), 2227-2236. <https://doi.org/10.1017/S0950268814000685>
- Boukraa, S., Dekoninck, W., Versteirt, V., Schaffner, F., Coosemans, M., Haubruge, E., & Francis, F. (2015). Updated checklist of the mosquitoes (Diptera : Culicidae) of Belgium. *Journal of Vector Ecology*, *40*(2), 398-407. <https://doi.org/10.1111/jvec.12180>
- Boukraa, S., de La Grandiere, M. A., Bawin, T., Raharimalala, F. N., Zimmer, J.-Y., Haubruge, E., Thiry, E., & Francis, F. (2016). Diversity and ecology survey of mosquitoes potential vectors in Belgian equestrian farms : A threat prevention of mosquito-borne equine arboviruses. *Preventive Veterinary Medicine*, *124*, 58-68. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.12.013>
- Bozorg-Omid, F., Oshaghi, M. A., Vahedi, M., Karimian, F., Seyyed-Zadeh, S. J., & Chavshin, A. R. (2020). Wolbachia infection in West Nile Virus vectors of northwest Iran. *Applied Entomology and Zoology*, *55*(1), 105-113. <https://doi.org/10.1007/s13355-019-00658-6>
- Braks, M., van der Giessen, J., Kretzschmar, M., van Pelt, W., Scholte, E.-J., Reusken, C., Zeller, H., van Bortel, W., & Sprong, H. (2011). Towards an integrated approach in surveillance of vector-borne diseases in Europe. *Parasites & Vectors*, *4*, 192. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-4-192>
- Brugger, K., & Rubel, F. (2009). Simulation of climate-change scenarios to explain Usutu-virus dynamics in Austria. *Preventive Veterinary Medicine*, *88*(1), 24-31. <https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2008.06.023>
- Cadar, D., Lühken, R., van der Jeugd, H., Garigliany, M., Ziegler, U., Keller, M., Lahoreau, J., Lachmann, L., Becker, N., Kik, M., Oude Munnink, B., Bosch, S., Tannich, E., Linden, A., Schmidt, V., Koopmans, M., Rijks, J., Desmecht, D., Groschup, M., & Schmidt-Chanasit, J. (2017). Widespread activity of multiple lineages of Usutu virus, Western Europe, 2016. *Eurosurveillance: bulletin europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*, *22*. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.4.30452>
- Cavrini, F., Gaibani, P., Longo, G., Pierro, A. M., Rossini, G., Bonilauri, P., Gerunda, G. E., Benedetto, F. D., Pasetto, A., Girardis, M., Dottori, M., Landini, M. P., & Sambri, V. (2009). Usutu virus infection in a patient who underwent orthotopic liver transplantation, Italy, August-September 2009. *Eurosurveillance*, *14*(50), 19448. <https://doi.org/10.2807/ese.14.50.19448-en>
- CDC. (2021, septembre 20). *Dengue Symptoms and Treatment* | CDC. Centers for Disease Control and Prevention. <https://www.cdc.gov/dengue/symptoms/index.html>
- Choo, Y.-M., Buss, G. K., Tan, K., & Leal, W. S. (2015). Multitasking roles of mosquito labrum in oviposition and blood feeding. *Frontiers in Physiology*, *6*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2015.00306>
- Chvala, S., Kolodziejek, J., Nowotny, N., & Weissenböck, H. (2004). Pathology and Viral Distribution in Fatal Usutu Virus Infections of Birds from the 2001 and 2002 Outbreaks in Austria. *Journal of Comparative Pathology*, *131*(2), 176-185. <https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2004.03.004>
- Ciota, A. T., Matacchiero, A. C., Kilpatrick, A. M., & Kramer, L. D. (2014). The Effect of Temperature on Life History Traits of Culex Mosquitoes. *Journal of Medical Entomology*, *51*(1), 55-62. <https://doi.org/10.1603/ME13003>
- Cirimotich, C. M., Dong, Y., Clayton, A. M., Sandiford, S. L., Souza-Neto, J. A., Mulenga, M., & Dimopoulos, G. (2011). Natural Microbe-Mediated Refractoriness to Plasmodium Infection in Anopheles gambiae. *Science*, *332*(6031), 855-858. <https://doi.org/10.1126/science.1201618>
- Clements, A. (2000). *Biology of mosquitoes, Volume 1. Development, nutrition and reproduction*. Cabi.
- Climat.be. (2019). *Le climat*. Climat | Climat. <https://climat.be/en-belgique/climat-et-emissions/climat>
- Cnops, L., Papa, A., Lagra, F., Weyers, P., Meersman, K., Patsouros, N., & Esbroeck, M. V. (2013). West Nile Virus Infection in Belgian Traveler Returning from Greece. *Emerging Infectious Diseases*, *19*(4), 684. <https://doi.org/10.3201/eid1904.121594>

- Combs, M. A., Kache, P. A., VanAcker, M. C., Gregory, N., Plimpton, L. D., Tufts, D. M., Fernandez, M. P., & Diuk-Wasser, M. A. (2022). Socio-ecological drivers of multiple zoonotic hazards in highly urbanized cities. *Global Change Biology*, 28(5), 1705-1724. <https://doi.org/10.1111/gcb.16033>
- Constant, O., Gil, P., Barthelemy, J., Bolloré, K., Foulongne, V., Desmetz, C., Leblond, A., Desjardins, I., Pradier, S., Joulié, A., Sandoz, A., Amaral, R., Boisseau, M., Rakotoarivony, I., Baldet, T., Marie, A., Frances, B., Salze, F. R., Tinto, B., ... Simonin, Y. (2022). One Health surveillance of West Nile and Usutu viruses : A repeated cross-sectional study exploring seroprevalence and endemicity in Southern France, 2016 to 2020. *Eurosurveillance*, 27(25), 2200068. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2022.27.25.2200068>
- Contreras-Perera, Y. J., García-Rejón, J. E., Briceño-Méndez, M. A., Puc-Kauil, R., Delfín-González, H., Martin-Park, A., & Manrique-Saide, P. (2022). Diversity of mosquitoes (Diptera : Culicidae) in public parks of Merida, Yucatan, Mexico. *International Journal of Tropical Insect Science*, 42(5), 3263-3272. <https://doi.org/10.1007/s42690-022-00809-3>
- Coon, K. L., Vogel, K. J., Brown, M. R., & Strand, M. R. (2014). Mosquitoes rely on their gut microbiota for development. *Molecular Ecology*, 23(11), 2727-2739. <https://doi.org/10.1111/mec.12771>
- Day, J. F. (2016). Mosquito Oviposition Behavior and Vector Control. *Insects*, 7(4), Article 4. <https://doi.org/10.3390/insects7040065>
- Dejenie, T., Yohannes, M., & Assmelash, T. (2011). Characterization of Mosquito Breeding Sites in and in the Vicinity of Tigray Microdams. *Ethiopian Journal of Health Sciences*, 21(1), Article 1. <https://doi.org/10.4314/ejhs.v21i1.69045>
- Dekoninck, W., Pollet, M., & Grootaert, P. (2010). Composition and seasonal activity patterns of mosquito communities collected with malaise traps at Etang de Virelles Nature Reserve (Virelles, Hainaut), a migratory bird sanctuary and possible site for arbovirus transmission in Belgium. *European Mosquito Bulletin*, 28, 213-224.
- Dinno, A. (2017). *dunn.test : Dunn's Test of Multiple Comparisons Using Rank Sums* (1.3.5) [Logiciel]. <https://cran.r-project.org/web/packages/dunn.test/index.html>
- Dodson, B. L., Hughes, G. L., Paul, O., Maticchiero, A. C., Kramer, L. D., & Rasgon, J. L. (2014). Wolbachia Enhances West Nile Virus (WNV) Infection in the Mosquito *Culex tarsalis*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(7), e2965. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002965>
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., & Hurst, G. D. (2008). The diversity of reproductive parasites among arthropods : Wolbachia do not walk alone. *BMC Biology*, 6(1), 27. <https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-27>
- ECDC. (2018, septembre 20). *Factsheet about West Nile virus infection*. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/facts>
- ECDC. (2022, décembre 15). *Weekly updates : 2022 West Nile virus transmission season*. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc>
- ECDC. (2023, juin 30). *Weekly updates : 2023 West Nile virus transmission season*. European Centre for Disease Prevention and Control. <https://www.ecdc.europa.eu/en/west-nile-fever/surveillance-and-disease-data/disease-data-ecdc>
- Emidi, B., Kisinza, W. N., Mmbando, B. P., Malima, R., & Mosha, F. W. (2017). Effect of physicochemical parameters on Anopheles and Culex mosquito larvae abundance in different breeding sites in a rural setting of Muheza, Tanzania. *Parasites & Vectors*, 10(1), 304. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2238-x>
- Engel, P., & Moran, N. A. (2013). The gut microbiota of insects – diversity in structure and function. *FEMS Microbiology Reviews*, 37(5), 699-735. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12025>
- European Centre for Disease Prevention and Control. (2014). *Guidelines for the surveillance of native mosquitoes in Europe*. Publications Office. <https://data.europa.eu/doi/10.2900/37227>
- Figuroa, D. P., Scott, S., Gonzalez, C. R., Veloso, C., & Canals, M. (2016). Assessing the larval niche of *Culex pipiens* in Chile. *International Journal of Mosquito Research*, 2016(3(4)), 11-16.

- Foster, W. A., & Walker, E. D. (2002). 12—MOSQUITOES (Culicidae). In G. Mullen & L. Durden (Éds.), *Medical and Veterinary Entomology* (p. 203-262). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-012510451-7/50014-1>
- Foster, W. A., & Walker, E. D. (2019). Chapter 15—Mosquitoes (Culicidae). In G. R. Mullen & L. A. Durden (Éds.), *Medical and Veterinary Entomology (Third Edition)* (p. 261-325). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814043-7.00015-7>
- Gaibani, P., & Rossini, G. (2017). An overview of Usutu virus. *Microbes and Infection*, *19*(7), 382-387. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2017.05.003>
- Gardner, A. M., Hamer, G. L., Hines, A. M., Newman, C. M., Walker, E. D., & Ruiz, M. O. (2012). Weather Variability Affects Abundance of Larval Culex (Diptera : Culicidae) in Storm Water Catch Basins in Suburban Chicago. *Journal of Medical Entomology*, *49*(2), 270. <https://doi.org/10.1603/me11073>
- Garigliany, M., Linden, A., Gilliau, G., Levy, E., Sarlet, M., Franssen, M., Benzarti, E., Derouaux, A., Francis, F., & Desmecht, D. (2017). Usutu virus, Belgium, 2016. *Infection, Genetics and Evolution*, *48*, 116-119. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.12.023>
- Garigliany, M.-M., Marlier, D., Tenner-Racz, K., Eiden, M., Cassart, D., Gandar, F., Beer, M., Schmidt-Chanasit, J., & Desmecht, D. (2014). Detection of Usutu virus in a bullfinch (*Pyrrhula pyrrhula*) and a great spotted woodpecker (*Dendrocopos major*) in north-west Europe. *Veterinary Journal (London, England: 1997)*, *199*(1), 191-193. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.10.017>
- Glaser, R. L., & Meola, M. A. (2010). The Native Wolbachia Endosymbionts of *Drosophila melanogaster* and *Culex quinquefasciatus* Increase Host Resistance to West Nile Virus Infection. *PLOS ONE*, *5*(8), e11977. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011977>
- Golding, N., Nunn, M. A., & Purse, B. V. (2015). Identifying biotic interactions which drive the spatial distribution of a mosquito community. *Parasites & Vectors*, *8*(1), 367. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-0915-1>
- González, M. A., Prosser, S. W., Hernández-Triana, L. M., Alarcón-Elbal, P. M., Goiri, F., López, S., Ruiz-Arrondo, I., Hebert, P. D. N., & García-Pérez, A. L. (2020). Avian Feeding Preferences of *Culex pipiens* and *Culiseta* spp. Along an Urban-to-Wild Gradient in Northern Spain. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *8*. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fevo.2020.568835>
- Grottola, A., Marcacci, M., Tagliacuzzi, S., Gennari, W., Di Gennaro, A., Orsini, M., Monaco, F., Marchegiano, P., Marini, V., Meacci, M., Rumpianesi, F., Lorusso, A., Pecorari, M., & Savini, G. (2017). Usutu virus infections in humans : A retrospective analysis in the municipality of Modena, Italy. *Clinical Microbiology and Infection*, *23*(1), 33-37. <https://doi.org/10.1016/j.cmi.2016.09.019>
- Haldar, K., Bhattacharjee, S., & Safeukui, I. (2018). Drug resistance in Plasmodium. *Nature Reviews Microbiology*, *16*(3), Article 3. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.161>
- Hery, L., Boullis, A., & Vega-Rúa, A. (2021). Biotic and abiotic properties of aedes aegypti breeding sites and their influence on adult phenotypic traits. A review. *Biotechnology, Agronomy and Society and Environment*, *25*(1), 57-71. Scopus. <https://doi.org/10.25518/1780-4507.18886>
- Hery, L., Guidez, A., Durand, A.-A., Delannay, C., Normandeau-Guimond, J., Reynaud, Y., Issaly, J., Goindin, D., Legrave, G., Gustave, J., Raffestin, S., Breurec, S., Constant, P., Dusfour, I., Guertin, C., & Vega-Rúa, A. (2021). Natural Variation in Physicochemical Profiles and Bacterial Communities Associated with Aedes aegypti Breeding Sites and Larvae on Guadeloupe and French Guiana. *Microbial Ecology*, *81*(1), 93-109. <https://doi.org/10.1007/s00248-020-01544-3>
- Hoffmann, A. A., Montgomery, B. L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P. H., Muzzi, F., Greenfield, M., Durkan, M., Leong, Y. S., Dong, Y., Cook, H., Axford, J., Callahan, A. G., Kenny, N., Omodei, C., McGraw, E. A., Ryan, P. A., Ritchie, S. A., Turelli, M., & O'Neill, S. L. (2011). Successful establishment of Wolbachia in Aedes populations to suppress dengue transmission. *Nature*, *476*(7361), Article 7361. <https://doi.org/10.1038/nature10356>
- Horsfall, W. R. (1973). *Bionomics and embryology of the inland floodwater mosquito Aedes vexans*. University of Illinois Press.

- [https://scholar.google.com/scholar\\_lookup?title=Bionomics+and+embryology+of+the+inland+floodwater+mosquito+Aedes+vexans&author=Horsfall%2C+William+Robert&publication\\_year=1973](https://scholar.google.com/scholar_lookup?title=Bionomics+and+embryology+of+the+inland+floodwater+mosquito+Aedes+vexans&author=Horsfall%2C+William+Robert&publication_year=1973)
- Hughes, G. L., Vega-Rodriguez, J., Xue, P., & Rasgon, J. L. (2012). Wolbachia Strain wAlbB Enhances Infection by the Rodent Malaria Parasite *Plasmodium berghei* in *Anopheles gambiae* Mosquitoes. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(5), 1491-1495. <https://doi.org/10.1128/AEM.06751-11>
- Humblet, M.-F., Vandeputte, S., Fecher-Bourgeois, F., Léonard, P., Gosset, C., Balenghien, T., Durand, B., & Saegerman, C. (2016). Estimating the economic impact of a possible equine and human epidemic of West Nile virus infection in Belgium. *Eurosurveillance*, 21(31), 30309. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.31.30309>
- Husson, F., Josse, J., Le, S., & Mazet, J. (2023). *Multivariate Exploratory Data Analysis and Data Mining* (2.8) [R]. <http://factominer.free.fr>
- Hyde, J. E. (2005). Drug-resistant malaria. *Trends in Parasitology*, 21(11), 494-498. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2005.08.020>
- Ibrahim, A. E., El-Monairy, O., El-Sayed, Y., & Baz, M. (2011). Mosquito breeding sources in Qalyubiya Governorate, Egypt. *Egyptian Academic Journal of Biological Sciences, E. Medical Entomology & Parasitology*, 3(1), 25-39. <https://doi.org/10.21608/eajbse.2011.16454>
- Institut Royal Météorologique. (2021). *Statistiques climatiques des communes belges, Liège (INS 62063)*.
- Intergovernmental Panel on Climate Change. (2014). Human Health : Impacts, Adaptation, and Co-Benefits. In *Climate Change 2014 – Impacts, Adaptation and Vulnerability : Part A: Global and Sectoral Aspects* (p. 709-754). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415379.016>
- Kambris, Z., Cook, P. E., Phuc, H. K., & Sinkins, S. P. (2009). Immune Activation by Life-Shortening Wolbachia and Reduced Filarial Competence in Mosquitoes. *Science*, 326(5949), 134-136. <https://doi.org/10.1126/science.1177531>
- Kenawy, M. A., Ammar, S. E., & Abdel-Rahman, H. A. (2013). Physico-chemical characteristics of the mosquito breeding water in two urban areas of Cairo Governorate, Egypt. *Journal of Entomological and Acarological Research*, 45(3), Article 3. <https://doi.org/10.4081/jear.2013.e17>
- Kennedy, J. S. (1942). On Water-finding and Oviposition by captive Mosquitoes. *Bulletin of Entomological Research*, 32(4), 279-301. <https://doi.org/10.1017/S0007485300017235>
- Khrabrova, N., E. B., Sibataev, A., & T, V. (2009). The distribution of strains of endosymbiotic bacteria *Wolbachia pipientis* in natural populations of *Culex pipiens* mosquitoes (Diptera : Culicidae). *Journal of the European Mosquito Control Association*. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/400/1/012012>
- Kibuthu, T. W., Njenga, S. M., Mbugua, A. K., & Muturi, E. J. (2016). Agricultural chemicals : Life changer for mosquito vectors in agricultural landscapes? *Parasites & Vectors*, 9(1), 500. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1788-7>
- Kilpatrick, A. M., Kramer, L. D., Campbell, S. R., Alleyne, E. O., Dobson, A. P., & Daszak, P. (2005). West Nile Virus Risk Assessment and the Bridge Vector Paradigm. *Emerging Infectious Diseases*, 11(3), 425-429. <https://doi.org/10.3201/eid1103.040364>
- Kinga, H., Kengne-Ouafu, J. A., King, S. A., Egyirifa, R. K., Aboagye-Antwi, F., & Akorli, J. (2022). Water Physicochemical Parameters and Microbial Composition Distinguish *Anopheles* and *Culex* Mosquito Breeding Sites : Potential as Ecological Markers for Larval Source Surveillance. *Journal of Medical Entomology*, 59(5), 1817-1826. <https://doi.org/10.1093/jme/tjac115>
- Kolimenakis, A., Heinz, S., Wilson, M. L., Winkler, V., Yakob, L., Michaelakis, A., Papachristos, D., Richardson, C., & Horstick, O. (2021). The role of urbanisation in the spread of *Aedes* mosquitoes and the diseases they transmit—A systematic review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 15(9), e0009631. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0009631>
- Lalami, A. E. O., Hilali, O. E., Benlamlh, M., Merzouki, M., Raiss, N., Koraichi, S. I., & Himmi, O. (2010). Etude entomologique, physicochimique et bactériologique des gîtes larvaires de localités à

- risque potentiel pour le paludisme dans la ville de Fès. *Bulletin de l'Institut Scientifique*, 32(2), 119-127.
- Leggewie, M., Krumkamp, R., Badusche, M., Heitmann, A., Jansen, S., Schmidt-Chanasit, J., Tannich, E., & Becker, S. C. (2018). *Culex torrentium* mosquitoes from Germany are negative for Wolbachia. *Medical and Veterinary Entomology*, 32(1), 115-120. <https://doi.org/10.1111/mve.12270>
- Lühken, R., Steinke, S., Leggewie, M., Tannich, E., Krüger, A., Becker, S., & Kiel, E. (2015). Physico-Chemical Characteristics of *Culex pipiens sensu lato* and *Culex torrentium* (Diptera : Culicidae) Breeding Sites in Germany. *Journal of Medical Entomology*, 52(5), 932-936. <https://doi.org/10.1093/jme/tjv070>
- Manarolla, G., Bakonyi, T., Gallazzi, D., Crosta, L., Weissenböck, H., Dorresteijn, G. M., & Nowotny, N. (2010). Usutu virus in wild birds in northern Italy. *Veterinary Microbiology*, 141(1), 159-163. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.07.036>
- McLeod, A. I., & Lai, C. X. and Y. (2020). *bestglm : Best Subset GLM and Regression Utilities* (0.37.3) [Logiciel]. <https://cran.r-project.org/web/packages/bestglm/index.html>
- McMeniman, C. J., Lane, R. V., Cass, B. N., Fong, A. W. C., Sidhu, M., Wang, Y.-F., & O'Neill, S. L. (2009). Stable introduction of a life-shortening Wolbachia infection into the mosquito *Aedes aegypti*. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5910), 141-144. <https://doi.org/10.1126/science.1165326>
- Meister, S., Agianian, B., Turlure, F., Relógio, A., Morlais, I., Kafatos, F. C., & Christophides, G. K. (2009). Anopheles gambiae PGRPLC-Mediated Defense against Bacteria Modulates Infections with Malaria Parasites. *PLOS Pathogens*, 5(8), e1000542. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000542>
- Moreira, L. A., Iturbe-Ormaetxe, I., Jeffery, J. A., Lu, G., Pyke, A. T., Hedges, L. M., Rocha, B. C., Hall-Mendelin, S., Day, A., Riegler, M., Hugo, L. E., Johnson, K. N., Kay, B. H., McGraw, E. A., van den Hurk, A. F., Ryan, P. A., & O'Neill, S. L. (2009). A Wolbachia symbiont in *Aedes aegypti* limits infection with dengue, Chikungunya, and Plasmodium. *Cell*, 139(7), 1268-1278. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.11.042>
- Mouatassem, T. F., El Ouali Lalami, A., Faraj, C., Rais, N., & Guemmouh, R. (2020). Study of Abiotic and Biotic Parameters Affecting the Abundance of Mosquito Larvae (Diptera : Culicidae) in the Region of Fez (Morocco). *International Journal of Zoology*, 7. <https://doi.org/10.1155/2020/5429472>
- Nikolay, B., Diallo, M., Boye, C. S. B., & Sall, A. A. (2011). Usutu Virus in Africa. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, 11(11), 1417-1423. <https://doi.org/10.1089/vbz.2011.0631>
- Nikookar, S. H., Fazeli-Dinan, M., Azari-Hamidian, S., Mousavinasab, S. N., Aarabi, M., Ziapour, S. P., Esfandyari, Y., & Enayati, A. (2017). Correlation between mosquito larval density and their habitat physicochemical characteristics in Mazandaran Province, northern Iran. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 11(8), e0005835. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005835>
- Novakova, E., Woodhams, D. C., Rodríguez-Ruano, S. M., Brucker, R. M., Leff, J. W., Maharaj, A., Amir, A., Knight, R., & Scott, J. (2017). Mosquito microbiome dynamics, a background for prevalence and seasonality of West Nile virus. *Frontiers in Microbiology*, 8(APR). Scopus. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00526>
- O'Connor, L., Plichart, C., Sang, A. C., Brelsfoard, C. L., Bossin, H. C., & Dobson, S. L. (2012). Open Release of Male Mosquitoes Infected with a Wolbachia Biopesticide : Field Performance and Infection Containment. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 6(11), e1797. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001797>
- Oksanen, J., Simpson, G. L., Blanchet, F. G., Kindt, R., Legendre, P., Minchin, P. R., O'Hara, R. B., Solymos, P., Stevens, M. H. H., Szoecs, E., Wagner, H., Barbour, M., Bedward, M., Bolker, B., Borcard, D., Carvalho, G., Chirico, M., Caceres, M. D., Durand, S., ... Weedon, J. (2022). *vegan : Community Ecology Package* (2.6-4) [Logiciel]. <https://cran.r-project.org/web/packages/vegan/index.html>

- OMS, (Organisation Mondiale de la Santé). (1975). *Manual of Practical Entomology in Malaria : Vector bionomics and organization of anti-malaria activities*. World Health Organization.
- OMS, (Organisation Mondiale de la Santé). (2017, octobre 3). *West Nile virus*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/west-nile-virus>
- OMS, (Organisation Mondiale de la Santé). (2020, mars 2). *Vector-borne diseases*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>
- OMS, (Organisation Mondiale de la Santé). (2022a, janvier 10). *Dengue et dengue sévère*. Organisation Mondiale de la Santé. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dengue-and-severe-dengue>
- OMS, (Organisation Mondiale de la Santé). (2022b, mars 16). *Filariose lymphatique*. Organisation Mondiale de la Santé. <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/lymphatic-filariasis>
- OMS, (Organisation Mondiale de la Santé). (2022c, décembre 8). *Fact sheet about malaria*. World Health Organization. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/malaria>
- Onchuru, T. O., Ajamma, Y. U., Burugu, M., Kaltenpoth, M., Masiga, D., & Villingner, J. (2016). Chemical parameters and bacterial communities associated with larval habitats of Anopheles, Culex and Aedes mosquitoes (Diptera : Culicidae) in western Kenya. *International Journal of Tropical Insect Science*, 36(3), 146-160. Scopus. <https://doi.org/10.1017/S1742758416000096>
- O'Neill, S. L., Ryan, P. A., Turley, A. P., Wilson, G., Retzki, K., Iturbe-Ormaetxe, I., Dong, Y., Kenny, N., Paton, C. J., Ritchie, S. A., Brown-Kenyon, J., Stanford, D., Wittmeier, N., Jewell, N. P., Tanamas, S. K., Anders, K. L., & Simmons, C. P. (2019). *Scaled deployment of Wolbachia to protect the community from dengue and other Aedes transmitted arboviruses* (2:36). Gates Open Research. <https://doi.org/10.12688/gatesopenres.12844.3>
- Osório, H. C., Zé-Zé, L., Amaro, F., Nunes, A., & Alves, M. J. (2014). Sympatric occurrence of Culex pipiens (Diptera, Culicidae) biotypes pipiens, molestus and their hybrids in Portugal, Western Europe : Feeding patterns and habitat determinants. *Medical and Veterinary Entomology*, 28(1), 103-109. <https://doi.org/10.1111/mve.12020>
- Paz, S. (2015). Climate change impacts on West Nile virus transmission in a global context. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1665), 1-11. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0561>
- Peach, D. A. H., & Gries, G. (2020). Mosquito phytophagy – sources exploited, ecological function, and evolutionary transition to haematophagy. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 168(2), 120-136. <https://doi.org/10.1111/eea.12852>
- Pecorari, M., Longo, G., Gennari, W., Grottole, A., Sabbatini, A. M., Tagliazucchi, S., Savini, G., Monaco, F., Simone, M. L., Lelli, R., & Rumpianesi, F. (2009). First human case of Usutu virus neuroinvasive infection, Italy, August-September 2009. *Eurosurveillance*, 14(50), 19446. <https://doi.org/10.2807/ese.14.50.19446-en>
- Perez, F. (2013). *Serial Cloner* (2.6) [Logiciel]. SerialBasics.
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing* [Logiciel]. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org/>
- Raharimalala, F. N., Boukraa, S., Bawin, T., Boyer, S., & Francis, F. (2016). Molecular detection of six (endo-) symbiotic bacteria in Belgian mosquitoes : First step towards the selection of appropriate paratransgenesis candidates. *Parasitology Research*, 115(4), 1391-1399. <https://doi.org/10.1007/s00436-015-4873-5>
- Randolph, S. E., & Rogers, D. J. (2010). The arrival, establishment and spread of exotic diseases : Patterns and predictions. *Nature Reviews. Microbiology*, 8(5), 361-371. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2336>
- Reiskind, M. H., Greene, K. L., & Lounibos, L. P. (2009). Leaf species identity and combination affect performance and oviposition choice of two container mosquito species. *Ecological entomology*, 34(4), 447-456. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2311.2008.01067.x>

- Reiter, P. (1991). *ENHANCEMENT OF THE CDC OVITRAP WITH HAY INFUSIONS FOR DAILY MONITORING OF AEDES AEGYP?/ POPULATIONS.*
- Rejmankova, E., Savage, H. M., Rejmanek, M., Arredondo-Jimenez, J. I., & Roberts, D. R. (1991). Multivariate Analysis of Relationships Between Habitats, Environmental Factors and Occurrence of Anopheline Mosquito Larvae *Anopheles albimanus* and *A. pseudopunctipennis* in Southern Chiapas, Mexico. *Journal of Applied Ecology*, 28(3), 827-841. <https://doi.org/10.2307/2404210>
- Rouffaer, L. O., Steensels, M., Verlinden, M., Vervaeke, M., Boonyarittichaikij, R., Martel, A., & Lambrecht, B. (2018). Usutu Virus Epizootic and Plasmodium Coinfection in Eurasian Blackbirds (*Turdus merula*) in Flanders, Belgium. *Journal of Wildlife Diseases*, 54(4), 859-862. <https://doi.org/10.7589/2017-07-163>
- Ruybal, J. E., Kramer, L. D., & Kilpatrick, A. M. (2016). Geographic variation in the response of *Culex pipiens* life history traits to temperature. *Parasites & Vectors*, 9(1), 116. <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1402-z>
- Schaffner, F., Angel, G., Geoffroy, B., Hervy, J.-P., Rhaim, A., & Brunhes, J. (2001). *MousEurope* [Logiciel]. Entente interdépartementale pour la démoustication du littoral méditerranéen & Institut de recherche pour le développement.
- Semenza, J. C., Tran, A., Espinosa, L., Sudre, B., Domanovic, D., & Paz, S. (2016). Climate change projections of West Nile virus infections in Europe : Implications for blood safety practices. *Environmental Health: A Global Access Science Source*, 15. Scopus. <https://doi.org/10.1186/s12940-016-0105-4>
- Silberbush, A., Abramsky, Z., & Tsurim, I. (2015). Dissolved Oxygen Levels Affect the Survival and Developmental Period of the Mosquito *Culex pipiens*. *Journal of Vector Ecology*, 40(2), 425-427. <https://doi.org/10.1111/jvec.12186>
- Sinkins, S. P., Walker, T., Lynd, A. R., Steven, A. R., Makepeace, B. L., J. Godfray, H. C., & Parkhill, J. (2005). *Wolbachia* variability and host effects on crossing type in *Culex* mosquitoes. *Nature*, 436(7048), Article 7048. <https://doi.org/10.1038/nature03629>
- Soto, A., Coninck, L. D., Devlies, A.-S., Wiele, C. V. D., Rosas, A. L. R., Wang, L., Matthijnsens, J., & Delang, L. (2023). Belgian *Culex pipiens pipiens* are competent vectors for West Nile virus while *Culex modestus* are competent vectors for Usutu virus. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 17(9), e0011649. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0011649>
- Statbel. (2023, janvier 1). *Liège / Statbel*. Statbel. <https://statbel.fgov.be/fr/commune/liege#dashboard1>
- Stouthamer, R., Breeuwer, J. A., & Hurst, G. D. (1999). *Wolbachia pipientis* : Microbial manipulator of arthropod reproduction. *Annual Review of Microbiology*, 53, 71-102. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.53.1.71>
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). *MEGA11 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11* [Logiciel].
- Thakur, A., & Kocher, D. K. (2022). The effect of cladoceran, *Daphnia magna*, on the growth and pupation of *Aedes aegypti* L. mosquito larvae. *The Journal of Basic and Applied Zoology*, 83(1), 36. <https://doi.org/10.1186/s41936-022-00301-x>
- Turley, A. P., Moreira, L. A., O'Neill, S. L., & McGraw, E. A. (2009). *Wolbachia* Infection Reduces Blood-Feeding Success in the Dengue Fever Mosquito, *Aedes aegypti*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 3(9), e516. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000516>
- Versteirt, V., Boyer, S., Damiens, D., Clercq, E. M. D., Dekoninck, W., Ducheyne, E., Grootaert, P., Garros, C., Hance, T., Hendrickx, G., Coosemans, M., & Bortel, W. V. (2013). Nationwide inventory of mosquito biodiversity (Diptera : Culicidae) in Belgium, Europe. *Bulletin of Entomological Research*, 103(2), 193-203. <https://doi.org/10.1017/S0007485312000521>
- Vezzani, D., & Albicocco, A. P. (2009). The effect of shade on the container index and pupal productivity of the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex pipiens* breeding in artificial containers. *Medical and Veterinary Entomology*, 23(1), 78-84. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.2008.00783.x>

- Vilibic-Cavlek, T., Kaic, B., Barbic, L., Pem-Novosel, I., Slavic-Vrzic, V., Lesnikar, V., Kurecic-Filipovic, S., Babic-Erceg, A., Listes, E., Stevanovic, V., Gjenero-Margan, I., & Savini, G. (2014). First evidence of simultaneous occurrence of West Nile virus and Usutu virus neuroinvasive disease in humans in Croatia during the 2013 outbreak. *Infection*, *42*(4), 689-695. <https://doi.org/10.1007/s15010-014-0625-1>
- Vinayagam, S., Rajendran, D., Sekar, K., Renu, K., & Sattu, K. (2023). The microbiota, the malarial parasite, and the mosquito [MMM] – A three-sided relationship. *Molecular and Biochemical Parasitology*, *253*. Scopus. <https://doi.org/10.1016/j.molbiopara.2023.111543>
- Vogels, C. B., Göertz, G. P., Pijlman, G. P., & Koenraadt, C. J. (2017). Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus. *Emerging Microbes & Infections*, *6*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/emi.2017.82>
- Wagner, S., Guidi, V., Torgerson, P. R., Mathis, A., & Schaffner, F. (2018). Diversity and seasonal abundances of mosquitoes at potential arboviral transmission sites in two different climate zones in Switzerland. *Medical and Veterinary Entomology*, *32*(2), 175-185. <https://doi.org/10.1111/mve.12292>
- Wang, L., Rosales Rosas, A. L., De Coninck, L., Shi, C., Bouckaert, J., Matthijnsens, J., & Delang, L. (2021). Establishment of *Culex modestus* in Belgium and a Glance into the Virome of Belgian Mosquito Species. *mSphere*, *6*(2), e01229-20. <https://doi.org/10.1128/mSphere.01229-20>
- Wan-Norafikah, O., Chen, C.D, Mohd-Amir, M.H, Azahari, A.H, Zainal-Abidin, A.H, Nazni, W.A., Mariam, M., Mohd-Shahizan, J., & Sofian-Azirun, M. (2018). Single and co-breeding of different mosquito species in fogging-free and dengue risk areas in West Malaysia. *Tropical Biomedicine*, *35*(3), 826-838.
- Wayne, J. C. (2023). *Rutgers Center for Vector Biology : Culex territans Walker*. New Jersey Agricultural Experiment Station. <https://vectorbio.rutgers.edu/outreach/species/terr.htm>
- Weissenböck, H., Bakonyi, T., Rossi, G., Mani, P., & Nowotny, N. (2013). Usutu Virus, Italy, 1996—Volume 19, Number 2—February 2013—Emerging Infectious Diseases journal—CDC. *Emerging Infectious Diseases Journal*, *19*(2), 274-277. <https://doi.org/10.3201/eid1902.121191>
- Werren, J. H., Baldo, L., & Clark, M. E. (2008). Wolbachia : Master manipulators of invertebrate biology. *Nature Reviews Microbiology*, *6*(10), Article 10. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1969>
- Wilke, A. B. B., Beier, J. C., & Benelli, G. (2020). Filariasis vector control down-played due to the belief the drugs will be enough – not true! *Entomologia Generalis*, 15-24. <https://doi.org/10.1127/entomologia/2019/0776>
- Wolf, K. D., Vanderheyden, A., Deblauwe, I., Smits, N., Gombeer, S., Vanslembrouck, A., Meganck, K., Dekoninck, W., Meyer, M. D., Backeljau, T., Müller, R., & Bortel, W. V. (2021). First record of the West Nile virus bridge vector *Culex modestus* Ficalbi (Diptera : Culicidae) in Belgium, validated by DNA barcoding. *Zootaxa*, *4920*(1), Article 1. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.4920.1.7>
- Wollants, E., Smolders, D., Naesens, R., Bruynseels, P., Lagrou, K., Matthijnsens, J., & Van Ranst, M. (2018). Use of Next-Generation Sequencing for Diagnosis of West Nile Virus Infection in Patient Returning to Belgium from Hungary. *Emerging Infectious Diseases*, *24*(12), 2380-2382. <https://doi.org/10.3201/eid2412.180494>
- Zhou, W., Rousset, F., & O'Neill, S. (1998). Phylogeny and PCR-Based Classification of Wolbachia Strains Using WSP Gene Sequences. *Proceedings: Biological Sciences*, *265*(1395), 509-515.
- Ziegler, U., Jöst, H., Müller, K., Fischer, D., Rinder, M., Tietze, D. T., Danner, K.-J., Becker, N., Skuballa, J., Hamann, H.-P., Bosch, S., Fast, C., Eiden, M., Schmidt-Chanasit, J., & Groschup, M. H. (2015). Epidemic Spread of Usutu Virus in Southwest Germany in 2011 to 2013 and Monitoring of Wild Birds for Usutu and West Nile Viruses. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, *15*(8), 481-488. <https://doi.org/10.1089/vbz.2014.1746>

## 7. Annexes

Tableau S1 : Nombre d'espèces relevées dans chaque parc et dans l'ensemble des parcs, estimateur et écart-type de Chao.

	Nb. d'espèces relevées	Chao	Ecart-type
<b>Avroy</b>	7	14,88	11,49
<b>Boverie</b>	6	6,99	1,85
<b>Droixhe</b>	3	3,47	1,26
<b>Jardin Botanique</b>	5	5,98	2,16
<b>Ensemble des parcs</b>	10	19,96	10,13

Tableau S2 : Résultats du test de Dunn sur le pH des gîtes. Une case présente le résultat de la comparaison via le test Z de Dunn d'un type (colonne) avec un autre (ligne) ainsi que la p-valeur. \* indique une p-valeur significative à  $\alpha = 0,1$ .

Moyennes colonnes- Moyennes lignes	Bac pier.	Bac plas.	Bache	Bromélia.	Egout	Etang	Flaque	PP claire	PP infu.	Gobelets
Bac plas.	2.781580 0.0027*									
Bache	2.511002 0.0060*	-0.067305 0.4732								
Bromélia.	0.871550 0.1917	-0.283585 0.3884	-0.246931 0.4025							
Egout	8.785383 0.0000*	3.596673 0.0002*	3.380989 0.0004*	1.680595 0.0464*						
Etang	1.037341 0.1498	-1.458945 0.0723	-1.317412 0.0939	-0.414005 0.3394	-5.353717 0.0000*					
Flaque	1.455686 0.0727	0.283585 0.3884	0.313105 0.3771	0.425378 0.3353	-1.086986 0.1385	0.979088 0.1638				
PP claire	1.119895 0.1314	-1.167989 0.1214	-1.055329 0.1456	-0.318434 0.3751	-4.484348 0.0000*	0.168455 0.4331	-0.871804 0.1917			
PP infu.	0.831199 0.2029	-1.485204 0.0687	-1.354016 0.0879	-0.464126 0.3213	-5.008943 0.0000*	-0.110587 0.4560	-1.021078 0.1536	-0.262803 0.3964		
Gobelets	1.402593 0.0804	-1.093026 0.1372	-0.973286 0.1652	-0.247797 0.4021	-4.774875 0.0000*	0.334583 0.3690	-0.810520 0.2088	0.142624 0.4433	0.424926 0.3354	
Trou ter.	1.260389 0.1038	-0.473330 0.3180	-0.413082 0.3398	-0.035642 0.4858	-2.670847 0.0038*	0.545765 0.2926	-0.544067 0.2932	0.398550 0.3451	0.609933 0.2710	0.302303 0.3812

Tableau S3 : Résultats du test de Dunn sur l'OD des gîtes. Une case présente le résultat de la comparaison via le test Z de Dunn d'un type (colonne) avec un autre (ligne) ainsi que la p-valeur. \* indique une p-valeur significative à  $\alpha = 0,1$ .

Moyennes colonnes- Moyennes lignes	Bac pier.	Bac plas.	Bache	Bromélia.	Egout	Etang	Flaque	PP claire	PP infu.	Gobelets
Bac plas.	-0.231002 0.4087									
Bache	0.227597 0.4100	0.388060 0.3490								
Bromélia.	-0.015330 0.4939	0.078943 0.4685	-0.112817 0.4551							
Egout	6.897667 0.0000*	5.492162 0.0000*	4.553368 0.0000*	2.030441 0.0212*						
Etang	-0.664939 0.2530	-0.380330 0.3518	-0.743112 0.2287	-0.260235 0.3973	-5.830283 0.0000*					
Flaque	1.719180 0.0428*	1.763082 0.0389*	1.550135 0.0606	1.263103 0.1033	-0.267803 0.3944	1.938170 0.0263*				
PP claire	-0.732927 0.2318	-0.471821 0.3185	-0.804787 0.2105	-0.317427 0.3755	-5.257765 0.0000*	-0.121198 0.4518	-1.960583 0.0250*			
PP infu.	1.265746 0.1028	1.301594 0.0965	0.879683 0.1895	0.573275 0.2832	-3.268499 0.0005*	1.636322 0.0509	-1.080515 0.1400	1.633485 0.0512		
Gobelets	1.347906 0.0888	1.367057 0.0858	0.922703 0.1781	0.583499 0.2798	-3.478927 0.0003*	1.714106 0.0433*	-1.087430 0.1384	1.700355 0.0445*	0.008228 0.4967	
Trou ter.	1.819151 0.0344*	1.841290 0.0328*	1.517348 0.0646	1.056788 0.1453	-1.235380 0.1083	2.091547 0.0182*	-0.452909 0.3253	2.091704 0.0182*	0.838500 0.2009	0.850477 0.1975

Tableau S4 : Résultats du test de Dunn sur le RAD des gîtes. Une case présente le résultat de la comparaison via le test Z de Dunn d'un type (colonne) avec un autre (ligne) ainsi que la p-valeur. \* indique une p-valeur significative à  $\alpha = 0,1$ .

Moyennes colonnes- Moyennes lignes	Bac pier.	Bac plas.	Bache	Bromélia.	Egout	Etang	Flaque	PP claire	PP infu.	Gobelets
Bac plas.	-3.323302 0.0004*									
Bache	-5.488733 0.0000*	-2.102096 0.0178*								
Bromélia.	-2.588516 0.0048*	-1.163479 0.1223	-0.115461 0.4540							
Egout	-2.286482 0.0111*	1.936057 0.0264*	4.385016 0.0000*	1.962593 0.0248*						
Etang	-5.970727 0.0000*	-2.356399 0.0092*	-0.163549 0.4350	0.034173 0.4864	-4.875904 0.0000*					
Flaque	-2.793247 0.0026*	-1.362265 0.0866	-0.311746 0.3776	-0.149089 0.4407	-2.170644 0.0150*	-0.232227 0.4082				
PP claire	-1.429709 0.0764	1.313938 0.0944	3.172154 0.0008*	1.804650 0.0356*	-0.059246 0.4764	3.429885 0.0003*	1.998598 0.0228*			
PP infu.	-2.331179 0.0099*	0.593265 0.2765	2.526644 0.0058*	1.439147 0.0751	-0.987218 0.1618	2.771614 0.0028*	1.634350 0.0511	-0.690137 0.2451		
Gobelets	0.498557 0.3090	3.200913 0.0007*	5.079193 0.0000*	2.703989 0.0034*	2.187807 0.0143*	5.431204 0.0000*	2.901215 0.0019*	1.630079 0.0515	2.401785 0.0082*	
Trou ter.	-1.095366 0.1367	0.950003 0.1711	2.416492 0.0078*	1.624724 0.0521	-0.101822 0.4594	2.582537 0.0049*	1.802919 0.0357*	-0.051736 0.4794	0.488783 0.3125	-1.314199 0.0944

Annexe S7 : consensus des séquences *forward* et *reverse* du gène de la protéine *wsp* de *Wolbachia* des onze individus testés.

AvC1 :

catgatcctttaaagcatcttttatggctggtggtgctgcatttgggtataaaatggacgatatCAGGGTTGATGTTGAGG  
GACTTTACTCACAACCTAAACAAAAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTCCAAC  
AACTGTTGCAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACGAT  
ATAGCGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGTGCAG  
CATATATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTTGG  
TTTTGCTTATCAAGCAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCAA  
CTCTTTGCTGGTGTCTCGTTATTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAAGC  
AGTATCAGCTACTAAAGAGatcaatgtcctttacagcgctgttggtgc

AvI1 :

tcctttaaagcatcttttatggctggtggtgctgcatttgggtataaaatggacgatatcaGGGTTGATGTTGAGGGACT  
TTACTCACAACCTAAACAAAAACGACGTTMGTGGTGCAACATTTACTCCAACAAC  
GTTGCAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACGATATAG  
CGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCATAT  
ATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTTGGTTTTG  
CTTATCAAGCAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCAAACCTCTT  
TGCTGGTGTCTCGTTATTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAAGCAGTAT  
CAGCTACTAAAGAGatcaatgtcctttacagcgctgttggt

AvI2 :

ggtgggtgctgcatttggGTTATAAAATGGACGATATCAGGGTTGATGTTGAGGGACTTTAC  
TCACAACCTAAACAAAAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTCCAACAACCTGTTG  
CAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACGATATAGCGAT  
TGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCATATATCA  
GCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTTGGTTTTGCTTA  
TCAAGCAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCAAACCTCTTTGCT  
GGTGTCTCGTTATTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAAGCAGTATCAGC  
TACTAAAGAGatcaatgtcctttacagcgctgttggtgcagaagctgg

BC1 :

atgatcctttaaagcatcttttatggctggtggtgctgcatttgggtataaaatggACGATATCAGGGTTGATGTTGA  
GGGACTTTACTCACAACCTAAACAAAAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTCCA  
ACAACKGTTGCAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACG  
ATATAGCGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGTGC  
AGCATATATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTT  
GGTTTTGCTTATCAAGCAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCA  
AACTCTTTGCTGGTGTCTCGTTATTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAA  
GCAGTATCAGCTACTAAAGAGatcaatgtcctttacagcgctgttggtgcagaagctgg

BC3 :

catcttttatggctggtggtgctgcatttgggtataaaatggACGATATCAGGGTTGATGTTGAGGGACTTTA  
CTCACAACCTAAACAAAAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTCCAACAACCTGTT  
GCAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACGATATAGCGA  
TTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCATATATC  
AGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTTGGTTTTGCTT

ATCAAGCAAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCAAACCTTTGC  
TGGTGCTCGTTATTTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAAGCAGTATCAG  
CTACTAaagagatcaatgtcctttacagcgctgttggtgcagaagctggagta

BC4 :

tggtggtgctgcatttggtataaaatggACGATATCAGGGTTGATGTTGAGGGACTTTACTCACAA  
CTAAACAAAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTCCAACAACKGTTGCAAACA  
GTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACGATATAGCGATTGAAGA  
TATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCATATATCAGCAATC  
CTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTTGGTTTTGCTTATCAAGC  
AAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCAAACCTTTGCTGGTGTCT  
CGTTATTTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAAGCAGTATCAGCTACTaaag  
agatcaatgtcctttacagcgctgttggtgcagaagctgg

BI2 :

tcatgatcctttaaagcatctttatggctggtggtgctgcatttggtataaaaTGGACGATATCAGGGTTGATGTT  
GAGGGACTTTACTCACAATAAACAAAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTC  
CAACAACKGTTGCAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTA  
CGATATAGCGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGT  
GCAGCATATATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGA  
TTTGGTTTTGCTTATCAAGCAAAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAACCCAGAAAT  
CAAACCTTTGCTGGTGTCTCGTTATTTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAG  
AAGCAGtatcagctactaaagagatcaatgtcctttacagcgctgttggtgcagaagctgg

DC1 :

tcatgatcctttaaagcatctttatggctggtggtgctgcatttggtataaaatggacgaTATCAGGGTTGATGTTGA  
GGGACTTTACTCACAATAAACAAAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTCCA  
AAACTGTTGCAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACG  
ATATAGCGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGTGC  
AGCATATATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTT  
GGTTTTGCTTATCAAGCAAAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCA  
AACTCTTTGCTGGTGTCTCGTTATTTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAA  
GCAGTATCAGCTACTaaagagatcaatgtcctttacagcgctgttggtgcagaagctggagtag

DC2 :

tgatcctttaaagcatctttatggctggtggtgctgcatttggtataaaatggACGATATCAGGGTTGATGTTGAG  
GGACTTTACTCACAATAAACAAAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTCCA  
CAACKGTTGCAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACGA  
TATAGCGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGTGC  
GCATATATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTTG  
GTTTTGCTTATCAAGCAAAAAGCTGGTGTAGTTATGATGTAACCCAGAAATCAA  
ACTCTTTGCTGGTGTCTCGTTATTTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAAG  
CAGTATCAGCTACTAAAGAGatcaatgtcctttacagcgctgttggtgcagaagctgg

JaC1 :

atcctttaaagcatctttatggctggtggtgctgcatttggtataaaatggacgaTATCAGGGTTGATGTTGAGGG  
ACTTTACTCACAATAAACAAAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTCCAACA  
ACTGTTGCAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACGATAT  
AGCGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTGGTGTGGTGCAGCA

TATATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTTGGTT  
TTGCTTATCAAGCAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCCAGAAATCAAAC  
CTTTGCTGGTGCTCGTTATTTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAAGCAG  
TATCAGCTACTAAAGAGatcaatgtcctttacagcgctgttggtgcagaagct

Ja11 :

gatcctttaaagcatctttatggctggtggtgctgcatttggtataaaatggacgataTCAGGGTTGATGTTGAGGG  
ACTTTACTCACAATAAACAACGACGTTAGTGGTGCAACATTTACTCCAACA  
ACKGTTGCAAACAGTGTGGCAGCATTTCAGGATTGGTTAACGTTTATTACGATA  
TAGCGATTGAAGATATGCCTATCACTCCATACGTTGGTGTTGGTGTTGGTGTCAGC  
ATATATCAGCAATCCTTCAGAAGCTAGTGCAGTTAAAGATCAAAAAGGATTTGGT  
TTTGCTTATCAAGCAAAAGCTGGTGTTAGTTATGATGTAACCCCAGAAATCAAAC  
TCTTTGCTGGTGCTCGTTATTTTGGTTCTTATGGTGCTAGTTTTAATAAAGAAGCA  
GTATCAGCTActaaagatcaatgtcctttacagcgctgttggtgcagaagctgg