



**HAL**  
open science

# Le virus Kemerovo, un orbivirus encéphalitique transmis par les tiques : études in vivo et in vitro

Camille Migné

## ► To cite this version:

Camille Migné. Le virus Kemerovo, un orbivirus encéphalitique transmis par les tiques : études in vivo et in vitro. Microbiologie et Parasitologie. AgroParisTech, 2022. Français. NNT : 2022AGPT0002 . tel-03762291

**HAL Id: tel-03762291**

**<https://pastel.hal.science/tel-03762291>**

Submitted on 27 Aug 2022

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

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

# THESE DE DOCTORAT

pour obtenir le grade de

**Docteur d'AgroParisTech**

**Spécialité : Microbiologie**

École doctorale n° 581

Agriculture, alimentation, biologie, environnement et santé (ABIES)

*par*

**Camille MIGNÉ**

**Le virus Kemerovo, un orbivirus encéphalitique  
transmis par les tiques : études *in vivo* et *in vitro***

Directrice de thèse : Sara MOUTAILLER<sup>1</sup>  
Co-Directeur de thèse : Houssam ATTOUI<sup>2</sup>

Thèse présentée et soutenue à Maisons-Alfort, le 25 février 2022

**Composition du jury :**

Pierre-Yves LOZACH, Directeur de recherche, INRAE Lyon  
Rémi CHARREL, Professeur (PU-PH), IHU Méditerranée infection  
Alessandra FALCHI, Maître de conférences (HDR), Université de Corse  
Laurence VIAL, Chercheure, CIRAD  
Sara MOUTAILLER, Cheffe de projet recherche, ANSES  
Houssam ATTOUI, Directeur de recherche, INRAE

Président  
Rapporteur & Examineur  
Rapporteur & Examinatrice  
Examinatrice  
Directrice de thèse  
Co-Directeur de thèse

<sup>1</sup>ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale,  
Équipe Mitick  
14 rue Pierre et Marie Curie, 94700 Maisons-Alfort

<sup>2</sup>ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR Virologie, Laboratoire de Santé Animale,  
Équipe ARMOR  
7 Avenue du général de Gaulle, 94700 Maisons-Alfort



*Je dédie ce manuscrit à toutes les personnes qui  
ont participé de près ou de loin à ce projet.*



# Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres de mon jury de thèse qui ont accepté de prendre le temps d'évaluer mes travaux : Dr Alessandra Falchi, Pr Rémi Charrel, Dr Laurence Vial et Dr Pierre-Yves Lozach.

Mes plus chaleureux remerciements vont vers mes deux directeurs de thèse, Sara Moutailler et Houssam Attoui. Merci à vous deux de m'avoir donné l'opportunité de travailler à vos côtés. Je souhaite à tout doctorant d'avoir des encadrants de thèse comme vous. Que ce soit d'un point de vue professionnel ou humain, vous êtes extraordinaires. Merci d'avoir été aussi généreux avec moi et d'avoir partagé toutes vos connaissances. Vous avez toujours été présents dans les bons et les mauvais moments. Au cours de cette thèse, vous avez été mes mentors, mes piliers et grâce à vous je sors de cette thèse grandie. Pour tout cela, je ne peux, que, vous remercier chaleureusement et je ne vous serai jamais assez reconnaissante pour tout ce que vous avez fait pour moi. Je ne peux, que, vous souhaiter le meilleur pour la suite.

- Sara, merci pour tout ce que tu as fait pour moi. Ta bienveillance et ton écoute font de toi une personne extraordinaire. Tu as su me rassurer et m'apaiser à plusieurs reprises pendant ces 3 ans de thèse. J'ai découvert, grâce à toi, le monde (merveilleux) des tiques au labo mais aussi sur le terrain où on a bien rigolé pendant certaines collectes (notamment sous un chêne, hein ? 😊). Merci de ta bonne humeur et ton enthousiasme au quotidien. Je suis très admirative de toutes tes qualités (professionnelles mais également humaines). BIPAR ne peut qu'avoir un très bel avenir grâce à toi.
- Houssam, merci infiniment. Tu es un puits de savoir, tu as une pédagogie hors pair et une envie de transmettre ton savoir sans limite. Toutes ces qualités font de toi une personne extrêmement généreuse, bienveillante et magnifique. Kemerovo nous aura donné du fil à retordre (c'était parfois les montagnes russes, hein ? (private joke 😊)) mais grâce à ton expertise de grand virologue, on a pu s'en sortir.

Je remercie M. Boireau, directeur du laboratoire de santé animal de l'ANSES, pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et me permettre de réaliser cette thèse dans les UMR BIPAR et Virologie. Je remercie Stephan Zientara (DU de l'UMR de virologie) et Nadia Haddad (DU de l'UMR BIPAR en 2018) de m'avoir accueillie dans leur unité. Je remercie également les financeurs de ma thèse, l'ANSES et la DGER.

Merci aux membres de mon comité de thèse, Dr Olivier Plantard et Pr Peter Mertens, de leurs conseils avisés, de leur soutien et de leur bienveillance tout au long de cette thèse.

Merci infiniment aux membres de mes deux équipes. Merci à Fao et Baptiste de l'équipe ARMOR en viro, de leur soutien, bienveillance et bonne humeur. Merci à Clémence, Aurélie, Élodie, Hélène et Denis du groupe Ticks & Co. Et à plus large échelle, je remercie tous mes collègues de l'équipe Mitick qui participent activement à cette bonne humeur qui caractérise si bien notre cher bâtiment Carré : Clotilde, Lourdes, Angélique, Sabine, Anne Claire, Benjamin, Ladislav et Alejandro. Carré, un bâtiment où j'ai pu rencontrer des personnes magnifiques comme Sarah, Thomas, Matthieu, Martine, Marie Pierre, Léna et Lisa F.

- Fao (ma petite Fao), merci pour ta bienveillance, ta pédagogie, ta patience et ta gentillesse. Travailler à tes côtés a été pour moi un vrai honneur et bonheur.

- Baptiste, merci pour tout ! Je ne compte même plus le nombre de fois où j'aurais pu faire un arrêt cardiaque avec tes blagues.
- Clémence (ma petite Clémence), merci pour tout. Tu es pour moi la référence en termes d'efficacité et d'organisation. Je t'admire et tu m'impressionnes, tu es la Lucky Luke de la PCR haut débit et également une très bonne amie.
- Aurélie (ma pépette), quel bonheur que tu sois parmi nous, on forme un binôme de choc ! Merci pour tout ! Ta bonne humeur et ton enthousiasme au quotidien vont énormément me manquer.
- Élodie (ma petite Élodie), c'est bien toi qui m'as mis le pied à l'étrier pour l'élevage de tiques et la BM à BIPAR. Ta personnalité débordante, ta joie de vivre et ta bonne humeur font de toi une personne qu'on ne peut qu'adorer !
- Sabine (ma Sabychou), merci ma Sabychou d'être au petit soin avec nous tous. Mon rayon de soleil pendant ces 3 ans de thèse. Merci de ton soutien, ta bienveillance et de ton aide.
- Angélique (Ange ou mon petit Jacky), un vrai bonheur que tu sois arrivée chez nous. Merci pour tous ces moments passés avec toi et tous ses fous rires !
- Lourdes, merci d'être toi, de ton soutien immesurable, de ta joie de vivre et de ta bonne humeur au quotidien. Mon rayon de soleil espagnol !
- Clotilde (Clo ou ma petite Clotilde), merci de ta bienveillance et de ton soutien ! De très bons moments passés avec toi que je garde comme de très bons souvenirs.
- Sarah (Sarinette ou Star Tick), merci pour tout ! Quel honneur de te connaître, d'avoir travaillé avec toi. Une femme exceptionnelle tant sur le plan professionnel qu'humainement. Merci pour tous ces très bons moments passés avec toi. Plein de bonheur dans ta nouvelle vie.
- Léna (ma petite Lena), ma douce Léna, la douceur et la gentillesse incarnées. Merci pour ton soutien immense, quel bonheur de t'avoir rencontrée et de te compter maintenant parmi mes amis. Ton cheesecake, c'est de la bombe !!
- Lisa (ma Lisa), merci pour tout ! Ton sourire, ta bonne humeur, ton soutien, tes rêves déjantés, toutes nos discussions, nos « pouet pouet », merci pour tout ça !
- Ladislav et Alejandro (Ladi & Ale), les grands frères de Carré ! Merci de votre soutien et bienveillance.
- Thomas (Toto), merci pour tous ces fous rires, que ce soit à Carré ou en collecte de tiques !
- Matthieu, ah la la Matthieu ! Merci d'être toi, merci pour ta bonne humeur (oui oui j'adore tes blagues !!). Le soleil et le sourire de Carré par définition.
- Martine, on s'est côtoyées pendant seulement quelques mois au début de ma thèse, mais je garde le souvenir d'une grande dame (très classe) avec énormément d'humour qui nous a, plusieurs fois, réchauffé le cœur. Profite bien de ta retraite bien méritée !

Qui dit appartenir à deux unités de recherche, dit beaucoup de co-doctorants et amis !  
 Commençons d'abord par ma famille de co-doc en viro ; merci au trio de Manon (L, D et B ☺), Juliette, Lise, Adèle et Morgan. Merci à mes co-doctorants de BIPAR également : Adrien, Émilie, Mohammed, Lisa, Filip, Noah, Alejandra, Caïna, Apolline, Baptiste et Célia.

- Adrien (ch'ti pépère) et Émilie (ma Mimi), merci à tous les deux de votre accueil plus que chaleureux dans le cercle des doctorants de Carré. Vous avez été comme un grand frère/une grande sœur lors de ma première année et de vrais modèles pour moi.
- Mohammed (Momo), merci pour toutes ces déconnades et ces sorties au Grizby !
- Baptiste (Baptychou ou plein d'autres surnoms ^^), merci pour ton soutien hors norme, de m'avoir rassurée plusieurs fois. Merci pour tous ses bons moments et bon courage pour la fin de ta thèse, easy fingers in the nose hein !

- Célia, ou notre rayon de soleil de Montpellier ! Mais quelle bonne idée de venir en mission chez nous ! Plein de courage pour ta thèse que tu mènes telle une guerrière.

Merci au Ginger Gang (Lisa, Filip et Noah) pour tous ces moments passés ensemble (en Normandie, aux Pays-Bas et le nombre incalculable d'après'euh réunions scientifiques 😊).

- Lisa (ma Lisouille d'amour, GG), je n'ai pas assez de mots pour décrire à quel point ton arrivée au labo a été pour moi merveilleuse. Tu es pour moi comme ma petite sœur au labo mais également une très très bonne amie en dehors. Merci d'être là et d'être toi. Merci pour ton soutien et ton aide. Quitter notre bureau, le QG du Ginger Gang est un vrai déchirement pour moi, mais heureusement, je ne vais pas très loin 😊. Et meuf, on a couru le Semi-Marathon de Paris !!! Je te souhaite que du bonheur et beaucoup de réussites pour la suite. Tu peux déjà être très fière de toi, je le suis. Je ne me fais absolument aucun souci pour la suite, tu vas briller comme tu brilles déjà ♥.
- Filip (Fifi, GG), merci ou devrais-je dire dėkuji ! Merci Fifi pour tout, de ton soutien, de ton aide (oui oui notamment les week-ends d'astreinte pour les gorgements de tiques) et bien sûr de tous tes merveilleux gâteaux ! Un vrai pâtissier et un super coach sportif, grâce à toi j'ai pu dépasser mes limites et courir un semi-marathon ! Très contente d'avoir fait ta connaissance et de te compter parmi mes amis. A charge de revanche pour les auto-tamponneuses !
- Noah (mon Caliss, GG), merci mon Caliss. Ta personnalité unique fait de toi quelqu'un qu'on ne peut qu'adorer ! Merci aussi de ton aide lors des astreintes de week-end. Je te dois bien plus qu'une bière !!

Je continuerai mes remerciements avec tous les membres des unités de Virologie et de BIPAR. Je remercie plus particulièrement l'équipe ZEN qui a joué un grand rôle dans ma vie. J'ai eu l'opportunité de faire mes 2 stages de Master aux côtés de personnes incroyables et passionnées : Cécile et Sylvie. Travailler avec vous a été pour moi une chance inestimable. Vous m'avez fait découvrir et aimer le monde de la recherche. Sans vous deux, je ne serais pas là aujourd'hui. Je ne peux, que, vous remercier chaleureusement pour tout ce que vous avez fait pour moi et vous souhaiter que du bonheur dans vos nouvelles vies respectives, dans le Var et en Guadeloupe ! Je remercie bien évidemment tous les membres de l'équipe pour leur soutien immesurable : Marine, Steeve, Gaëlle, Rayane et Nolwenn. Merci Nolwenn de ton soutien et de me donner la chance d'intégrer à nouveau cette équipe. Hâte d'accomplir de belles choses à vos côtés. Merci ma petite Gaëlle pour ton soutien et ta bonne humeur au quotidien !

Merci à Sandrine, Marion, Fleur, Muriel, Noémie, Sandra BB, Bahia, Françoise, Sophie, Lauren, Kamila, Manu, Corinne, Mathilde, Damien, Dominique, Aurélia, Souheyla, Cindy, Marie, Sandra T, Laura Lucia, Jennifer (Spéciale dédicace à l'équipe Run Run Run 😊), Aurélie, Myriam, Dany, Grégory, Radu, Delphine, Marie, Amandine,... pour votre bonne humeur et les rigolades !

- Sandrine, ma tourangelle préférée ! Merci pour tout, de ta bienveillance, de ton écoute, de m'avoir rassurée. Merci pour tous ces moments passés ensemble.
- Marion, merci pour ta joie de vivre ! Je compte sur toi pour me remettre à jour sur Top Chef et Meilleur Pâtissier !
- Sandra T (ma petite Sandra), merci pour tout ! Une énergie et une gentillesse débordantes, deux qualités que j'apprécie énormément chez toi. Ce petit rituel où tu toques à notre fenêtre tous les soirs va me manquer.

Un million de mercis à mes petits choux, Océane et Alain, mes deux animaliers préférés ! Merci pour tout, de votre aide, patience, soutien et de votre joie de vivre. Travailler avec vous était un vrai bonheur.

Merci à Sabine et Mai Lan de la plateforme Identypath de votre soutien !

Je remercie bien évidemment tous mes amis et particulièrement mes copines de toujours du PALM B. pour leur soutien sans limite : Julie (Ju), Noémie (No), Stacy (Stace) et Lorène (Petit bouchon). Merci les filles pour tout, d'être vous ! Mes quatre piliers depuis maintenant quelques années !

- Ju, merci pour ton écoute, ton soutien immense et le nombre incalculable cafés et bières chez toi après une journée de labo ! Merci au petit Roux, Pascal, qui a supporté toutes ces discussions labos. Courage pour la fin de ta super thèse, j'ai toujours été impressionnée par tout ce que tu faisais, je t'admire !
- No, ma chère Noémie, merci d'être toi. Merci infiniment pour ton soutien immesurable, ton écoute et ta bienveillance. Tu as su me rassurer à de nombreuses reprises. Chaque moment passé à tes côtés était pour moi une source de sérénité, mon échappatoire. Merci pour tous ces très bons moments passés avec toi qui me ramenaient à la vie pendant cette thèse. Plein de bonheur pour la suite.
- Stace, merci d'être tout simplement toi. Merci de ton soutien et de tous les fous rires qu'on a pu avoir ensemble. Merci à Meredith qui nous supporte. Courage courage pour la dernière ligne droite de ta thèse que tu mènes comme une battante !
- Petit bouchon, merci Lorène de ton écoute. Merci pour tous ces moments passés ensemble, toutes ces rigolades ! Je te souhaite plein de bonheur dans ta vie de maman, embrasse fort ta petite Ailin de ma part. Prépare-toi à nous voir débarquer en Suisse !!

Merci infiniment les filles, je vous aime fort ♥

Je remercie également Ambre, François et Richard pour leur soutien infini ! Vivement nos prochaines soirées endiablées !

Merci à ma famille, mes parents, mes grands-parents, mes oncles et tantes. Merci à Tiffany (Titi) et Gabin (Gabouche) ! Merci à Tristan (Titan) et Isabelle (Isa), et plein de bonheur à toute la petite tribu qui s'est agrandie avec Juliette et Prune. Je remercie également ma belle-famille.

Enfin, Mathurin, avec qui je partage ma vie depuis quelques années maintenant, merci pour tout. Merci de ta patience, de ton soutien et de m'avoir supportée au quotidien. Merci d'être tout simplement toi. J'ai hâte de continuer ma vie à tes côtés et de voir ce que l'avenir nous réserve.

# Sommaire

|   |    |
|---|----|
| Liste des figures .....   | 11 |
| Liste des tableaux .....  | 14 |
| Liste des abréviations .....  | 15 |
| Introduction .....  | 16 |
| 1 Généralités sur les tiques .....  | 17 |
| 1.1 Taxonomie générale de tiques .....  | 17 |
| 1.2 Anatomie générale des tiques .....  | 18 |
| 1.2.1 Anatomie externe .....  | 18 |
| 1.2.1.1 Capitulum .....   | 19 |
| 1.2.1.2 Idiosome .....  | 20 |
| 1.2.2 Anatomie interne .....  | 21 |
| 1.2.2.1 Système digestif .....  | 21 |
| 1.2.2.2 Appareil reproducteur .....   | 22 |
| 1.2.2.3 Système nerveux .....   | 23 |
| 1.2.2.4 Système respiratoire .....  | 24 |
| 1.2.2.5 Système de circulation et d'excrétion .....   | 24 |
| 1.3 La tique dure : exemples d' <i>Ixodes ricinus</i> et <i>Ixodes persulcatus</i> .....  | 26 |
| 1.3.1 Distribution géographique et environnement .....  | 27 |
| 1.3.2 Un cycle de vie à trois stades et trois hôtes .....   | 27 |
| 1.4 Risques sanitaires majeurs pour la santé humaine et animale .....   | 29 |
| 1.4.1 Impacts directs sur la santé humaine et animale .....   | 29 |
| 1.4.2 Impacts indirects : un grand vecteur d'agents pathogènes .....  | 30 |
| 1.4.2.1 Capacité et compétence vectorielle .....  | 30 |
| 1.4.2.2 Exemple d'agents pathogènes transmis par la tique (bactéries, et parasites) .....   | 32 |
| 2 Les virus transmis par les tiques .....   | 34 |
| 3 Généralités sur les arbovirus et leurs vecteurs .....   | 39 |
| 3.1 Dix familles virales concernées par les arbovirus et plusieurs vecteurs arthropodes .....   | 39 |
| 3.2 Risques pour la santé humaine et animale – émergence d'arbovirus .....  | 41 |
| 3.2.1 La santé publique humaine et animale menacée .....  | 42 |
| 3.2.2 Des problèmes économiques engendrés .....   | 42 |
| 3.3 Variabilité génétique des virus transmis par les insectes .....   | 43 |
| 4 Le virus Kemerovo .....   | 63 |
| 4.1 La famille <i>Reoviridae</i> et les genres associés .....   | 63 |
| 4.1.1 La famille <i>Reoviridae</i> .....  | 63 |
| 4.1.2 La sous-famille <i>Sedoreovirinae</i> .....   | 65 |
| 4.1.3 La sous-famille <i>Spinareovirinae</i> .....  | 67 |
| 4.2 Great Island virus et le séro groupe Kemerovo .....   | 68 |
| 4.3 Structure virale et cycle de réplication .....  | 69 |
| 4.3.1 Le génome viral .....   | 70 |
| 4.3.2 Les protéines structurales .....  | 72 |
| 4.3.3 Les protéines non-structurales .....  | 76 |
| 4.3.4 Cycle de réplication .....  | 77 |
| 4.4 Epidémiologie et Vecteurs de KEMV .....   | 79 |
| 5 Objectifs de la thèse .....   | 81 |
| Chapitre 1 .....  | 83 |
| Compétence vectorielle .....  | 83 |
| Introduction du Chapitre 1 .....  | 84 |
| Chapitre 1a : Validation d'une technique d'infection des tiques et compétence vectorielle des tiques <i>Ixodes ricinus</i> de Slovaquie pour KEMV ..... |    |
| Introduction du chapitre 1a .....   | 86 |

|  |     |
|--|-----|
| <b>ARTICLE:</b> C. V. Migné <i>et al.</i> , “Evaluation of two artificial infection methods of live ticks as tools for studying interactions between tick-borne viruses and their tick vectors,” Scientific Report, 2021.<br>..... | 86  |
| Chapitre 1b : Compétence vectorielle des tiques du genre <i>Ixodes</i> pour KEMV   |     |
| Introduction du chapitre 1b .....  | 101 |
| <b>ARTICLE:</b> C.V. Migné <i>et al.</i> , “Evaluation of vector competence of <i>Ixodes</i> ticks for Kemerovo virus”, submitted Viruses, 2021. ....  | 101 |
| Discussion et perspectives du chapitre 1 .....   | 113 |
| Chapitre 2 : .....   | 116 |
| Études <i>in vitro</i> .....   | 116 |
| La biologie de KEMV et fitness/séquençage .....  | 116 |
| 1 Introduction .....   | 117 |
| 1.1 Les arbovirus, une grande flexibilité génétique et une plasticité phénotypique .....   | 117 |
| 1.2 Le rôle du vecteur arthropode et de l’hôte dans la « flexibilité » des arbovirus.....  | 118 |
| 1.3 Objectifs de chapitre 2.....   | 119 |
| 2 Matériels et méthodes .....  | 120 |
| 2.1 Etude <i>in vitro</i> du virus Kemerovo .....  | 120 |
| 2.1.1 Le virus Kemerovo .....  | 120 |
| 2.1.2 Les lignées cellulaires utilisées .....  | 120 |
| 2.1.2.1 Les cellules de mammifère : BSR .....  | 120 |
| 2.1.2.2 Trois lignées de cellules de tique <i>Ixodes ricinus</i> : IRE11, IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20.....  | 121 |
| 2.2 Infections <i>in vitro</i> .....   | 121 |
| 2.2.1 Titration du virus par la technique de plages de lyse .....  | 122 |
| 2.2.2 Infections des différentes lignées cellulaires .....   | 123 |
| 2.2.2.1 Choix de la lignée cellulaire de tique <i>Ixodes ricinus</i> .....   | 123 |
| 2.2.2.2 Biologie de KEMV dans les cellules de tique <i>Ixodes ricinus</i> .....  | 123 |
| 2.2.3 Mise au point des passages en série et en alternance .....   | 124 |
| 2.2.3.1 Purification du virus avec un solvant organique.....   | 124 |
| 2.2.3.2 Infection des cellules avec le KEMV issu de cellules de tique .....  | 125 |
| 2.2.3.2.1 Premier passage en alternance de KEMV à partir de cellules de tique .....  | 125 |
| 2.2.3.2.2 Purification de KEMV produit à partir de cellules de tique .....   | 125 |
| 2.2.4 Cinétiques dans les cellules de tique et mammifère après 30 passages.....  | 126 |
| 2.3 Infections <i>in vivo</i> .....  | 126 |
| 2.3.1 Les souris.....  | 126 |
| 2.3.2 Détermination de la dose minimale infectieuse en fonction de la voie d’injection .   | 127 |
| 2.3.3 Evaluation du phénotype des passages 30 en souris IFNAR <sup>-/-</sup> .....   | 127 |
| 2.4 Biologie moléculaire .....   | 128 |
| 2.4.1 Extraction et une première purification des ARNdb .....  | 128 |
| 2.4.1.1 Extraction des ARN à partir des cultures cellulaires .....   | 128 |
| 2.4.1.2 Précipitation des ARNs pour une première purification des ARNdb.....   | 128 |
| 2.4.2 Extraction des ARN viraux à partir du sang et d’organes de souris .....  | 129 |
| 2.4.3 RT-PCR en temps réel pour la détection de KEMV .....   | 129 |
| 2.4.4 Détermination de la séquence de base de KEMV et étude de la variabilité après un passage dans les cellules de tique par séquençage Sanger .....  | 129 |
| 2.4.5 Mise au point de la purification des ARNdb en vue d’un séquençage NGS.....   | 132 |
| 2.4.5.1 Purification des ARN db par méthode enzymatique .....  | 133 |
| 2.4.5.2 Purification des ARNdb par méthode physique .....  | 133 |
| 3 Résultats .....  | 134 |
| 3.1 Infections cellulaires.....  | 134 |
| 3.1.1 KEMV est associé aux cellules de mammifère et de tique.....  | 134 |
| 3.1.2 KEMV dans les cellules de tique.....   | 135 |
| 3.1.2.1 Choix de la lignée cellulaire de tique .....   | 135 |
| 3.1.2.2 Détermination du temps d’infection des cellules de tique et premier passage en série dans ces cellules .....   | 135 |

|         |   |     |
|---------|---|-----|
| 3.1.2.3 | Infection persistante dans les cellules de tique .....  | 136 |
| 3.1.3   | Optimisation des infections avec le KEMV issu des cellules de tiques .....  | 137 |
| 3.2     | Un orbivirus qui diffère des autres d'un point de vue physico-chimique.....   | 138 |
| 3.3     | Titration du KEMV.....  | 140 |
| 3.3.1   | Le traitement au Vertrel XF n'impacte pas le titre viral.....   | 140 |
| 3.3.2   | Validation du protocole de purification des particules virales produites en IRE/CTVM20.....   | 141 |
| 3.4     | Séquençage après un passage dans les cellules de tique.....   | 141 |
| 3.4.1   | Détermination des séquences .....   | 141 |
| 3.4.2   | Identification de substitutions synonymes et non synonymes dans le génome de KEMV après un passage unique dans les IRE/CTVM20.....  | 144 |
| 3.4.3   | D'un point de vue phylogénétique .....  | 145 |
| 3.5     | La production des 30 passages en série et en alternance .....   | 146 |
| 3.5.1   | Observations faites au cours des passages.....  | 146 |
| 3.5.2   | Profils électrophorétiques du KEMV adapté en culture cellulaire .....   | 147 |
| 3.5.2.1 | Passages en série dans les BSR .....  | 147 |
| 3.5.2.2 | Passages en série dans les IRE/CTVM20.....  | 149 |
| 3.5.2.3 | Passages en alternance dans les IRE/CTVM20 et BSR.....  | 149 |
| 3.5.3   | Titre viral des différents passages .....   | 150 |
| 3.6     | Phénotype en souris IFNAR <sup>-/-</sup> après injection par voie sous-cutanée des passages 30... 152   |     |
| 3.6.1   | Détermination de la dose minimale infectieuse de KEMV en souris IFNAR <sup>-/-</sup> selon la voie d'injection.....   | 152 |
| 3.6.2   | Suivi de mortalité .....  | 152 |
| 3.6.2.1 | Selon la souche virale injectée.....  | 152 |
| 3.6.2.2 | Selon l'âge et le sexe des souris IFNAR <sup>-/-</sup> .....  | 154 |
| 3.6.3   | Evaluation du tropisme des souches adaptées par inoculation dans des souris IFNAR <sup>-/-</sup> .....  | 156 |
| 3.6.3.1 | Observations macroscopiques des organes.....  | 156 |
| 3.6.3.2 | Tropisme du KEMV P3 et des souches adaptées en culture cellulaire au sein d'un modèle animal .....  | 158 |
| 3.7     | Méthodes de purification des ARNdb en vue d'un séquençage Illumina.....   | 161 |
| 3.7.1   | Par méthode enzymatique.....  | 161 |
| 3.7.2   | Par méthode physique.....   | 162 |
| 3.8     | Discussion des résultats.....   | 163 |
|         | Discussion générale et perspectives .....   | 170 |
|         | Références .....  | 178 |
|         | Annexes .....   | 191 |
|         | Annexe n°1.....   | 192 |
|         | Quantification des ARN viraux dans les organes de souris, sans distinction du sexe et de l'âge des souris, selon la souche inoculée KEMV P3, P.alt 30, Ps.BSR 30 et Ps.IRE 30 .....   | 192 |
|         | Annexe n°2.....   | 193 |
|         | Cinétique de répllication des 30 dans les cellules de mammifère BSR et de tique IRE/CTVM20 .....  | 193 |
|         | Annexe n°3.....   | 195 |
|         | Revue : Migné, Camille Victoire, Cécile Beck, Gaëlle Gonzalez, Sylvie Lecollinet, and Sara Moutailler. 2021. "Which Tools for Monitoring Emerging Arboviruses within Their Mammalian Hosts and Arthropod Vectors?" <i>Virologie</i> 25 (1):12–28. <a href="https://doi.org/10.1684/vir.2021.0880">https://doi.org/10.1684/vir.2021.0880</a> . ..... | 195 |

# Liste des figures

- Figure 1: Classification systématique des tiques au sein des arthropodes d'après (Boulanger and McCoy 2015)
- Figure 2: Différences principales entre les tiques molles et les tiques dures d'après (Pérez-Eid 2007) et adapté à partir de (Barker and Walker 2014)
- Figure 3: Un corps divisé en 2 parties
- Figure 4: Capitulum des tiques appartenant à la famille *Ixodidae* d'après (S. Bonnet et al. 2015)
- Figure 5: Les différents types de capitulum retrouvés chez les tiques dures d'après (Pérez-Eid 2007)
- Figure 6: Anatomie externe des tiques dures d'après (Pérez-Eid 2007)(S. Bonnet et al. 2015)
- Figure 7: Représentation schématique d'un gorgement d'une femelle ixodidé en présence d'un mâle d'après (S. Bonnet et al. 2015) (Sonenshine and Roe 2014)
- Figure 8: Appareils reproducteurs des tiques dures femelles (A) et mâles (B), étapes majeures de l'oviposition (C) adapté à partir de (Sonenshine and Roe 2014) et photo d'une femelle *Ixodes ricinus* en train de pondre (photo personnelle)
- Figure 9: Photographie du synganglion de la tique dure *Rhipicephalus appendiculatus* adaptée de (Šimo et al. 2009)
- Figure 10: Appareil respiratoire, exemple de la tique dure, adapté à partir de (Sonenshine and Roe 2014) (Barker and Walker 2014)
- Figure 11: Localisation des glandes salivaires des tiques avec une structure en grappe (A) et composée de différents types d'acini (B) à partir de (Šimo et al. 2017) et (Z. Li 2018)
- Figure 12: Photographies des tiques adultes *Ixodes ricinus* (A)(Springer et al. 2021) et *Ixodes persulcatus* (B) (Zykov 2021)
- Figure 13: Répartition géographique des tiques *Ixodes ricinus* (ECDC 2021b) et *Ixodes persulcatus* (ECDC 2021a)
- Figure 14: Trois stases de développement pour les tiques dures
- Figure 15: Exemple des cycles de vie des tiques de la famille *Ixodidae* à un hôte (A), deux hôtes (B) et trois hôtes (C) à partir de (Sonenshine and Roe 2014)
- Figure 16: Mécanisme général de l'acquisition et transmission des agents pathogènes par la tique, adaptée à partir de (S. Bonnet et al. 2015)
- Figure 17: Cas d'épidémies liées aux virus transmis par les tiques dans le monde selon (Mansfield et al. 2017) (CDC 2019)(Alzahrani et al. 2010)
- Figure 18: Représentation schématique d'une particule virale d'un flavivirus (A) et de son génome (B) à partir de (ViralZone 2016)
- Figure 19: Représentation schématique d'une particule virale d'un orthonairovirus (A) et de son génome (B) à partir de (ViralZone 2010)
- Figure 20: Comparaison morphologique des cores viraux au sein de la famille des *Reoviridae*, sous-famille des *Sedoreovirinae* (A) et sous-famille des *Spinareovirinae* (B), à partir de (H. Attoui et al. 2012)
- Figure 21: Electrophérotypes sur gel d'agarose à 1% de BAV, KVD et LNV (H. Attoui et al. 2012)
- Figure 22: Répartition phylogénétique des orbivirus au sein du genre (arbre phylogénétique construit à partir des séquences en acides aminés de la VP1 (polymérase) (A) et Comparaison des topologies de l'arbre VP1 des orbivirus à celui des vecteurs construit à partir de leur protéine COXI (B), à partir de (Mohd Jaafar, Belhouchet, Belaganahalli, et al. 2014)
- Figure 23: Electrophérotypes sur gel d'agarose de CTFV (Houssam Attoui, Mohd Jaafar, De Micco, et al. 2005)
- Figure 24: Comparaison phylogénétique des protéines T2 (couche interne du core) de GIV, KEMV, TRBV, LIPV et d'autres espèces d'orbivirus (Belhouchet et al. 2010)
- Figure 25: Sections coniques de la reconstruction BRDV centrées sur un axe de type 5 (A-F) et un axe type 3 (G-L) (Schoehn et al. 1997)
- Figure 26 : Electrophérotypes de différents virus à ARNdb (S. Maan et al. 2011) (EEV : equine encephalosis virus, AHSV : African horse sickness virus, PALV : Palyam virus, EHDV : epizootic hemorrhagic disease virus, BTV : bluetongue virus, TILV : Tilligerry virus, CGV : Chobar Gorge virus)
- Figure 27 : Représentation schématique de l'arrangement des protéines de la capsid externe, VP2 et VP5, et de la protéine de la couche externe du core, VP7, de BTV (Noad and Roy 2009)

Figure 28: Représentation de la surface des structures tridimensionnelles (3D) du core du BTV-10 obtenue par Cryo microscopie électronique (A), image du trimère de VP7 (B) et mécanisme d'assemblage des trimères de VP7 (Noad and Roy 2009)

Figure 29: Représentation schématique de la formation de dimères et décamères de VP3 du BTV (Noad and Roy 2009)

Figure 30: Structure de complexe réplicatif de BTV déterminée par cryo-EM (Roy 2016)

Figure 31: Représentation schématique de tubule de NS1 (Kerviel et al. 2019)

Figure 32: Cycle de réplication de KEMV fait à partir de (H. Attoui et al. 2012)

Figure 33: Synthèse des ARNm du BTV (Roy 2013a)

Figure 34: Distribution géographique de KEMV, TRBV et LIPV

Figure 35: Schéma expérimental de la partie *in vitro*

Figure 36: Procédure suivie pour le choix de la lignée cellulaire de tique *Ixodes ricinus* pour les infections à KEMV

Figure 37: Stratégie de clonage de l'ARN génomique du KEMV (Houssam Attoui et al. 2000) (S. Maan et al. 2007)

Figure 38: Electrophérotypes du génome de KEMV sur gel d'agarose à 1%. Les ARN viraux sont extraits de cellules BSR (A) et de cellules de tique (B)

Figure 39: Comparaison des quantités d'ARN génomique du KEMV sur gel d'agarose à 1% à J0 et J6 post-infection infection dans les trois lignées de cellules de tique

Figure 40: ARNdb extraits des cellules IRE/CTVM20 infectées avec du KEMV (P1) et comparaison avec un premier passage en série récolté à J6 (P2).

Figure 41: Persistance de KEMV dans les cellules IRE/CTVM20 infectées. L'image à J121 est contrastée davantage pour mieux voir les segments d'ARN génomiques.

Figure 42: Profils électrophorétiques du génome de KEMV extrait à partir des cellules BSR et analysés sur gel d'agarose à 1% avant (A) et après (B) purification de l'inoculum issu des cellules IRE/CTVM20

Figure 43: Évolution du titre viral en PFU/mL et par RT-PCR temps réel de KEMV au cours d'un stockage de 2 mois à +4°C

Figure 44: Titrage par plages de lyse dans les cellules BSR du KEMV P4 issu de BSR sans traitement (A), avec traitement au Vertrel XF (B)

Figure 45: Segment 5 déficient interférent de KEMV P3

Figure 46 : Groupements phylogénétiques des orbivirus en utilisant la méthode du 'Maximum Likelihood'. Les séquences d'orbivirus sont regroupées au sein de 3 groupes ou 'clusters' monophylétiques, en fonction de leurs vecteurs respectifs. La figure 46A montre un arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques de la polymérase virale ARN-dépendante (VP1). La figure 46B est basée sur la séquence des acides nucléiques du segment 7 (codant la VP7). Dans cet arbre, les ORFs des segments 7 ont été alignés (codon par codon) sur le profil d'alignement des séquences protéiques de la VP7. Le modèle Dayhoff a été utilisé dans l'arbre de la VP1 et le modèle Tamura-Nei pour l'arbre du segment 7.

Figure 47: Electrophérotypes de KEMV au cours des 30 passages en série en cellules de mammifère BSR (L : Ladder, marqueur de taille 2log)

Figure 48: Électrophérotypes du génome de KEMV adapté aux cellules BSR avec mise en évidence du segment déficient interférent (L : Ladder, marqueur de taille 2log)

Figure 49: Electrophérotypes de KEMV au cours des passages en série dans les cellules de tique IRE/CTVM20 (L : Ladder, marqueur de taille 2log)

Figure 50: Electrophérotypes de KEMV au cours des passages en alternance dans les cellules de tique IRE/CTVM20 et de mammifère BSR (L : Ladder, marqueur de taille 2log)

Figure 51: Suivi de mortalité en souris IFNAR<sup>-/-</sup> selon la souche inoculée par voie SC à une dose de 10<sup>3</sup> PFU, (A) souche initiale KEMV P3, (B) souche adaptée après 30 passages en alternance dans les BSR et IRE/CTVM20, (C) souche adaptée après 30 passages dans les BSR et (D) souche adaptée après 30 passages dans les IRE/CTVM20

Figure 52: Suivi de mortalité en souris IFNAR<sup>-/-</sup> selon l'âge et le sexe des souris, (A) jeunes mâles de moins d'1 an (B) mâles de plus d'1 an et (C) femelles de plus d'1 an

Figure 53: Néphromégalie du rein droit (A) et tuméfaction du foie (B)

Figure 54: Répartition de KEMV dans le modèle animal, IFNAR<sup>-/-</sup>, selon la souche inoculée ainsi que l'âge et le sexe des souris, KEMV P3 (A), P.alt 30 (B), Ps.BSR 30 (C) et Ps.IRE 30 (D)

Figure 55: Quantification des ARN viraux dans les différents tissus selon la souche inoculée, l'âge et le sexe des souris IFNAR<sup>-/-</sup>

Figure 56: Profil électrophorétique du KEMV avec différentes conditions de traitement à la RNase A

Figure 57: Quantification des ARN viraux des différentes souches du KEMV au sein des organes de souris IFNAR<sup>-/-</sup> inocuées en SC avec les différentes souches KEMV P3, P.alt 30, Ps.BSR 30 et Ps.IRE 30 (test statistique ANOVA à 1 facteur, '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05)

Figure 58: Cinétiques de réplication en cellules BSR (A) et dans le surnageant (B) des souches de KEMV adaptées en culture cellulaire

Figure 59: Cinétiques de réplication en cellules IRE/CTVM20 (A) et dans le surnageant (B) des souches de KEMV adaptées en culture cellulaire

# Liste des tableaux

Tableau 1: Familles et genres des arbovirus selon (ICTV 2020)

Tableau 2: Correspondance entre les segments et les protéines codées chez différents orbivirus (Mertens, Attoui, and Bamford 2009) (Belaganahalli et al. 2015)(Houssam Attoui, Mohd Jaafar, Belhouchet, et al. 2005)

Tableau 3: Caractéristiques des segments génomiques de YUOV (Houssam Attoui, Mohd Jaafar, Belhouchet, et al. 2005)

Tableau 4: Constitution des groupes de souris IFNAR<sup>-/-</sup> en fonction du sexe des souris et des doses KEMV en PFU injectées en IC pour déterminer la dose minimale infectieuse

Tableau 5: Constitution des groupes de souris en fonction de l'âge et le sexe des souris IFNAR<sup>-/-</sup> et de la souche virale pour l'évaluation du phénotype des passages 30

Tableau 6: Caractéristiques des segments génomiques du KEMV P3

Tableau 7: Caractéristiques des segments génomiques du KEMV après un passage en cellules de tique IRE/CTVM20

Tableau 8: Comparaison des séquences obtenues de KEMV issu des cellules IRE/CTVM20 avec la séquence du KEMV P3

Tableau 9 : Pourcentage d'identité dans les séquences nucléotidiques et protéiques de KEMV P3 et KEMV IRE20

Tableau 10: Titres infectieux en PFU/mL de différents passages en série et alternance

Tableau 11: Titres des passages intermédiaires de P.alt

Tableau 12: Détection de KEMV dans le sang des souris IFNAR<sup>-/-</sup> (- : non prélevé ou mort de l'animal avant, M : mort)

Tableau 13: Observations macroscopiques du foie et de la rate des souris IFNAR<sup>-/-</sup> inoculées avec des différentes souches virales

# Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique  
ALKV : virus Alkhurma  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNdb : ARN double brin  
ARNsb : ARN simple brin  
ASFV : African swine fever virus (PPA : virus de la peste porcine africaine)  
BAV : virus Banna  
BOUV : virus Bourbon  
BRDV : virus broadhaven  
BTV : bluetongue virus (FCO : virus de la fièvre catarrhale ovine)  
CGV : virus Chobar Gorge  
CCHFV : virus de la fièvre hémorragique de Crimée Congo  
CHIKV : virus Chikungunya  
CNUV : virus Chenuda  
CTFV : virus de la fièvre du Colorado (Colorado tick fever)  
DI : déficient interférant  
EYAV : virus Eyach  
GIV : virus Great Island  
HRTV : virus Heartland  
ICTV : International Committee on Taxonomy of Viruses  
IFNAR<sup>-/-</sup> : Interferon-alpha/beta receptor  
KEMV : virus Kemerovo  
LGTV : virus Langat  
LIPV : virus Lipovnik  
LIV : virus louping ill  
MOI : multiplicity of infection (multiplicité d'infection)  
NS : protéine non-structurale  
OC : outer capsid (protéine de la capsid externe)  
OHFV : virus Omsk  
OIE : Organisation Mondiale de la Santé Animale  
ORF : open reading frame (cadre de lecture ouvert)  
PEI : Période d'incubation extrinsèque  
PFU : particule formant unité  
POWV : virus Powassan  
RVFV : virus de la fièvre de la vallée du Rift  
SFTSV : virus de la fièvre sévère avec syndrome de thrombocytopénie  
TBEV : virus de l'encéphalite à tique (tick-borne encephalitis)  
TRBV : virus Tribeč  
VP : protéine viral structurale  
WMV : virus Wad Medani  
WNV : virus West Nile  
ZIKV : virus Zika

# Introduction

# 1 Généralités sur les tiques

## 1.1 Taxonomie générale de tiques

Les tiques appartiennent au règne animal. Elles disposent d'un exosquelette et des appendices articulées, permettant ainsi de les classer au sein de l'embranchement des arthropodes (*Arthropoda*). La présence de chélicères et l'absence d'antennes les classent dans le sous-embranchement *Chelicerata*. Les tiques appartiennent à la classe des *Arachnida* et à l'ordre *Ixodida*. Leur morphologie particulière les caractérise : corps aplati, 4 paires de pattes (excepté au stade larvaire où seulement 3 paires de pattes sont présentes) et des pièces buccales adaptées à leur régime alimentaire (repas sanguin) c'est-à-dire un rostre assimilable à un harpon. Trois familles monophylétiques se distinguent : *Argasidae* (tiques molles), *Nuttalliellidae*, *Ixodidae* (tiques dures) (figure 1) (Pérez-Eid 2007). Environ 900 espèces de tiques ont été décrites dans la littérature jusqu'à ce jour ; 186 appartiennent à la famille *Argasidae*, 692 à la famille *Ixodidae* (Sonenshine and Roe 2014). Une seule espèce compose la famille des *Nuttalliellidae*, *Nuttalliella namaqua* (Mans et al. 2011).

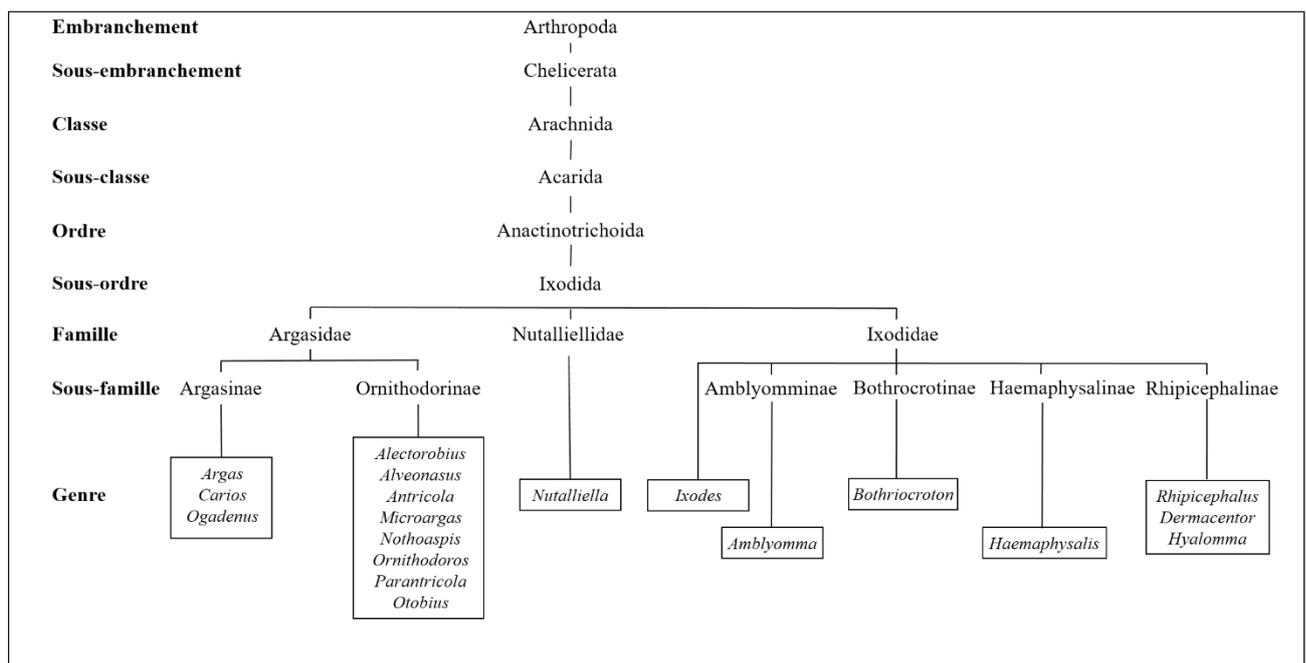


Figure 1: Classification systématique des tiques au sein des arthropodes d'après (Boulanger and McCoy 2015)

La différenciation des espèces au sein des différentes familles se fait par observations des traits morphologiques qui sont propres aux tiques molles et aux tiques dures (figure 2). La morphologie des tiques *Nuttalliella namaqua* semble être à l'intermédiaire des tiques dures et des tiques molles (Mans et al. 2011). Chez les *Ixodidae*, les tiques dures présentent en leur surface un plaque dorsale chitinisée sclérifiée, appelée scutum. Leurs pièces buccales, portées par le capitulum, se situent en position apicale et sont visibles quel que soit le point de vue (face dorsale vs face ventrale). Les tiques appartenant à la

famille *Argasidae*, ou tiques molles, se distinguent des tiques dures par l'absence de scutum. À leur surface, une cuticule souple est présente. Le capitulum se situe en face ventrale, logé dans une cavité nommée camérostome (Sonenshine and Roe 2014).

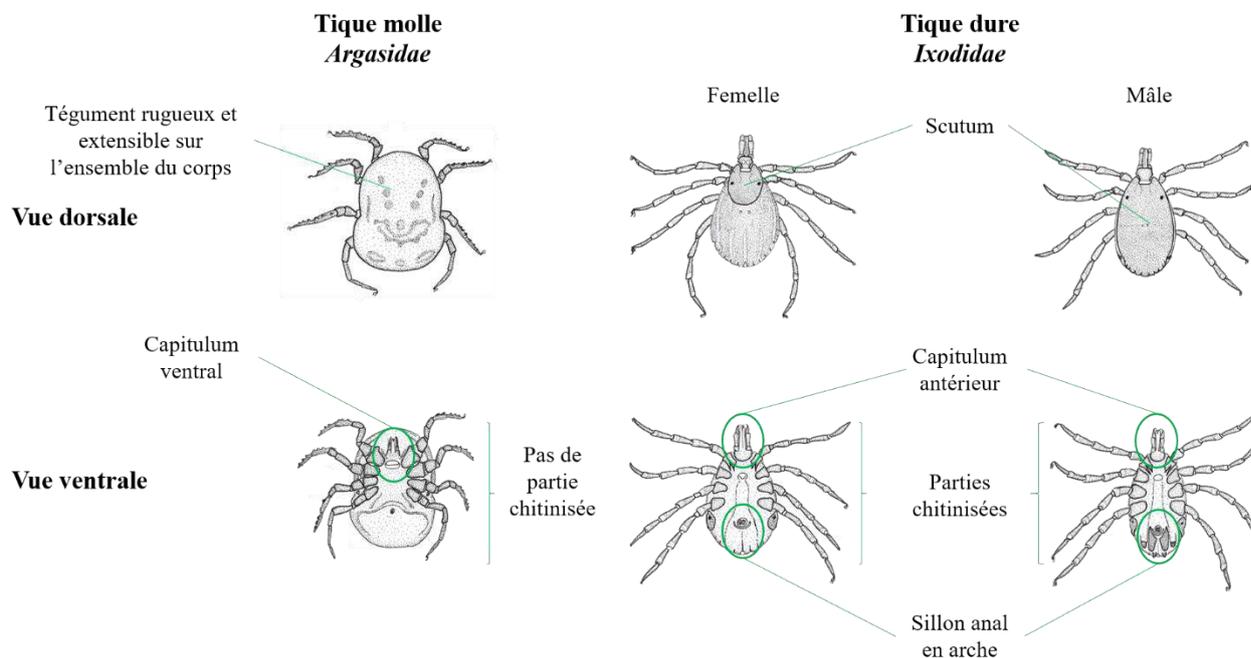


Figure 2: Différences principales entre les tiques molles et les tiques dures d'après (Pérez-Eid 2007) et adapté à partir de (Barker and Walker 2014)

## 1.2 Anatomie générale des tiques

### 1.2.1 Anatomie externe

Le corps des tiques est divisé en deux parties : le capitulum (ou gnathosome) et l'idiosome (figure 3).

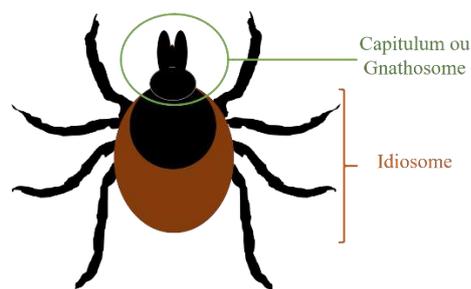


Figure 3: Un corps divisé en 2 parties

### 1.2.1.1 Capitulum

Comme évoqué précédemment, la position du capitulum diffère selon la famille. Il est constitué de deux palpes, des organes sensoriels nécessaires dans la détection d'hôtes et d'un rostre qui permet aux tiques de prendre un repas sanguin sur un hôte vertébré. Chez les tiques molles, les palpes sont extrêmement mobiles. Le rostre possède une paire de chélicères en position dorsale et un hypostome en position ventrale. Les chélicères permettent à la tique de couper la peau de l'hôte et l'hypostome à s'y ancrer (figure 4). Le capitulum est une partie clé pour l'identification du genre des tiques dures et est très utilisé en systématique (figure 5). De plus, en partie basale du capitulum chez la femelle des *Ixodidae*, des aires poreuses sont retrouvées et ont des fonctions physiologiques telle qu'une activité sécrétoire pendant la ponte des œufs (Pérez-Eid 2007).

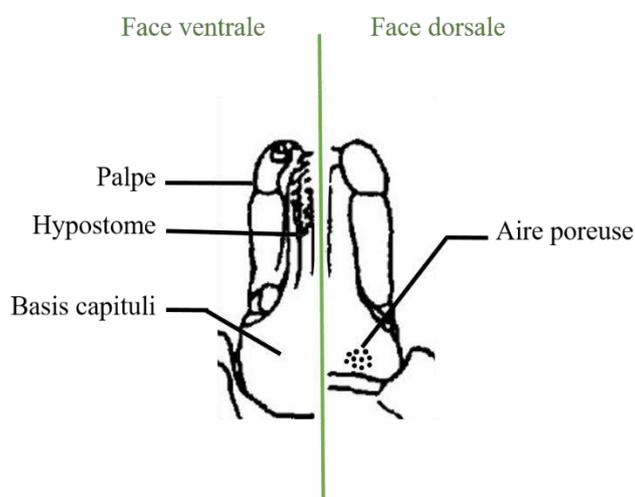


Figure 4: Capitulum des tiques appartenant à la famille *Ixodidae* d'après (S. Bonnet et al. 2015)

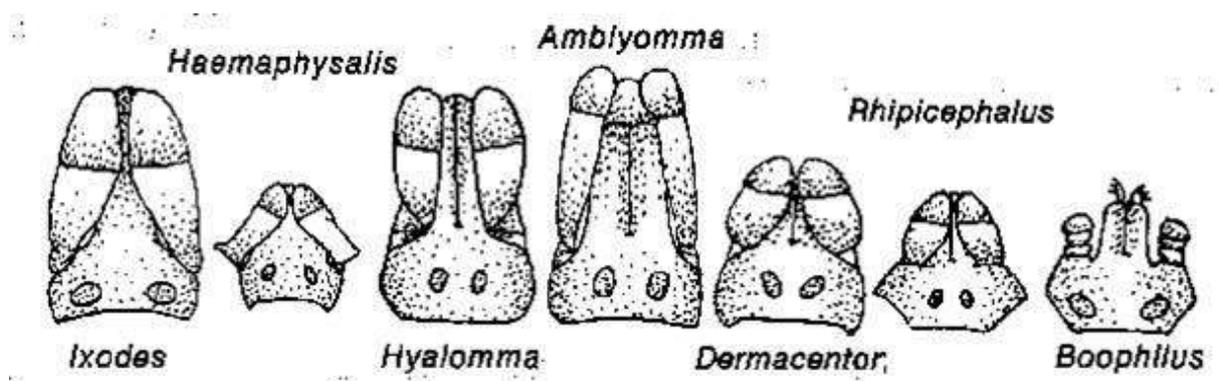


Figure 5: Les différents types de capitulum retrouvés chez les tiques dures d'après (Pérez-Eid 2007)

### 1.2.1.2 Idiosome

L'idiosome se compose de deux parties : le podosome en partie antérieure, et l'opisthosome en partie postérieure. Les paires de pattes et l'orifice génital se trouvent au niveau du podosome. Le nombre de paires de pattes varient selon le stade. Trois paires sont retrouvées chez les larves tandis que chez les nymphes et les adultes, elles sont au nombre de quatre. Chaque patte est composée de six segments et sont fixées au niveau du podosome par une coxa. A l'extrémité de leurs pattes, une paire de griffes ainsi qu'une pulville (ventouse) sont retrouvées et permettent à la tique de se fixer sur son hôte (S. Bonnet et al. 2015). Au niveau de la première paire de pattes se trouve l'organe de Haler qui présente de nombreuses fonctions sensorielles importantes pour la localisation des proies ou encore la reconnaissance de phéromones (Sonenshine and Roe 2014). L'opisthosome, quant à lui, présente de nombreuses striations, des pores, des organes sensoriels, l'orifice anal et des stigmates (orifices respiratoires) en position latéro-ventrale sous la quatrième paire de pattes (Sonenshine and Roe 2014). Ces dernières sont absentes chez les larves et la respiration se fait au travers de leur cuticule (figure 6) (S. Bonnet et al. 2015).

Selon la famille, *Ixodidae* ou *Argasidae*, la nature du tégument qui recouvre l'idiosome diffère. Chez les tiques dures, il est facile de distinguer les mâles des femelles puisque la couverture de l'idiosome est différente. Le tégument est composé de cuticule chitinisée et/ou sclérifiée mais également de parties souples. Les mâles présentent sur la totalité de leur surface un tégument sclérifié, appelé aussi conscutum, tandis que chez les femelles, nymphes et larves, seule la partie antérieure en est recouverte. Il s'agit alors du scutum et la partie postérieure, plus souple et élastique, se nomme alloscutum. Chez les femelles tiques dures, cette élasticité n'est pas suffisante pendant leur gorgement. Pour pallier à cela et afin de pouvoir contenir la totalité du repas sanguin, de la cuticule est synthétisée tout au long du repas sanguin. En face ventrale, les coxae et les plaques sont des parties sclérifiées, utilisées en classification. Le tégument retrouvé chez les tiques molles est seulement chitinisé, rugueux et souple et peut présenter, selon le genre, des variations d'aspect (Pérez-Eid 2007).

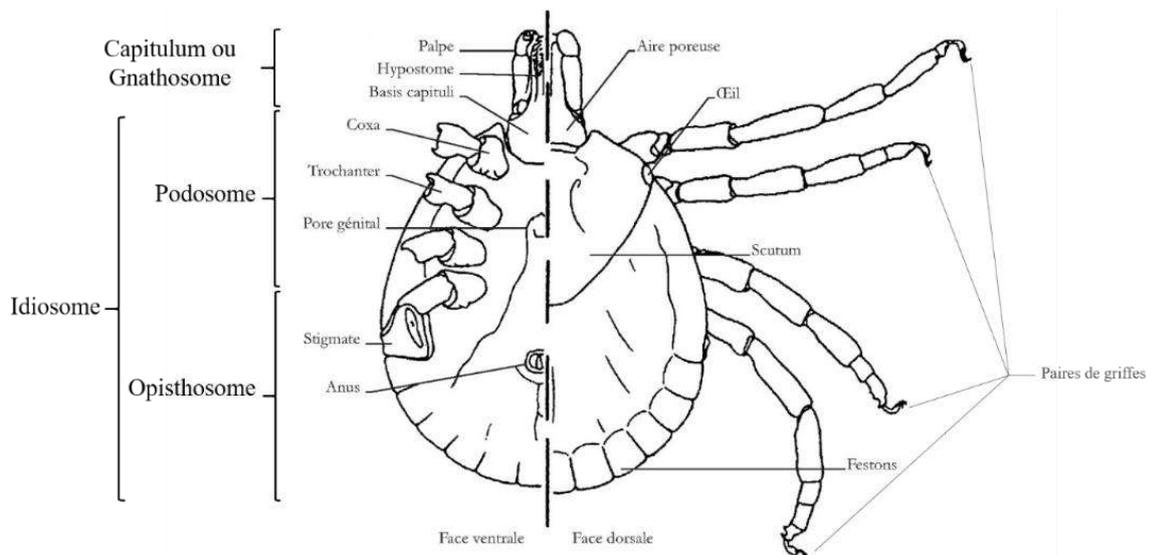


Figure 6: Anatomie externe des tiques dures d'après (Pérez-Eid 2007)(S. Bonnet et al. 2015)

### 1.2.2 Anatomie interne

Peu de différences sont répertoriées en termes d'anatomie interne entre les tiques molles et les tiques dures (S. Bonnet et al. 2015).

#### 1.2.2.1 Système digestif

Le régime alimentaire des tiques est constitué uniquement de sang pris sur un hôte vertébré, faisant d'elles des hématophages stricts. À l'exception de certaines tiques molles ou les mâles, toutes les stases de tiques prennent un repas sanguin (S. Bonnet et al. 2015). Le système digestif commence par un canal préoral situé dans le rostre et débouche sur le pharynx puis l'œsophage et se termine par l'intestin moyen (figure 7). Ce dernier organe est constitué de diverticules (ou cæcums) reliés à un estomac central, lui-même raccordé au sac rectal ou intestin postérieur. La tique présente un canal commun qui fonctionne en alternance pour l'excrétion de la salive et la prise du repas sanguin (Sonenshine and Roe 2014). L'appareil digestif est très développé, et plus particulièrement l'intestin moyen, et occupe quasiment la totalité du corps de la tique (cavité cœlomique). La digestion du sang se fait au niveau des cæcums ; l'hémoglobine et des protéines sont dégradées, les fragments cellulaires sont détruits et l'eau issue du sang est évacuée. Contrairement aux insectes, chez qui, la digestion se fait dans le lumen de l'intestin, les tiques sont des êtres hétérophages (Nuttall et al. 1994). La digestion se fait alors de manière intracellulaire dans les cellules épithéliales des diverticules de l'intestin moyen, expliquant ainsi la surface importante de cet organe. L'estomac central et l'intestin postérieur permettent, quant à eux, l'excrétion des déchets via l'anus. Chez la tique dure, l'évacuation de l'eau résultant de la digestion du sang se fait via les glandes salivaires tandis que chez les tiques molles, elle s'effectue via les glandes coxales qui débouchent sur les pores coxaux (S. Bonnet et al. 2015).

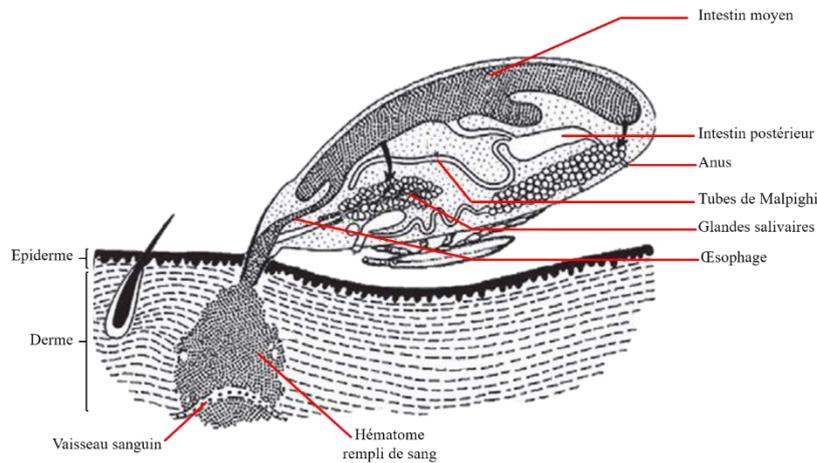


Figure 7: Représentation schématique d'un gorgement d'une femelle ixodidé en présence d'un mâle d'après (S. Bonnet et al. 2015) (Sonenshine and Roe 2014)

La quantité de sang prise au cours d'un repas sanguin est difficilement mesurable en raison de l'eau évacuée simultanément. La vitesse d'absorption du sang diffère selon s'il s'agit d'une tique molle ou dure. Chez les tiques molles, la vitesse est la même tout le long du repas qui dure pendant plusieurs minutes voire quelques heures. Chez les tiques dures, le repas dure plusieurs jours. Lors du gorgement d'une femelle, deux phases d'absorption sont observées. La première, la phase lente, dure plusieurs jours et la tique grossit peu. Lors de la seconde, la phase rapide, la tique peut multiplier son poids par 200. Pour les larves et nymphes, la vitesse d'absorption reste constante (Sonenshine and Roe 2014).

#### 1.2.2.2 Appareil reproducteur

À l'exception de quelques espèces de tiques, les tiques sont des animaux à reproduction sexuée obligatoire. Les figures 8A et 8B représentent l'appareil reproducteur des femelles et des mâles. Le système reproducteur du mâle est constitué d'une paire de testicules tubulaires reliée au canal déférent qui débouche sur le conduit éjaculatoire. Chez la femelle, l'appareil est composé d'un ovaire en forme de fer à cheval dont les extrémités sont prolongées par deux oviductes. Ces derniers rejoignent ensuite le vagin qui aboutit au pore génital situé en face ventrale (Sonenshine and Roe 2014).

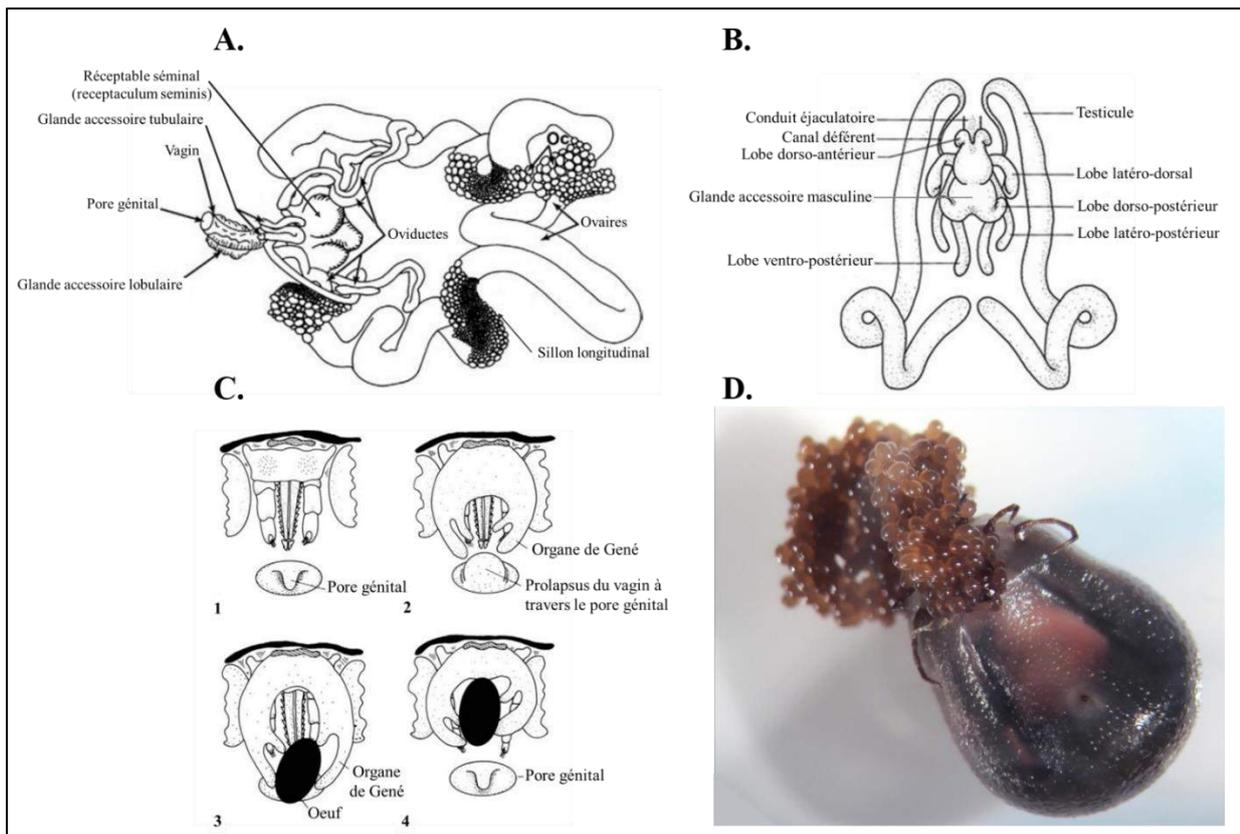


Figure 8: Appareils reproducteurs des tiques dures femelles (A) et mâles (B), étapes majeures de l'oviposition (C) adapté à partir de (Sonenshine and Roe 2014) et photo d'une femelle *Ixodes ricinus* en train de pondre (photo personnelle)

Selon l'espèce, l'accouplement s'effectue soit sur l'hôte pendant le repas sanguin de la femelle ou dans le milieu extérieur. Chez les tiques dures, l'accouplement débute par l'introduction du rostre du mâle dans le pore génital de la femelle pour y déposer un spermatophore. Les spermatozoïdes vont ensuite mûrir au travers des voies génitales de la femelle (S. Bonnet et al. 2015). Une fois le repas sanguin terminé, la femelle va ensuite pondre ses œufs dans l'environnement. La quantité d'œufs dépendra de l'espèce ainsi que de la quantité de sang absorbée. La ponte peut durer entre 5 et 20 jours (S. Bonnet et al. 2015). Au moment de l'émission des œufs, l'organe de Gené forme des « doigts » qui attrapent l'œuf situé au niveau du pore génital. Cet organe va également enrober chaque œuf d'une substance protectrice (figure 8C). Les œufs sont pondus en une masse unique (figure 8D) (Sonenshine and Roe 2014).

### 1.2.2.3 Système nerveux

Le système nerveux de la tique se compose d'une masse unique blanche située au niveau de la partie antérieure de l'idiosome en position péri-œsophagienne (figure 9) (Sonenshine and Roe 2014). Cette masse se nomme cérébroïde ou synganglion. À partir du synganglion, des nerfs périphériques sont déployés dans tout le corps de la tique. Il a été démontré que des neuropeptides sont synthétisés et

certains sont impliqués dans le contrôle de l'ensemble des fonctions vitales telles que l'innervation des glandes salivaires (Šimo et al. 2009) (Sonenshine and Roe 2014).

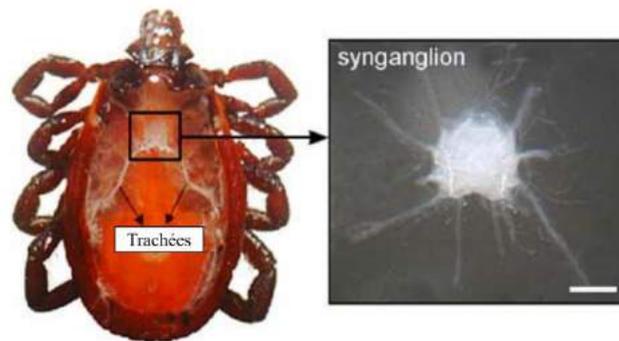


Figure 9: Photographie du synganglion de la tique dure *Rhipicephalus appendiculatus* adaptée de (Šimo et al. 2009)

#### 1.2.2.4 Système respiratoire

Seuls les nymphes et les adultes présentent un appareil respiratoire. Il est composé d'un réseau trachéolaire très ramifié et formant des arborescences au contact des organes. Ce réseau s'ouvre à l'extérieur par les stigmates situés sous la quatrième paire de pattes, permettant ainsi les échanges gazeux avec l'environnement (figure 10). Chez les larves, la respiration se fait à travers leur cuticule (S. Bonnet et al. 2015).

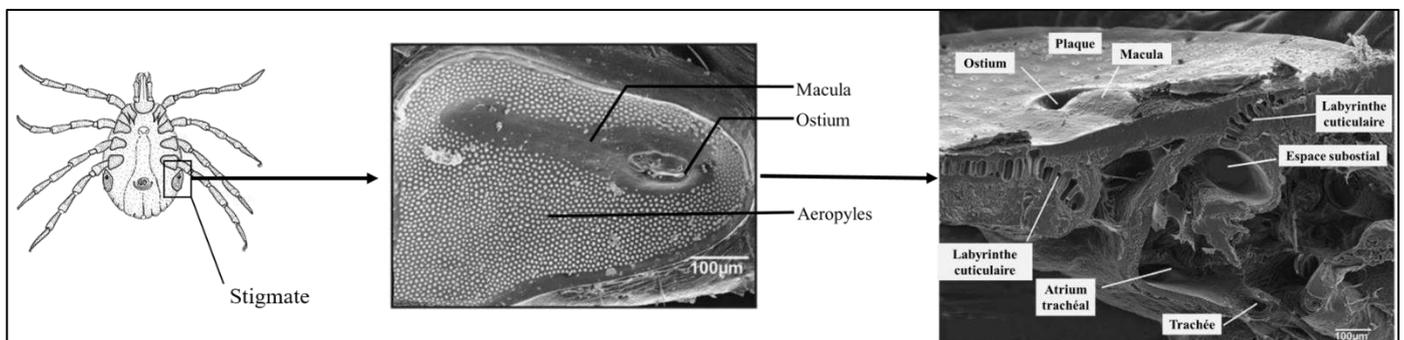


Figure 10: Appareil respiratoire, exemple de la tique dure, adapté à partir de (Sonenshine and Roe 2014) (Barker and Walker 2014)

#### 1.2.2.5 Système de circulation et d'excrétion

- Le système circulatoire

Les tiques possèdent un système circulatoire rudimentaire et lacunaire. La circulation de l'hémolymphe (liquide qui s'apparente au sang chez les vertébrés) se fait grâce à un vaisseau dorsal bombé en forme de cœur et entouré d'un sinus qui permet la propulsion de l'hémolymphe. La cavité interne où se trouvent les organes et l'hémolymphe se nomme l'hémocoèle. Les hémocytes, ou cellules

du système immunitaire, et des peptides antimicrobiens circulent dans l'hémolymphe et constituent le principal mécanisme de défense immunitaire innée de la tique (S. Bonnet et al. 2015).

- Les glandes salivaires et la salive

Les glandes salivaires sont au nombre de deux et se situent dans les régions antéro-latérales. Elles sont constituées d'acini reliés entre eux par des canaux. Le tout forme une structure en grappe (figure 11A). Au sein de ces acini, des granules de sécrétion sont retrouvés. Il existe quatre types d'acini différents (types I, II, III et IV), définis en fonction de la nature et composition (type de cellules) des granules de sécrétion et chacun a sa propre fonction (S. Bonnet et al. 2015)(figure 11B). Le type I est agranulaire et les 3 autres sont granulaires. Les acini de type IV sont seulement retrouvés chez les mâles et ont un rôle dans la lubrification et le transfert du spermatophore dans la femelle tique au cours de l'accouplement. La taille des glandes salivaires varie en fonction de l'état physiologique de la tique. Elle augmente notamment au cours d'un repas sanguin, jusqu'à 25 fois plus grande (Sonenshine and Roe 2014).

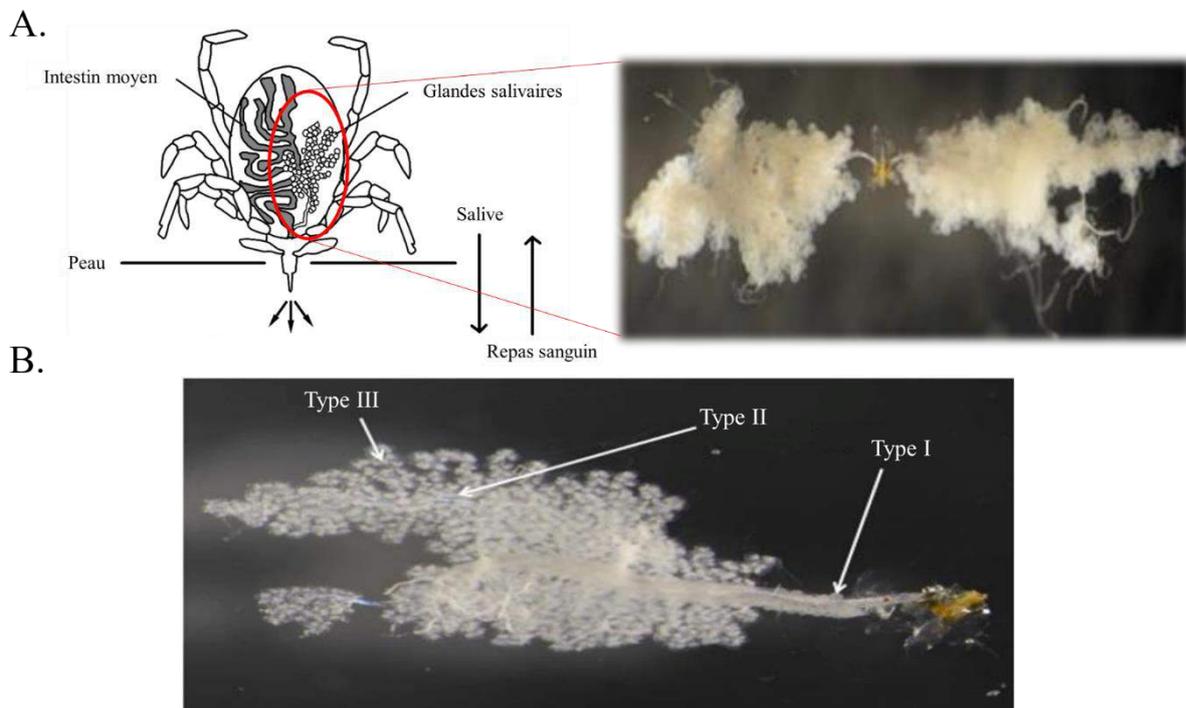


Figure 11: Localisation des glandes salivaires des tiques avec une structure en grappe (A) et composée de différents types d'acini (B) à partir de (Šimo et al. 2017) et (Z. Li 2018)

Une des fonctions principales de ces glandes est la sécrétion de salive lors d'une prise de repas sur un hôte. La salive possède des propriétés anticoagulantes et vasodilatatrices favorisant la création d'un micro-hématome au niveau du site de la piqûre. Elle permet, comme chez d'autres arthropodes hématophages, de moduler la réaction immunologique de l'hôte en émettant diverses substances anti-inflammatoires et immunosuppressives (Ribeiro 1987) via les acini de type II (Sonenshine and Roe 2014). La salive est sécrétée via le canal salivaire puis dans le canal préoral. Les glandes salivaires sont

également impliquées dans la survie des tiques dans une atmosphère à faible degré d'hygrométrie en synthétisant des molécules hygroscopiques, via les acini de type I, permettant l'absorption de la vapeur d'eau contenue dans l'air. La fixation à l'hôte de manière très solide est permise par la sécrétion de ciment au niveau des acini de types II et III. Chez les tiques dures, elles permettent également l'évacuation d'eau provenant du repas sanguin absorbé, jusqu'aux deux tiers de l'eau contenue dans le sang sont ainsi évacués. Ce processus se nomme transsudation postprandiale et est assuré par les acini de type III (Binnington and Kemp 1980) (Sonenshine and Roe 2014). Chez les tiques molles, l'évacuation de l'eau s'effectue via les glandes coxales lors du repas sanguin. Ces dernières sont reliées au milieu extérieur par les pores coxaux situés entre les coxae I et II (S. Bonnet et al. 2015). Enfin, la salive joue un rôle très important dans la transmission des agents pathogènes puisque, outre le moyen de transport de ces agents, elle contient des molécules qui vont modifier l'environnement au niveau du site de piqûre favorisant ainsi la transmission (Šimo et al. 2017).

- Les tubes de Malpighi

Les tubes de Malpighi ont une fonction excrétoire. Ils sont reliés au sac rectal et permettent la collecte des produits azotés circulant dans l'hémolymphe. Ces déchets sont ensuite transformés en cristaux de guanine et évacués par l'anus (S. Bonnet et al. 2015).

### 1.3 La tique dure : exemples d'*Ixodes ricinus* et *Ixodes persulcatus*

Au cours de cette thèse, deux tiques dures ont été étudiées : *Ixodes ricinus* et *Ixodes persulcatus*.

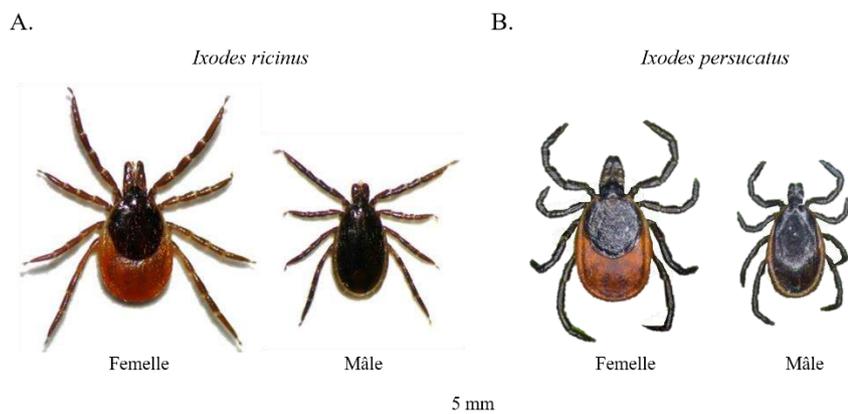


Figure 12: Photographies des tiques adultes *Ixodes ricinus* (A)(Springer et al. 2021) et *Ixodes persulcatus* (B) (Zykov 2021)

### 1.3.1 Distribution géographique et environnement

En Europe de l'ouest, la tique dure la plus répandue est *Ixodes ricinus*. Au fil des années, il est observé que les populations d'*I. ricinus* s'étendent de plus en plus vers le nord de l'Europe (ECDC 2021b). *I. persulcatus* est retrouvée en Europe de l'est et en Asie. Les populations de ces deux espèces d'*Ixodes* peuvent co-habiter en Europe centrale/de l'est (ECDC 2021a) (figure 13).

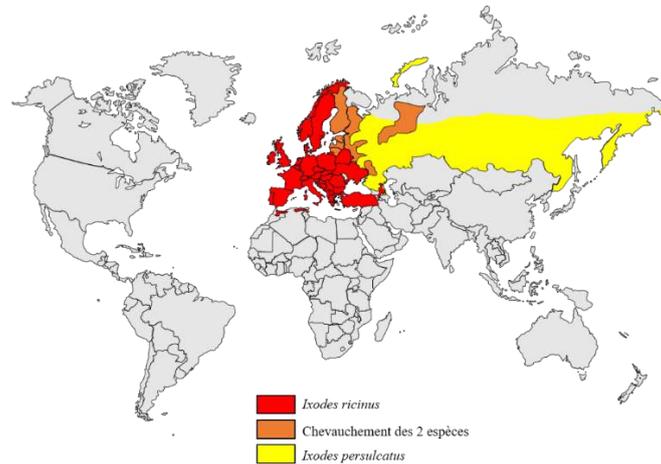


Figure 13: Répartition géographique des tiques *Ixodes ricinus* (ECDC 2021b) et *Ixodes persulcatus* (ECDC 2021a)

*Ixodes ricinus* et *Ixodes persulcatus* sont sensibles à la dessiccation et évoluent donc dans un environnement humide avec une humidité relative supérieure à 80% et une température comprise entre 5 et 25°C. Mais en fonction des sous-populations de ces espèces séparées géographiquement, les seuils de température d'activité peuvent changer. L'activité de ces tiques est influencée par des facteurs abiotiques tels que la température, l'humidité, l'ensoleillement ou encore la photopériode. Par conséquent, en hiver ces tiques sont très peu actives et peuvent être en diapause. Leur métabolisme est alors réduit au niveau minimal (Gilbert, Aungier, and Tomkins 2014).

### 1.3.2 Un cycle de vie à trois stades et trois hôtes

Au sein de la famille *Ixodidae*, le genre *Ixodes* contient le plus grand nombre d'espèces de tiques vectrices d'agents pathogènes d'importance à la fois en médecine vétérinaire et humaine : telles que les tiques *I. ricinus* (Europe tempérée), *I. persulcatus* (Europe Centrale et de l'Est et Asie) (Jongejan and Uilenberg 2004). Ces tiques dures ont un cycle de vie à trois stades de développement : larve, nymphe et adulte, mesurant respectivement moins de 1 mm, 2 à 3 mm et 3 à 4 mm (figure 14) (S. Bonnet et al. 2015). Au stade adulte, un dimorphisme sexuel est observé entre le mâle et la femelle et cette dernière est sensiblement plus grande que le mâle. Le processus qui s'opère entre ces stades se nomme la mue. Dans la nature, le cycle de vie d'*I. ricinus* et *I. persulcatus* dure entre deux et trois ans (S. Bonnet et al. 2015).

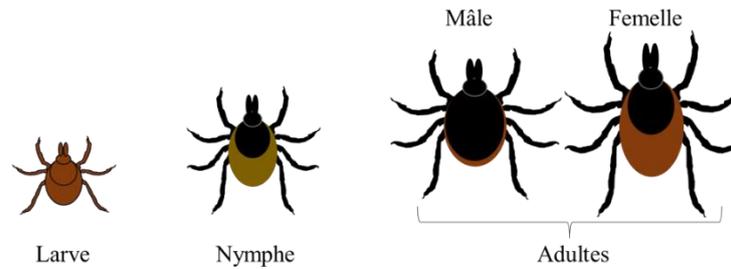


Figure 14: Trois stases de développement pour les tiques dures

Le cycle biologique des tiques se divise en deux phases : une phase libre qui correspond au temps de mue, ponte, maturation et éclosion des œufs... et une phase parasitaire correspondant au repas sanguin pris sur des hôtes vertébrés. Les tiques *I. ricinus* et *I. persulcatus* sont des tiques exophiles (évoluent dans l'environnement extérieur pendant leurs phases libres). À l'inverse, certaines tiques sont endophiles et vivent donc à proximité de leurs hôtes dans des environnements abrités comme des nids ou terriers (Pérez-Eid 2007).

Selon la famille et l'espèce de tiques, le nombre de phase parasitaire diffère et est compris entre un et trois pour les tiques dures (figure 14). Trois hôtes vertébrés sont nécessaires au cycle de développement d'*I. ricinus* et *I. persulcatus* (S. Bonnet et al. 2015). Pour trouver ses hôtes, la tique se positionne au-dessus du couvert végétal et tend sa première paire de pattes pour s'accrocher à un vertébré passant à proximité d'elle. Sur ces pattes, l'organe de Haller permet la détection d'hôtes. Ce mode de chasse est dit « à l'affût ». Cependant, ce mode représente un risque pour la tique qui est très sensible à la déshydratation. Pour pallier à cela, la tique alterne sa position entre le couvert végétal et le sol pour se réhydrater. Selon la stase de développement, des hôtes seront plus ou moins privilégiés. Les rongeurs sont les hôtes de prédilection au stade larvaire, et au fur et à mesure des stases suivantes, des hôtes de plus en plus grands seront favorisés.

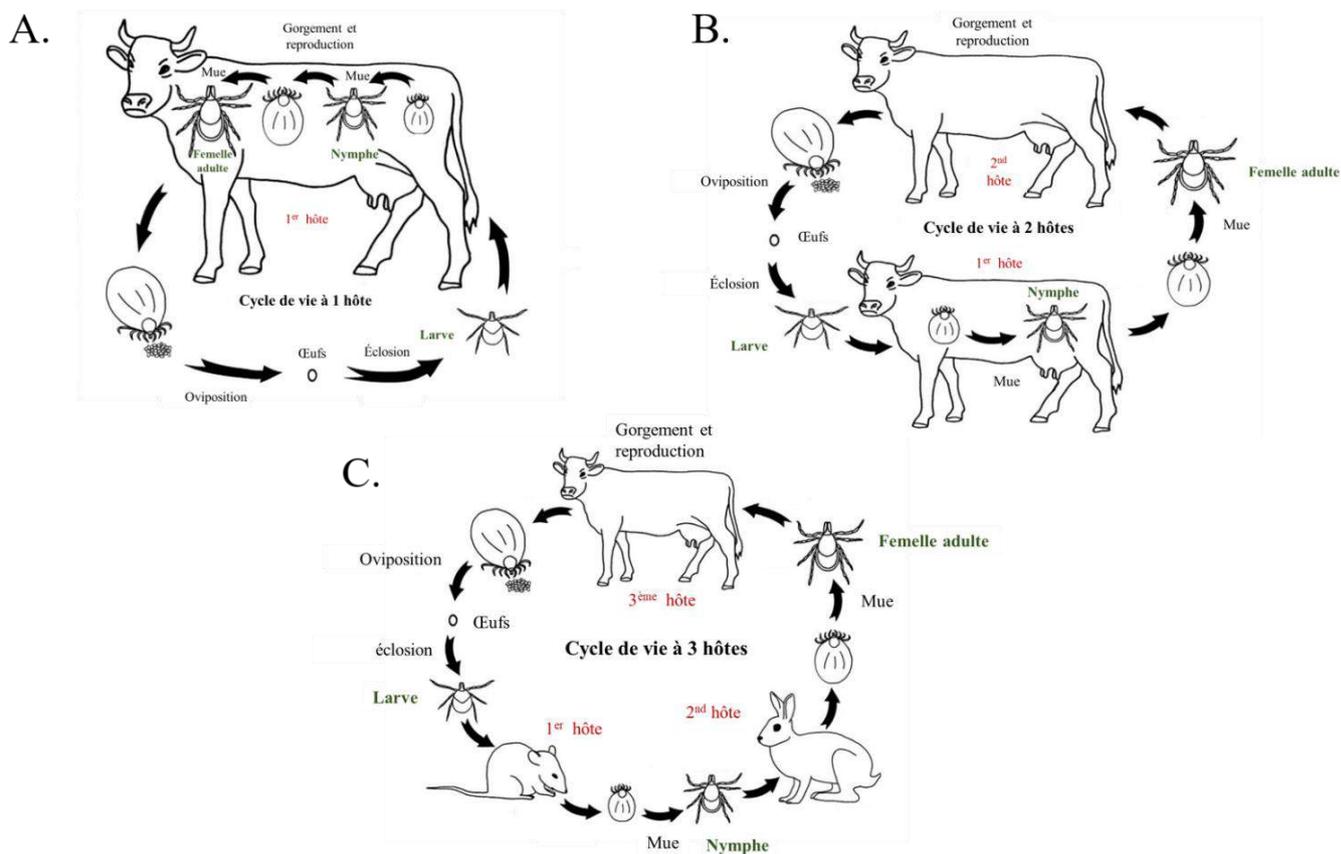


Figure 15: Exemple des cycles de vie des tiques de la famille *Ixodidae* à un hôte (A), deux hôtes (B) et trois hôtes (C) à partir de (Sonenshine and Roe 2014)

## 1.4 Risques sanitaires majeurs pour la santé humaine et animale

### 1.4.1 Impacts directs sur la santé humaine et animale

Les tiques étant des ectoparasites hématophages, elles représentent un risque sanitaire notamment en santé animale. Elles sont notamment responsables de pertes économiques importantes et significatives dans les élevages. La piqûre de tique constitue une plaie au niveau de la peau et peut être comme une « porte ouverte » pour des agents pathogènes opportunistes, pouvant entraîner des infections et des abcès (Pérez-Eid 2007). Certaines espèces de tiques tropicales, comme *Amblyomma*, peuvent prélever jusqu'à 4 mL de sang. En cas de grande infestation chez un vertébré, un grand volume de sang est prélevé et une spoliation sanguine peut être entraînée. Elle se manifestera par un affaiblissement de l'animal et une anémie. En outre, la productivité de l'élevage en est fortement impactée (Jongejan and Uilenberg 2004). De plus, l'industrie du cuir est également une victime de cet arthropode car la plaie formée au niveau de la peau détériore celle-ci et entraîne une diminution de la valeur de la peau (Jongejan and Uilenberg 2004).

La salive de certaines tiques contient de toxines paralysantes et certaines régions sont plus touchées par ce problème comme la côte Est de l'Australie, l'Amérique du Nord et l'Afrique. Ces

toxines ont probablement une origine ovarienne et ont pour cible des récepteurs nerveux (Pérez-Eid 2007). En santé animale, environ 60 espèces de tique ont été décrites comme étant responsables de paralysie et seulement quelques-unes en santé humaine. Si la tique est retirée rapidement, la paralysie sera alors réversible. Sinon, le patient mourra d'un arrêt respiratoire. Des allergies et des chocs anaphylactiques peuvent avoir pour origine la piqûre d'une tique (S. Bonnet, George, and Boulanger 2015). Des piqûres de tiques répétées peuvent induire chez l'humain une hypersensibilité à la viande rouge. Il s'agit du syndrome  $\alpha$ -Gal où des glycoprotéines contenues dans la salive des tiques entraînent une augmentation d'IgE et jouent un rôle majeur dans le développement de l'allergie aux aliments et médicaments contenant de l' $\alpha$ -Gal (Cabezas-Cruz et al. 2019).

Enfin, la présence de ces arthropodes proches des troupeaux pousse notamment les éleveurs à utiliser des acaricides. Mais ces derniers sont retrouvés sous forme de résidus au sein de la viande et du lait, réduisant ainsi leur qualité (Jongejan and Uilenberg 2004).

## 1.4.2 Impacts indirects : un grand vecteur d'agents pathogènes

En Europe, les tiques sont les premiers vecteurs d'agents pathogènes en santé animale et humaine et se classent au second rang à l'échelle mondiale, juste après le moustique. Environ 10% des tiques décrites sont impliquées dans l'épidémiologie des maladies vectorielles. Elles assurent une transmission active (mécanique et biologique) d'un agent pathogène d'un vertébré à un autre vertébré (Pérez-Eid 2007). Les tiques peuvent transmettre la plus grande variété d'agents infectieux (bactéries, parasites et virus) responsables de maladies chez l'Homme et l'animal telles que la borréliose de Lyme, les rickettsioses, les babésioses, les theilérioses ou encore l'encéphalite à tique (S. Bonnet, George, and Boulanger 2015).

### 1.4.2.1 Capacité et compétence vectorielle

Pour qu'une tique soit considérée comme vectrice d'un agent pathogène, elle doit être, pour cela, compétente pour le transmettre. La transmission repose donc sur la compétence vectorielle de la tique pour un agent pathogène donné. En effet, la tique doit être capable d'acquérir l'agent infectieux au cours d'un repas sanguin sur un hôte infecté. Il doit ensuite infecter les cellules du tractus digestif et disséminer au sein du vecteur, dans l'hémocoèle, jusqu'à atteindre les glandes salivaires afin d'être transmis à un nouvel hôte lors d'un autre repas sanguin (figure 16) (Rodhain 1991). La compétence vectorielle reflète le niveau de compatibilité du complexe agent pathogène/arthropode. Elle est notamment définie par des facteurs intrinsèques tels que la génétique et la physico-chimie et est spécifique d'un système tique/agent infectieux (de la Fuente et al. 2017). La tique peut acquérir un agent pathogène via trois autres voies de transmission. La plus minoritaire est la voie sexuelle avec un mâle infecté et capable de transmettre l'agent à la femelle lors de l'accouplement. La plus majoritaire est la

transmission par « co-repas » (ou cofeeding). L'agent est transmis d'une tique infectée à une ou plusieurs tiques non infectées prenant leur repas sanguin à proximité de la première. Cette voie de contamination ne nécessite pas d'avoir un agent pathogène circulant dans un hôte vertébré. Enfin, la transmission verticale (ou transgénérationnelle) est également observée chez les tiques et a notamment été décrite pour plusieurs virus, bactéries et parasites. L'agent pathogène est donc transmis d'un parent à sa descendance (en totalité ou une partie) (Pérez-Eid 2007). La transmission de l'agent pathogène depuis la tique se fait dans la majorité des cas via la salive au cours d'un repas sanguin. Toutefois, il existe également une transmission non salivaire : transmission fécale (contamination du site de piqûre ou des pièces buccales par les déjections) (Pérez-Eid 2007).

La période d'incubation extrinsèque (PEI) correspond au temps qui s'écoule entre l'acquisition d'un agent pathogène par un arthropode et la transmission lors d'un repas sanguin. En raison de leur mode de vie particulier (un repas sanguin par stase de développement), un critère est nécessaire voire obligatoire/systématique pour qu'une tique soit vectrice : la transmission trans-stadiale. L'agent pathogène doit alors être maintenu au sein de la tique lors de la mue vers la stase suivante et donc survivre à l'histolyse et l'organogénèse qui s'opèrent (Pérez-Eid 2007). De ce fait, la PEI est plus longue chez la tique (quelques semaines à quelques mois) que celle observée par exemple chez le moustique pour le virus de la dengue (8 à 12 jours) (Tjaden et al. 2013). La PEI est également dépendante de facteurs abiotiques comme la température.

La capacité vectorielle est l'aptitude de la tique à transmettre un agent pathogène. Elle inclut donc des facteurs biologiques comme la compétence vectorielle mais également des déterminants bioécologiques tels que l'abondance, la longévité ou encore les préférences trophiques (de la Fuente et al. 2017). De plus, la capacité vectorielle est soumise à des facteurs environnementaux tels que le climat et la localisation géographique. La distribution géographique et l'écologie des tiques peuvent être influencées par le réchauffement climatique (comme dit précédemment, *I. ricinus* s'étend de plus en plus vers le nord de l'Europe) mais également par les activités humaines telles que la déforestation, l'urbanisation et les échanges internationaux (Campbell-Lendrum et al. 2015). Tous ces paramètres sont alors à prendre en compte dans l'évaluation des risques d'émergences de maladies à tiques.

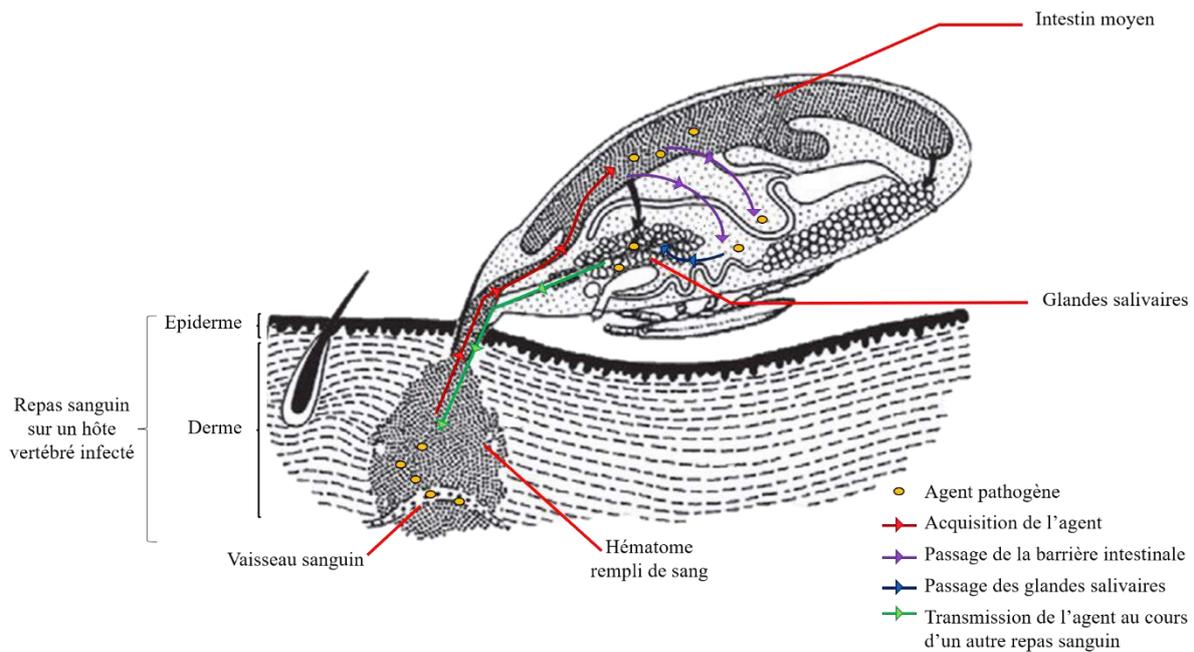


Figure 16: Mécanisme général de l'acquisition et transmission des agents pathogènes par la tique, adaptée à partir de (S. Bonnet et al. 2015)

#### 1.4.2.2 Exemple d'agents pathogènes transmis par la tique (bactéries, et parasites)

Dans ce paragraphe, seuls quelques exemples de bactéries et parasites transmis par les tiques seront donnés. Les virus transmis par les tiques seront abordés plus en détails dans la sous partie suivante de ce manuscrit.

- Transmission de bactéries

Les principales bactéries vectorisées par les tiques appartiennent aux genres *Borrelia*, *Rickettsia*, *Anaplasma* et *Ehrlichia*. La borréliose de Lyme est la maladie la plus connue en santé humaine à l'échelle mondiale. Les tiques du genre *Ixodes* peuvent transmettre les agents bactériens appartenant au complexe *Borrelia burgdorferi* sensu lato. La maladie de Lyme est un syndrome inflammatoire multi-systémique en réponse à la présence de *B. burgdorferi* s.l.. Trois étapes de la maladie sont observées : (i) la forme localisée précoce dans les 3 à 30 jours après la piqûre de tique, il s'agit de l'érythème migrant (inflammation cutanée ronde qui va s'étendre), (ii) la forme disséminée dans les 6 mois après la piqûre qui peut être caractérisée par des signes cliniques généraux (myalgie, fatigue, fièvre...) ou par d'autres signes cliniques (rhumatologiques, neurologiques, dermatologiques, etc.) et (iii) la forme disséminée tardive. Cette dernière forme se manifeste par des acrodermatites chroniques atrophiantes, atteintes neurologiques tardives, etc. (S. Moutailler et al. 2015). Les bactéries du genre *Rickettsia* sont classées dans deux groupes : typhus et fièvres pourprées (Spotted fever) et sont retrouvées partout dans le monde.

Enfin le genre *Anaplasma* regroupe des agents qui selon la région géographique n'ont pas le même impact. En effet, sur le continent américain, les *Anaplasma* sont fortement impliquées dans des cas humains d'anaplasmose, tandis qu'en Europe les animaux sont les plus affectés, comme les ruminants (S. Moutailler et al. 2015). L'anaplasmose granulocytaire à *Anaplasma phagocytophilum* est la plus importante en termes de santé publique humaine et vétérinaire dans les régions où sont retrouvées des tiques du genre *Ixodes*. Les symptômes chez l'Homme se manifestent au bout d'1 à 3 semaines après une piqûre de tique, par de la fièvre, un état de malaise ou d'un syndrome polyalgique avec des céphalées et myalgies. Des formes sévères ont été observées avec des atteintes multiviscérale. Chez les ruminants domestiques, comme les bovins, les signes cliniques sont une forte fièvre, une anorexie, un abattement, une démarche irrégulière. Des avortements ont également été observés chez des femelles gestantes (S. Moutailler et al. 2015).

- Transmission de parasites

Des parasites peuvent également être transmis par les tiques. Parmi les infections parasitaires, les piroplasmoses (babésiose et theilériose) touchent un grand nombre d'hôtes vertébrés. Les parasites responsables de ces pathologies sont multiples et appartiennent principalement à deux différents genres : *Babesia* et *Theileria*. Les piroplasmoses sont très étudiées en raison du fort impact économique en santé vétérinaire. Les symptômes sont l'anorexie, l'apathie, la fièvre, l'ictère et l'anémie. En cas de babésiose, de l'hémoglobinurie est observée. Un gonflement des ganglions lymphatiques superficiels et un emphysème pulmonaire sont retrouvés en cas de theilériose. La mortalité liée à ces affections parasitaires dépend de l'espèce, de l'âge de l'animal mais également du moment de la prise en charge de la pathologie (date du diagnostic et mise en place du traitement adéquat) (S. Moutailler et al. 2015).

Chez les bovins, *B. bovis*, *B. bigemina* et *B. divergens* sont les principales espèces responsables de babésioses. Chez les animaux de compagnie tels que le chien, six espèces sont incriminées (*B. canis*, *B. rossi*, *B. vogeli*, *B. gibsoni*, *B. conradae* et *T. annae*). *T. equi* et *B. caballi* sont responsables de piroplasmoses équinées et font partie des maladies de la liste de l'OIE (Organisation mondiale de la santé animale) affectant les équidés. Tout déplacement d'équidé entre pays nécessite un dépistage par tests sérologiques et une quarantaine est mise en place pour les animaux séropositifs (OIE 2019a)(S. Moutailler et al. 2015). *B. divergens* transmis par *I. ricinus* en Europe et *B. microti* par *I. scapularis* aux Etats-Unis, sont reconnus depuis longtemps comme des agents zoonotiques de la piroplasmose (Perez de Leon et al. 2014)(S. Moutailler et al. 2015).

## 2 Les virus transmis par les tiques

De nos jours, environ 170 virus transmis par les tiques ont été identifiés. Les tiques impliquées dans leur transmission appartiennent aux familles *Argasidae* (tiques molles) et *Ixodidae* (tiques dures) et aux genres *Ornithodoros*, *Argas*, *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* et *Boophilus*. Les virus transmis par les tiques sont des arbovirus (arthropod-borne virus) car ils sont transmis par un arthropode hématophage. Certaines espèces de tiques peuvent également transmettre plusieurs virus (Labuda and Nuttall 2004). Les virus transmis par les tiques sont moins étudiés, exceptés deux virus TBEV et CCHFV, par comparaison avec d'autres virus transmis par d'autres arthropodes. Pourtant au cours des dernières années, de nombreux virus ont émergé dans des nouvelles aires géographiques et d'autres ont été découverts. La figure 17 montre les principaux virus qui ont un impact en santé humaine à l'échelle mondiale (Mansfield et al. 2017)(CDC 2019)(Alzahrani et al. 2010).

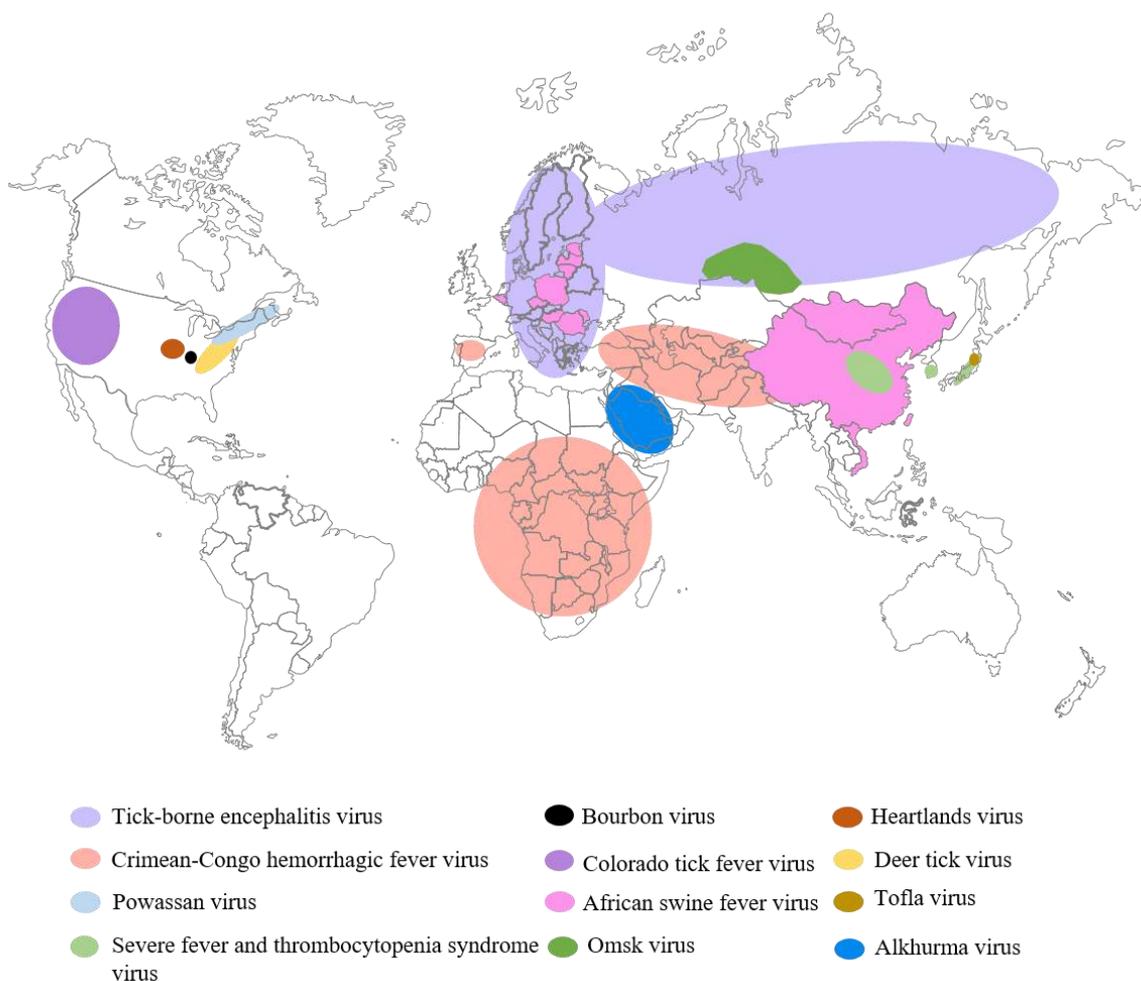


Figure 17: Cas d'épidémies liées aux virus transmis par les tiques dans le monde selon (Mansfield et al. 2017) (CDC 2019)(Alzahrani et al. 2010)

- Le virus de l'encéphalite à tique (TBEV)

TBEV appartient au genre *Flavivirus* et est un virus zoonotique. Il est responsable de troubles neurologiques sévères chez l'Homme et les animaux en Europe et Asie. Il a été décrit pour la première fois en Autriche en 1931 et isolé en Russie en 1937 (Valarcher et al. 2015). Les particules virales sont de petite taille et ont à leur surface une enveloppe lipidique qui contient deux protéines de surface : la glycoprotéine E et la protéine membranaire M (figure 18A). Le génome fait environ 11kb et il est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive qui code une polyprotéine qui sera par la suite modifiée par des protéases cellulaires et virales pour donner 10 protéines virales : C (capside), prM (précurseur M), E, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (NS: protéine non-structurale) (figure 18B) (Mandl 2005). Les souches de TBEV peuvent être classées dans 3 sous-types : Western European, Siberian et Far Eastern. Les virus *Louping ill* (LIV) et *Langat* (LGTV) sont deux espèces de flavivirus transmis par les tiques proches de TBEV (Mandl 2005). Les tiques vectrices appartiennent au genre *Ixodes* et les espèces impliquées sont *I. ricinus* et *I. persulcatus*. Le réservoir animal est constitué de rongeurs et plus particulièrement par des campagnols. Chaque année, environ 10 000 cas humains sont rapportés (Kaiser 2016). La particularité de TBEV est qu'il existe deux voies de contamination possibles : la piqûre de tique et la consommation de lait ou de fromage de mouton ou de chèvre non pasteurisés. En effet, les petits ruminants peuvent être infectés et sécréter du virus via le lait pendant la phase de virémie. L'encéphalite à tique est une pathologie qui se déroule en deux phases (biphasique) et commence en général par un état pseudo-grippal (fièvre, maux de tête, courbatures...). Ensuite, 20 à 30% des patients vont entamer la seconde phase durant laquelle les symptômes plus sévères apparaissent sous formes de troubles neurologiques (méningo-encéphalite, poliomyélite ou polyradiculonévrite) (Mandl 2005). Enfin, chez 10 à 20% des patients, une forme chronique peut se mettre en place et se manifeste par des troubles neuropsychiatriques ou de lourdes séquelles nerveuses (Valarcher et al. 2015).

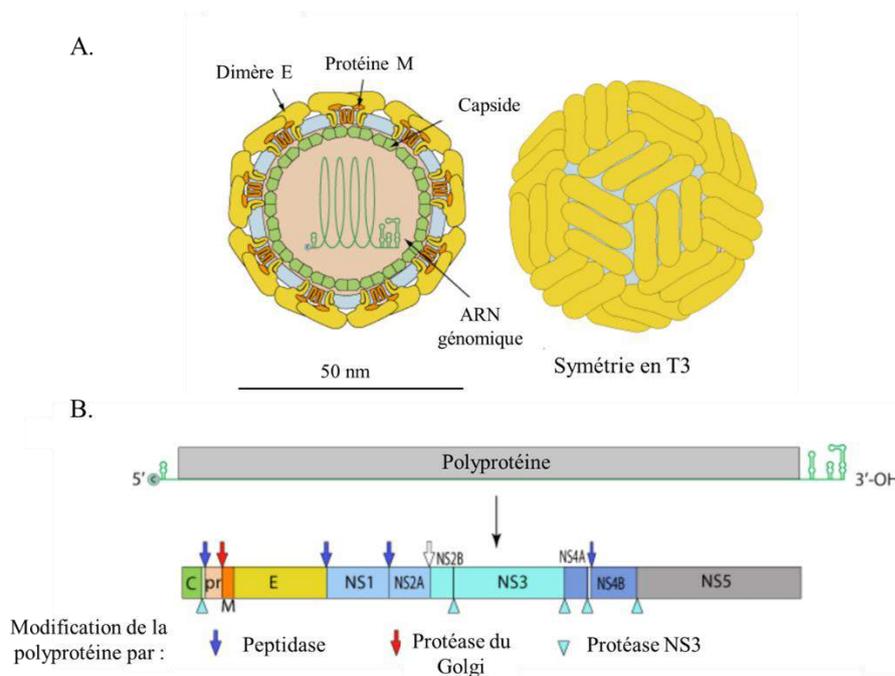


Figure 18: Représentation schématique d'une particule virale d'un flavivirus (A) et de son génome (B) à partir de (ViralZone 2016)

- La fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV)

CCHFV est un orthonairovirus et est responsable de fièvre hémorragique chez l'Homme en Afrique, Europe du sud et de l'est et Asie. Il a été décrit pour la première fois en Crimée en 1940 puis en 1960 en République Démocratique du Congo (Hawman and Feldmann 2018). Son génome est formé de trois segments d'ARN simple brin : small (S), medium (M) et large (L) selon leur taille (figure 19A). Chaque segment a un cadre de lecture unique. Les segments S, M et L codent, respectivement, la nucléocapside, le précurseur de la glycoprotéine membranaire et l'ARN polymérase ARN dépendante. Cinq protéines sont ensuite générées à partir du précurseur : Mucin-like domain, GP38, Gn, Nsm and Gc (Figure 19B) (Xia et al. 2016). La transmission de CCHFV est assurée par les tiques appartenant au genre *Hyalomma* mais une autre voie de contamination est possible par contact avec du sang d'animaux infectés au cours d'un abattage (Hawman and Feldmann 2018). Les bovins, les chèvres, les moutons et les lièvres sont de potentiels réservoirs et peuvent donc servir d'hôtes amplificateurs. La maladie se déroule en deux temps. Après quelques jours d'incubation, les premiers symptômes se manifestent et sont non spécifiques : fièvre, myalgie, diarrhée, nausées et vomissement. La seconde période correspond ensuite à la phase hémorragique. Le taux de mortalité est d'environ 30% et 4 000 cas humains ont été déclarés dans le monde entre 2000 et 2013 (Shayan et al. 2015).

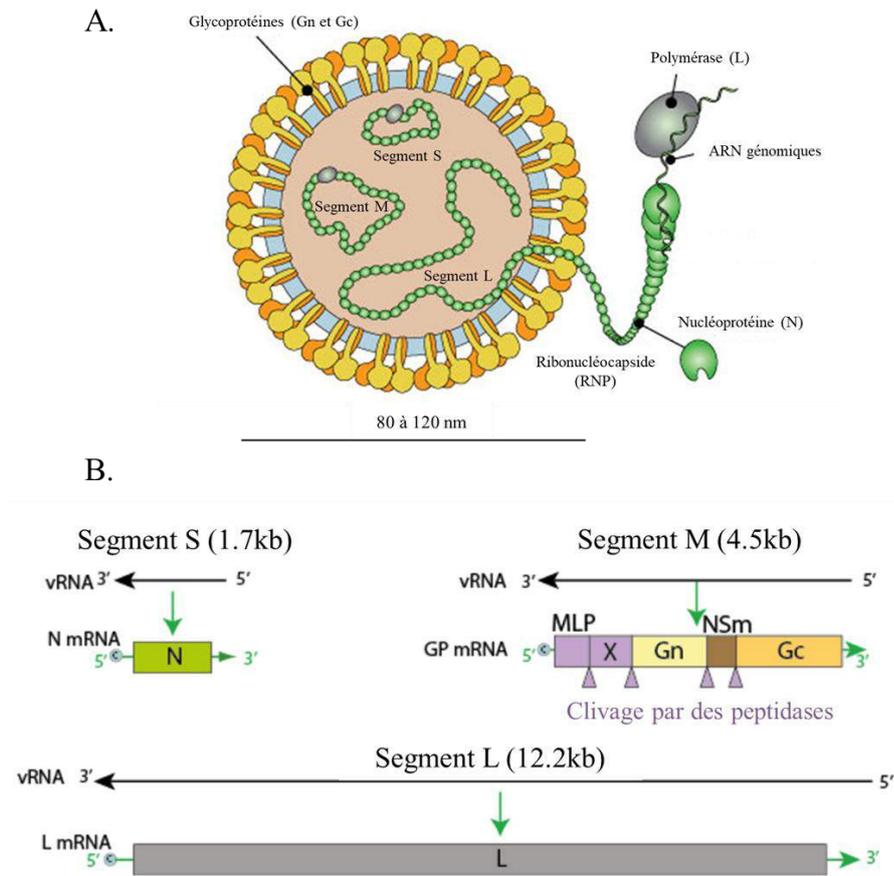


Figure 19: Représentation schématique d'une particule virale d'un orthonairovirus (A) et de son génome (B) à partir de (ViralZone 2010)

- Autres virus transmis par les tiques

L'émergence d'autres virus transmis par les tiques dans le monde durant les dernières décennies a été observée. Ces virus représentent un risque majeur important pour la santé publique. Parmi eux, beaucoup ont émergé en Amérique du Nord tels que les virus Powassan (POWV), Bourbon (BRBV), Heartland (HRTV) et Alkhurma (ALKV). Un autre virus est surveillé aux Etats-Unis : le virus de la fièvre à tique du Colorado (CTFV).

POWV est un flavivirus et appartient au groupe de TBEV. Aujourd'hui, deux lignées génétiques sont reconnues : POWV (lignée 1) et le virus deer tick (lignée 2). Les tiques *Ixodes scapularis* et *Ixodes cookie* en sont les vectrices et les rongeurs le réservoir. POWV est responsable de troubles neurologiques chez l'Homme (Hermance and Thangamani 2017). Le CDC (Centers of Disease Control) a rapporté environ 100 cas entre 2006 et 2016 et les cas ne cessent d'augmenter au cours de la dernière décennie. Cette augmentation est peut-être due à l'émergence des vecteurs (Krow-Lucal et al. 2018).

CTFV a été découvert en 1946 par Florio. Il s'agit de l'espèce type du genre *Coltivirus*. Il est transmis par les tiques des genres *Dermacentor*, *Ixodes*, *Haemaphysalis* et *Otobius*. Les hôtes réservoirs sont les rongeurs et cervidés. Les symptômes chez l'humain vont de la simple fièvre jusqu'à l'encéphalite et/ou la polyradiculonévrite. Le nombre de cas de CTFV a toutefois diminué au cours des 20 dernières années (Houssam Attoui, Mohd Jaafar, De Micco, et al. 2005) (Marfin et al. 2010).

BRBV est apparu en 2014 au Kansas à la suite du décès d'un patient présentant les symptômes suivants : nausée, fatigue, courbatures, leucopénie, lymphopénie, thrombocytopénie, ... après avoir été piqué par plusieurs tiques (Savage et al. 2017). Il appartient au genre *Thogotovirus* et est probablement transmis par *Amblyomma americanum* (Savage et al. 2018).

HRTV a été pour la première fois identifié en 2009 chez deux fermiers du Missouri. Il appartient au genre *Phlebovirus* et est génétiquement proche d'un autre phlébovirus qui a émergé en Asie, le virus de la fièvre sévère avec syndrome de thrombocytopénie (SFTSV). Les patients présentaient un tableau clinique similaire à celui de SFTSV : fièvre, fatigue, nausée, anorexie et thrombopénie. La tique *Amblyomma americanum* assure la transmission de HRTV (Brault et al. 2018). SFTSV est endémique en Chine et son taux de mortalité est proche de 50%. Il est responsable de fièvre hémorragique chez l'humain (Lei, Liu, and Yu 2015) et est transmis par la tique *Haemaphysalis longicornis* (Zhuang et al. 2018).

D'autres cas de fièvres hémorragiques ont été rapportés sur le continent asiatique, dans des régions de la Sibérie de l'ouest en Russie. Le virus incriminé est le virus de la fièvre hémorragique d'Omsk (OHFV), qui est un des trois flavivirus responsables de fièvre hémorragique. Les deux autres sont les virus de la maladie de la forêt de Kyasanur (KFDV) en Inde et Alkhurma (ALKV) en Arabie Saoudite. La transmission d'OHFV est assurée par les tiques : *Dermacentor reticulatus*, *Dermacentor marginatus* et *Ixodes persulcatus*. Le virus a également été isolé à partir de moustiques : *Aedes excrucians*, *Mansonia richiardii* et *Aedes flavescens*. Mais leur rôle dans la transmission d'OHFV est mineur comparé à celui des tiques. L'Homme peut également s'infecter au cours d'activité de chasse au rat musqué. Depuis 1946, environ 1064 cas ont été officiellement répertoriés (Růžek et al. 2010). L'AKLV représente un sérieux problème sanitaire en Arabie Saoudite. Les cas d'infection à AKLV rapportés sont liés à une exposition directe ou indirecte à des produits issus d'animaux infectés. L'implication des tiques *Hyalomma* spp. a été plusieurs fois suggérée. Entre 2012 et 2016, une cinquantaine de cas pour 100 000 habitants a été rapportée chaque année. Au cours de la dernière épidémie, en 2016, 38 d'infections ont été déclarés dont 24 concernaient des patients ayant un âge compris entre 15 et 45 ans (Tambo and El-Dessouky 2018).

Au cours des dernières années, un virus transmis par les tiques a vu son intérêt grandir à cause de son fort impact en santé vétérinaire : le virus de la peste porcine africaine (ASFV). C'est l'unique arbovirus animal possédant un génome à ADN (*Asfivirus*). Les tiques molles appartenant au genre *Ornithodoros*, et plus particulièrement *Ornithodoros moubata*, assurent sa transmission en Afrique. En Europe, il a été montré que la tique *Ornithodoros erraticus* pouvait s'infecter et maintenir le virus mais ne semble pas participer activement à sa circulation. La maladie est très contagieuse et l'infection peut également se faire par contact direct avec un animal infecté. ASFV a été pour la première fois décrit au Kenya dans les années 20 et a émergé au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle en Europe. Des contrôles drastiques et des programmes d'éradication ont permis d'éradiquer le virus en Europe, sauf en Sardaigne. Cependant, en 2004, une nouvelle épidémie a été observée en Afrique et la maladie a de nouveau été retrouvée en 2014 en Europe (Galindo and Alonso 2017). Plus récemment, en Europe, le virus a été retrouvé en 2018 en Belgique. Les porc domestiques et les sangliers sont des hôtes très sensibles à la souche qui circulait (Cwynar, Stojkov, and Wlazlak 2019). La mortalité chez les porcs domestiques et sauvages atteint presque 100%. Les signes cliniques sont les suivants : fièvre, dépression, anorexie, avortement chez les femelles gestantes, ... De ce fait, cette arbovirose occasionne des pertes économiques considérables dans la filière porcine (OIE 2018).

En 2017, un nouveau virus transmis par les tiques a été découvert chez une patiente chinoise présentant un état fébrile. Il s'agit du virus Alongshan (ALSV) découvert dans la région du même nom. Il appartient au groupe Jingmen virus, un virus non-classifié désigné comme flavi-like virus. ALSV a été isolé à partir de tiques *Ixodes persulcatus* (Wang et al. 2019). De plus, en 2019 sur l'archipel de Kotka, au sud-est de la Finlande, de l'ARN de l'ALSV a été détecté chez des tiques *Ixodes ricinus* et le séquençage a démontré que la souche était proche de la souche isolée en Chine (Kuivanen et al. 2019).

### 3 Généralités sur les arbovirus et leurs vecteurs

#### 3.1 Dix familles virales concernées par les arbovirus et plusieurs vecteurs arthropodes

Les arbovirus, comme leur nom l'indique (arthropod-borne virus), sont des virus transmis par des arthropodes. Ils sont généralement maintenus dans un cycle qui alterne un vecteur arthropode hématophage et un hôte vertébré. Certains sont maintenus dans un cycle impliquant seulement des arthropodes ou d'autres sont également transmis aux plantes. Dix familles virales et quatorze genres viraux sont concernées par les arbovirus (tableau 1). Parmi les vecteurs arthropodes d'arbovirus animaux, il y a les moustiques (*Aedes*, *Anopheles*, *Culex*), les tiques, les phlébotomes et les moucheron piqueurs du genre *Culicoides*. Au moins 500 arbovirus ont été identifiés à ce jour. La moitié est transmise par des moustiques, le tiers par des tiques et le reste essentiellement par des phlébotomes et les

*Culicoides* (Karabatsos 1985). La préférence alimentaire des arthropodes va donc limiter et déterminer les hôtes vertébrés impliqués dans le cycle de réplication des arbovirus. Par exemple, certains arbovirus comme celui de la Dengue, vont avoir comme hôte vertébré majoritaire, l'Homme, à cause du cycle urbain de son vecteur anthropophile, *Aedes aegypti* (Nathanson and Moss 2013). Pour d'autres arbovirus, l'Homme est considéré comme hôte accidentel lorsque le vecteur hématophage prend son repas sanguin sur lui plutôt que sur les hôtes sur lesquels il se nourrit préférentiellement (Nathanson and Moss 2013). Il a été démontré que les arbovirus pouvaient établir une infection persistante au sein des arthropodes. Ces derniers peuvent alors être considérés comme des vecteurs viraux mais également comme des réservoirs (Weaver and Barrett 2004). Les arthropodes peuvent être porteurs de plusieurs virus, des cas de co-infections ayant déjà été rapportés chez les moustiques notamment (Caron et al. 2012). De plus, le moucheron piqueur, *Culicoides anophelis*, a été découvert dans les années 1950 en Chine et en Inde. Ce moucheron piqueur se nourrit sur des moustiques des genres *Aedes*, *Anopheles*, *Armigeres* et *Culex*. La vaste gamme d'hôtes de ce moucheron en fait, par conséquent, un vecteur biologique idéal pour la propagation de virus parmi les différentes populations de moustiques (Houssam Attoui, Mohd Jaafar, et al. 2021).

A l'exception de virus de la peste porcine africaine (ASFV), les arbovirus animaux sont des virus à ARN. Les virus à ARN ont un taux de mutations plus élevé que celui des virus à ADN en raison d'un manque de propriété de relecture de leur ARN polymérase ARN dépendante pendant la réplication (Drake 2006). D'autres événements peuvent participer à leur variabilité génétique comme des événements de recombinaisons, duplications de gènes, réassortiments de segments, etc. La population générée par la multiplication des virus dans une cellule est alors hétérogène mais ceux-ci sont proches génétiquement. Il s'agit de quasi-espèces virales qui ont une plasticité phénotypique importante et une grande capacité à s'adapter à de nouveaux hôtes et/ou environnements (Esteban Domingo and Perales 2018). Cependant, ces virus sont soumis à des sélections compétitives et événements aléatoires. Les pressions naturelles sont les plus efficaces pour la sélection des différents variants, notamment pour l'élimination des mutations à large effet. Parmi elles, les goulots d'étranglement réduisent fortement la variabilité génétique, et par conséquent, la taille des populations générées (Manrubia et al. 2005).

Tableau 1: Familles et genres des arbovirus selon (ICTV 2020)

| Ordre                  | Famille                 | Genre                  | Génome               | Espèce type | Vecteurs pour ce genre                             |
|------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------|-------------|--|
| <i>Asfuvirales</i>     | <i>Asfarviridae</i>     | <i>Asfivirus</i>       | ADN db               | ASFV        | Tiques   |
| <i>Articulavirales</i> | <i>Orthomyxoviridae</i> | <i>Thogotovirus</i>    | 6 segments d'ARN sb  | THOV        | Tiques   |
|                        |                         | <i>Quararjavirus</i>   | 8 segments d'ARN sb  | QRFV        | Tiques   |
| <i>Bunyavirales</i>    | <i>Nairoviridae</i>     | <i>Orthonairovirus</i> | 3 segments d'ARN sb  | CCHFV       | Tiques   |
|                        | <i>Peribunyaviridae</i> | <i>Orthobunyavirus</i> |                      | LACV        | Moustiques, Tiques                                 |
|                        | <i>Phenuiviridae</i>    | <i>Phlebovirus</i>     |                      | RVFV        | Moustiques, Tiques                                 |
| <i>Mononegavirales</i> | <i>Nyamiviridae</i>     | <i>Nyavirus</i>        | ARN sb linéaire      | NYMV        | Tiques   |
|                        | <i>Rhabdoviridae</i>    | <i>Ledantavirus</i>    |                      | LDV         | Moustiques, Tiques, Puces                          |
|                        |                         | <i>Vesiculovirus</i>   |                      | VSV         | Phlébotomes  |
| <i>Amarillovirales</i> | <i>Flaviviridae</i>     | <i>Flavivirus</i>      | ARN sb linéaire      | WNV         | Moustiques, Tiques                                 |
| <i>Reovirales</i>      | <i>Reoviridae</i>       | <i>Orbivirus</i>       | 10 segments d'ARN sb | BTV         | Moustiques, Tiques, Mouches piqueuses, phlébotomes |
|                        |                         | <i>Coltivirus</i>      | 12 segments d'ARN sb | CTFV        | Tiques   |
|                        |                         | <i>Seadornavirus</i>   |                      | BAV         | Moustiques   |
|                        |                         | <i>Phytoreovirus*</i>  |                      | RDV         | Cicadelles   |
|                        |                         | <i>Fijivirus*</i>      | 10 segments d'ARN sb | FDV         | Delphacides  |
| <i>Oryzavirus*</i>     | RRSV                    | Delphacides            |                      |             |  |
| <i>Martellivirales</i> | <i>Togaviridae</i>      | <i>Alphavirus</i>      | ARN sb linéaire      | EEEV        | Moustiques   |

\*: arbovirus de plantes, sb: simple brin; db: double brin; ASFV: African swine fever virus; THOV: Thogoto virus; QRFV: Quararjavirus; CCHFV: fièvre hémorragique de Crimée Congo; LACV: La Crosse virus; RVFV: Rift Valley fever virus; NYMV: Nyamanini nyavirus; LDV: Le Dantec virus, VSV: vesicular stomatitis virus; WNV: West Nile virus; BTV: bluetongue virus; CTFV: Colorado tick fever virus; BAV: Banna virus; RDV: rice dwarf virus; FDV: Fiji disease virus; RRSV: rice ragged stunt virus; EEEV: Eastern equine encephalitis virus

### 3.2 Risques pour la santé humaine et animale – émergence d'arbovirus

Les arbovirus animaux peuvent être zoonotiques ou épizootiques. Ces virus sont importants en termes de santé humaine et animale puisqu'ils sont responsables d'épidémies dans certaines régions du monde. Ces épidémies ont également des impacts économiques conséquents. La répartition géographique des arbovirus est à mettre en relation avec celle de leurs vecteurs pour lesquels leur répartition géographique est bien définie. De plus, le changement climatique et les activités humaines (déforestation, urbanisation, échanges internationaux...) ont contribué à modifier l'écologie des vecteurs et ainsi à engendrer de nouvelles émergences virales (Durand et al. 2013)(Gould et al. 2017)(Kamal et al. 2018). Au vu de l'intensification des échanges internationaux, le risque d'introduction de virus dans de nouvelles aires géographiques n'est pas négligeable notamment par le biais d'importation de vecteurs et/ou d'animaux infectés et amplificateurs (commerce légal ou illégal) (Durand et al. 2013). Par exemple, entre 2015-2016, une souche asiatique du virus Zika (ZIKV) a été introduite sur le continent américain à la suite d'un grand événement international (Coupe du Monde 2014 au Brésil) (Weaver et al. 2016). La surveillance des arbovirus est un enjeu majeur pour la santé humaine, animale et économique. En raison de la modification de l'écologie des vecteurs et la grande capacité de ces virus à s'adapter à de nouveaux hôtes et/ou environnements, les outils de diagnostic sont de plus en plus innovants et performants pour la surveillance de ces virus dans le but d'avoir une meilleure prédiction/gestion des émergences et/ou ré-émergences virales (Migné et al. 2021).

### 3.2.1 La santé publique humaine et animale menacée

Une infection à un arbovirus se manifeste par un tableau clinique polymorphe lié au tropisme de ces virus (vasculaire, hépatique, cérébrale, cellules souches hématopoïétiques, ...). Les symptômes d'une arbovirose sont variables, allant de la simple fièvre, fatigue jusqu'à des symptômes plus sévères tels que des atteintes neurologiques ou des fièvres hémorragiques pouvant entraîner la mort. Des arbovirus différents peuvent être à l'origine de tableaux cliniques identiques et inversement, un même virus peut provoquer plusieurs types de syndromes. Seul le diagnostic en laboratoire permet l'identification de l'agent viral par méthode directe ou indirecte (Migné et al. 2021).

Les arbovirus sont principalement retrouvés en régions tropicales ou subtropicales. Cependant, depuis quelques années, des cas autochtones d'arboviroses en France métropolitaine (région tempérée) ont été décrits (Garcia et al. 2016). Il n'existe encore aucune thérapeutique spécifique pour les arboviroses, seuls des traitements symptomatiques et des soins de soutien sont mis en place. La prophylaxie repose sur la lutte contre les vecteurs et la vaccination : fièvre jaune (YFV), encéphalite à tiques (TBEV), encéphalite japonaise (JEV), fièvre du Nilot occidental (WNV) (pour les chevaux). D'autres vaccins sont à l'étude mais non encore commercialisés (Garcia et al. 2016).

Parmi les arboviroses touchant l'Homme certaines, malheureusement, se démarquent par leur taux de mortalité très important dans les zones où les virus et les vecteurs sont très présents. Par exemple, la dengue est l'arbovirose la plus importante à l'échelle mondiale. Chaque année, 390 millions de cas d'infections sont estimés et environ 100 millions de patients développent des symptômes et entre 20 et 25 000 personnes en décèdent, y compris des enfants. Depuis les 20 dernières années, le nombre de cas suit une courbe exponentielle (Bhatt et al. 2013). D'autres arboviroses gagnent du terrain et s'étendent sur plusieurs continents. Par exemple, deux épidémies causées par deux virus transmis par des moustiques du genre *Aedes*, principalement par *Ae. albopictus* et secondairement *Ae. aegypti*, ont marqué le début du 21<sup>ème</sup> siècle : le virus Zika (ZIKV) en 2015-2016 sur le continent américain et le virus Chikungunya (CHIKV) en 2005-2007 dans l'océan Indien (île de la Réunion, Inde, Malaisie, Sri Lanka) (Weaver and Forrester 2015). Certaines arboviroses animales sont très graves et présentent des taux de mortalité et de morbidité très hauts. La fièvre catarrhale ovine (ou bluetongue BTV – « la maladie de la langue bleue ») en est un parfait exemple (Erasmus 1975).

### 3.2.2 Des problèmes économiques engendrés

Les arbovirus ont également un impact économique non négligeable notamment pour les élevages comme le BTV, transmis par les moucheron piqueurs du genre *Culicoides*, responsable de taux de morbidité et de mortalité élevés dans les élevages ovins. L'épizootie due à la souche BTV de

sérotype 8 (BTV-8) en Europe de 2006 à 2008 a eu un impact financier de l'ordre du milliard de dollars en France. En plus de l'impact direct de la maladie, les échanges commerciaux d'animaux et de produits animaux ont été bloqués (Rushton and Lyons 2015).

En santé animale, les maladies vectorielles peuvent faire l'objet d'une réglementation spécifique quand elles constituent des risques sanitaires majeurs et/ou des obstacles aux échanges internationaux d'animaux. La fièvre West Nile (WNV) ou l'encéphalite japonaise (JEV) font partie en France des maladies inscrites sur la liste des dangers sanitaires de catégorie 1 qui sont mentionnés dans l'article L.201-1 du code rural et de la pêche maritime (Ordonnance n°2011-862 du 22 juillet 2011). De plus, au niveau international, WNV et JEV sont inscrits dans le code sanitaire pour les animaux terrestres de l'OIE et les foyers doivent obligatoirement être notifiés à cet organisme (OIE 2019b).

### 3.3 Variabilité génétique des virus transmis par les insectes

Les arbovirus constituent des risques majeurs pour la santé humaine et animale. Au cours des dernières décennies, plusieurs émergences d'arbovirus ont été constatées. Ces émergences ont notamment été permises grâce à des mutations retrouvées dans les génomes viraux. Par exemple, la mutation A226V dans la séquence de la glycoprotéine E1 de CHIKV lui a permis d'être vectorisé par une autre espèce de moustique et ainsi émergé sur le pourtour de l'océan Indien entre 2005 et 2007. Les arbovirus transmis par les insectes tels que les moustiques, les phlébotomes ou les moucheron de genre *Culicoides*, ont beaucoup été étudiés notamment au niveau de leur génétique. Les arbovirus animaux sont pour la plupart des virus à ARN sauf le virus de la peste porcine africaine (virus à ADN). Les virus à ARN présentent des taux de mutation très élevés par rapport aux virus à ADN, ils sont de l'ordre de 300 fois plus élevés, en raison d'un manque de propriété de relecture de leur polymérase au moment de la répllication virale. Cependant, il a été mis en évidence une relative stabilité génétique au sein de leur génome qui pourrait résulter de l'alternance d'hôtes. En effet, les arbovirus doivent être capables de se répliquer au sein d'un vecteur arthropode et d'un hôte vertébré. Connaître la génétique de ces arbovirus est un bon moyen pour mieux comprendre et anticiper ces phénomènes d'émergence virale. Malheureusement, les virus transmis par les tiques ont moins été étudiés à ce niveau-là. Au cours de la dernière décennie, des virus connus ont émergé sur de nouveaux territoires comme les virus de l'encéphalite à tiques (TBEV), Louping ill (LIV), Powassan (POWV) et la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV). Des nouveaux virus, certains mortels, ont été découverts comme les virus Bourbon (2014) et Heartland (2015) aux Etats-Unis, le virus du syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopenie (SFTSV) en Chine en 2011 et le virus Alkhurma (ALKV) en Arabie Saoudite depuis 2012.

La revue, qui suit, fait l'état de l'art des études menées sur la variabilité génétique des virus transmis par les insectes dans le but d'identifier au mieux les paramètres à prendre en compte lors de l'étude des virus transmis par les tiques. Pour se faire, des passages de virus en série dans des cellules correspondant aux hôtes vertébrés ou vecteurs arthropodes et en alternant les deux types de cellules (arthropodes et vertébrés) ont été réalisés dans le but d'évaluer l'impact de l'alternance sur la génétique et la fitness du virus. Des caractéristiques et des aspects moléculaires des arbovirus, transmis par les insectes, ont été identifiés au cours de multiples études visant à étudier leur variabilité génétique. Les virus se spécialisent dans l'hôte en série ou sont capables d'infecter deux hôtes ou types de cellules distincts lors de passages alternés. La perte ou le gain de fitness peuvent être évalués en étudiant différentes caractéristiques *in vitro* et *in vivo* : (i) la cinétique de croissance (étude temporelle des titres de virus) ; (ii) capacité à infecter des types cellulaires distincts ; (iii) induction de la virémie chez des souris infectées expérimentalement (en fonction de la souche : pic de virémie plus ou moins précoce, plus ou moins élevé par rapport à la souche parentale) ; (iv) taux d'infection des arthropodes ; et (v) dissémination du virus dans les arthropodes. Les analyses de séquences, issues d'un séquençage profond, ont permis de relier les changements de virulence ou de fitness à des gènes viraux spécifiques. Les gènes et les protéines codées, responsables des interactions entre les virus et les cellules, comme les protéines de l'enveloppe ou de la capsid externe, accumulent des mutations qui permettent au virus d'infecter efficacement un type de cellule ou des espèces vectrices distinctes.

**REVUE:** Migné, Camille Victoire, Sara Moutailler, and Houssam Attoui. 2020. "Strategies for Assessing Arbovirus Genetic Variability in Vectors and/or Mammals." *Pathogens* 9 (11): 1–18. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110915>.

Review

# Strategies for Assessing Arbovirus Genetic Variability in Vectors and/or Mammals

Camille Victoire Migné <sup>1,2</sup>, Sara Moutailler <sup>1,\*</sup> and Houssam Attoui <sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Paris-Est Sup, 94700 Maisons-Alfort, France; camille.migne.ext@anses.fr

<sup>2</sup> UMR1161 Virologie, INRAE, ANSES, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Paris-Est Sup, 94700 Maisons-Alfort, France

\* Correspondence: sara.moutailler@anses.fr (S.M.); houssam.attoui@vet-alfort.fr (H.A.); Tel.: +33-1-49-77-46-50 (S.M.); +33-1-43-96-70-07 (H.A.)

Received: 9 October 2020; Accepted: 3 November 2020; Published: 5 November 2020



**Abstract:** Animal arboviruses replicate in their invertebrate vectors and vertebrate hosts. They use several strategies to ensure replication/transmission. Their high mutation rates and propensity to generate recombinants and/or genome segment reassortments help them adapt to new hosts/emerge in new geographical areas. Studying arbovirus genetic variability has been used to identify indicators which predict their potential to adapt to new hosts and/or emergence and in particular quasi-species. Multiple studies conducted with insect-borne viruses laid the foundations for the “trade-off” hypothesis (alternation of host transmission cycle constrains arbovirus evolution). It was extrapolated to tick-borne viruses, where too few studies have been conducted, even though humans faced emergence of numerous tick-borne virus during the last decades. There is a paucity of information regarding genetic variability of these viruses. In addition, insects and ticks do not have similar lifecycles/lifestyles. Indeed, tick-borne viruses are longer associated with their vectors due to tick lifespan. The objectives of this review are: (i) to describe the state of the art for all strategies developed to study genetic variability of insect-borne viruses both *in vitro* and *in vivo* and potential applications to tick-borne viruses; and (ii) to highlight the specificities of arboviruses and vectors as a complex and diverse system.

**Keywords:** arboviruses; arthropods; genetic variability; insect-borne virus; tick-borne virus

## 1. Introduction

### 1.1. Vector-Borne Diseases in the World

More than half of the world is at risk from vector-borne diseases. They are illnesses caused by pathogens in human and animal populations. Each year more than one billion humans are infected and more than one million die from vector-borne diseases. The most affected by these diseases are the poorest and least-developed countries [1]. Hematophagous arthropods (mosquitoes, ticks, sandflies, triatomine bugs, fleas and flies) transmit a wide variety of pathogens including bacteria, parasites and viruses [1]. In addition to the public health burden, vector-borne diseases negatively impact the economies of affected countries. For example, according to the WHO, the annual economic costs of malaria in Africa have been estimated to be about \$12 billion [2]. In animal health, vector-borne diseases cause important economic losses particularly in the breeding industry. For instance, the *Culicoides*-borne bluetongue virus (BTV) is responsible for mortality and morbidity in sheep. The economic impact of BTV outbreaks can be substantial. In 2006, a BTV outbreak in Europe cost \$1.4 billion and \$85 million to France and the Netherlands, respectively [3].

Pathogen emergence is influenced by a range of parameters including pathogen evolution, the role of arthropod vectors and their feeding preferences (anthropophilic and/or ornithophilic) in global or local geographic expansion, anthropogenic factors (human movements, etc.) and climate change [4,5]. In this review, we emphasise the role of ticks as arthropod vectors, particularly for viruses. Studying the genetic variability of tick-borne viruses falls far behind mosquito-borne viruses. Studies conducted with insect-borne viruses have set the methodology necessary for assessing genetic variability of tick-borne viruses.

### 1.2. Ticks and Tick-Borne Disease

Approximately 900 tick species were identified and classified into three families: *Argasidae* (soft ticks, 183 species), *Ixodidae* (hard ticks, 683 species) and *Nuttalliellidae* (one species). They are obligate hematophagous ectoparasites and feed on vertebrate hosts [6]. Ticks are found all around the world and affect animal and human health. They are responsible for significant economic losses, especially in livestock [7]. Ticks are involved in vector-borne diseases. Indeed, ticks can transmit a wide variety of pathogens such as bacteria, parasites and viruses. They are considered as the primary vectors for pathogens in animal health, and, in terms of human health, they are second to mosquitoes [8]. When ticks feed on infected vertebrate hosts, they likely ingest microorganisms. During their life cycle, hard ticks are in stasis each time they take a blood meal. For example, the European hard tick *Ixodes ricinus* is in stasis three times during its life cycle: larval, nymphal and adult stages. For ticks to act as vectors, the pathogen must be trans-stadially transmitted, thus nymphs and adults are major vectors [9]. Vector competence is an essential property for a tick to be considered a vector. Following ingestion, a pathogen must replicate within the arthropod in order to be transmitted to a new host during the next blood meal. Finally, tick population size is an important criterion which should be taken into account when discussing vector capacity [9].

Less than 10% of known ticks are involved in field transmission of viruses. These ticks belong to genera *Ornithodoros* and *Argas* (soft ticks) within family *Argasidae* and genera *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus* and *Boophilus* (hard ticks) within family *Ixodidae*. Certain ticks can transmit several viral species. Due to their lifespan and the potential for transovarial transmission of certain tick-borne, ticks could play a role of reservoir for the viruses they transmit [10]. In total, 170 tick-borne viruses have been identified to date (Table 1), as described in several reviews [10,11].

**Table 1.** Families and genera of tick-borne viruses.

| Order                  | Family                  | Genus                  | Genome                     |
|------------------------|-------------------------|------------------------|----------------------------|
| <i>Asfuvirales</i>     | <i>Asfarviridae</i>     | <i>Asfivirus</i>       | dsDNA                      |
| <i>Articulavirales</i> | <i>Orthomyxoviridae</i> | <i>Thogotovirus</i>    | 6 ssRNA genome segments    |
|                        |                         | <i>Quarantjavirus</i>  | 8 ssRNA genome segments    |
| <i>Bunyavirales</i>    | <i>Nairoviridae</i>     | <i>Orthonairovirus</i> | 3 ssRNA genome segments    |
|                        | <i>Peribunyaviridae</i> | <i>Orthobunyavirus</i> |                            |
|                        | <i>Phenuiviridae</i>    | <i>Phlebovirus</i>     |                            |
| <i>Mononegavirales</i> | <i>Nyamiviridae</i>     | <i>Nyavirus</i>        | Non-segmented linear ssRNA |
|                        | <i>Rhabdoviridae</i>    | <i>Ledantavirus</i>    |                            |
|                        |                         | <i>Vesiculovirus</i>   |                            |
| <i>Amarillovirales</i> | <i>Flaviviridae</i>     | <i>Flavivirus</i>      | Linear ssRNA               |
| <i>Reovirales</i>      | <i>Reoviridae</i>       | <i>Orbivirus</i>       | 10 dsRNA genome segments   |
|                        |                         | <i>Coltivirus</i>      | 12 dsRNA genome segments   |

ss, single-stranded; ds, double-stranded.

Despite many tick-borne viruses are responsible for human infections, only a few have been studied, in particular tick-borne encephalitis (TBE) and Crimean-Congo haemorrhagic fever (CCHF) virus. Table 2 lists some tick-borne viruses that have been responsible for outbreaks in humans or animals [11–13].

Table 2. Examples of tick-borne viruses.

| Virus  | Family                        | Genus           | Vector  | Vertebrate Reservoir            | Geographical Distribution                    | Disease   | References |
|--|-------------------------------|-----------------|---|---------------------------------|--|---|------------|
| <i>Tick-borne encephalitis virus</i> (TBEV)                      | Flaviviridae                  | Flavivirus      | <i>I. ricinus, I. persulcatus</i>                               | Bank vole                       | Europe Asia                                  | Fever to encephalitis   | [14–16]    |
| <i>Powassan virus</i> (POWV)                                     |                               |                 | <i>I. scapularis, I. cookei</i>                                 | Rodents                         | North America                                | Neurological disorders  | [17,18]    |
| <i>Omsk haemorrhagic fever virus</i> (OHFV)                      |                               |                 | <i>D. reticulatus, D. marginatus</i> and <i>I. persulcatus</i>  | Rodents                         | Western Siberia in Russia                    | Haemorrhagic fever  | [19]       |
| <i>Alongshan virus</i> (ALSV)                                    | Unclassified flavi-like virus |                 | <i>I. ricinus, I. persulcatus</i>                               | ?                               | China Finland                                | Fever   | [20–22]    |
| <i>Colorado tick fever virus</i> (CTFV)                          | Reoviridae                    | Coltivirus      | <i>Dermacentor, Ixodes, Haemaphysalis</i> and <i>Otobius</i>    | Rodents and deer species        | North America                                | Fever to encephalitis   | [23,24]    |
| <i>Bourbon virus</i> (BRBV)                                      | Orthomyxoviridae              | Thogotovirus    | <i>Amblyomma americanum</i>                                     | ?                               | North America                                | Nausea, weakness, pains and leukopenia, lymphopenia, thrombocytopenia, hyponatremia | [25,26]    |
| <i>Heartland virus</i> (HRTV)                                    | Phenuiviridae                 | Phlebovirus     | <i>Amblyomma americanum</i>                                     | ?                               | North America                                | Fever, fatigue, anorexia and thrombocytopenia                                       | [27]       |
| <i>Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus</i> (SFTSV) |                               |                 | <i>Haemaphysalis longicornis</i> and <i>Boophilus microplus</i> | ?                               | Asia   | Fever, fatigue, anorexia and thrombocytopenia                                       | [27]       |
| <i>Nairobi sheep disease virus</i> (NSDV)                        | Nairoviridae                  | Orthonairovirus | <i>Rhipicephalus appendiculatus, Haemaphysalis intermedia</i>   | Sheep and goats                 | Africa, Asia                                 | Fever and haemorrhagic gastroenteritis, abortion, and high mortality                | [28,29]    |
| <i>Crimean-Congo haemorrhagic fever virus</i> (CCHFV)            |                               |                 | <i>Hyalomma</i> spp.  | Cattle, goats, sheep and hares? | Africa, Southern and Eastern Europe and Asia | Haemorrhagic fever  | [30–32]    |
| <i>African swine fever virus</i> (ASFV)                          | Asfarviridae                  | Asfivirus       | <i>Ornithodoros</i> spp.  | Swine                           | Europe Asia                                  | In animal: fever, depression, anorexia, abortion in gestating female                | [33]       |

## 2. Arboviruses

At least 500 arboviruses (arthropod-borne viruses) have been identified to date, including tick-borne viruses. Almost half of arboviruses are transmitted by mosquitoes, a third by ticks and the rest by sandflies and biting midges [10]. Arboviruses do replicate in two hosts: their invertebrate vector and vertebrate host. Vectors and vertebrate hosts can play a role of amplifier and/or reservoir [34]. These viruses have important impacts on human and animal health. They are either epizootic or zoonotic. Emergence and/or re-emergence of arboviruses is a challenge that humanity is facing during the current century [4]. Incursions into novel geographical regions are becoming more frequent. For example, bluetongue disease caused by BTV infection has been considered for a long time as a tropical disease based on its geographical distribution. It was initially described within a geographical region between approximately 40° N and 35° S. During the second half of the 20th century, it emerged all around the world, disrupting trade and causing severe economic damage [35].

### 2.1. Viruses Quasi-Species

Almost all animal arboviruses are RNA viruses, except African swine fever virus (DNA virus), and they use several strategies to ensure their replication and transmission. Mutation rates of RNA viruses are 300-fold higher than for DNA viruses. Substitutions during replication have been estimated within the range of  $10^{-3}$ – $10^{-5}$  substitutions per nucleotide per replication [36]. The genetic variation of RNA viruses has to be considered for three levels: single replicative unit (early events when mutants are generated), gathering of several units (recombination, gene duplication, genome segment reassortments, gene transfers, etc.) and infection of susceptible hosts. Generation times for RNA viruses are short and the size of generated populations (quasi-species) is large [37]. In a quasi-species, viral progeny from a single cell is heterogeneous and non-identical but they have closely related genomes [38].

Mutants can be compartmentalised in different organs of a single organism. There are two mathematical models which are pertinent to study and interpret behaviour of virus quasi-species: calculation of the concentration of copies with no changes and consequently mutants and formulations of the error threshold for maintenance of genetic information [37].

Viruses are subject to competitive selection and random events. Some deleterious mutations lead to the extinction of given variants as their fitness declines. Natural selection is far more efficient for eliminating mutations with larger rather than smaller impact. In addition, viruses are confronted with bottlenecks. Genetic bottlenecks are the events that can cause important reduction of a population size, reducing their genetic diversity. Low frequency genomes are eliminated when they are subjected to a bottleneck [37]. For example, a study of Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV) showed that the midgut of *Culex taeniopus* mosquito was a severe bottleneck. The size of the viral population was significantly reduced after passage through the intestinal barrier [39]. The review by Forrester et al. describes the multiple bottlenecks to which West Nile virus (WNV), VEEV and CHIKV are subjected to upon infection of mosquito vectors [40]. Repeated bottlenecks lead to changes in the genomes of RNA viruses and the emergence of novel variants [41]. If a single genome from a viral quasi-species can generate a new viral population, this mutant probably has an advantageous mutation. This mutation is inheritable by the next generation. Consequently, bottlenecks are responsible for the accumulation of mutations in the consensus sequence of a quasi-species [42]. RNA viruses can cause acute and/or chronic infections. Viral quasi-species play a role in the escape from host immune response, therapeutic treatments and vaccines. Consequently, they play a role in the progression of pathogenesis and disease as shown for some viruses like DENV [43].

### 2.2. Genetic Variability Studies of Insect-Borne Viruses

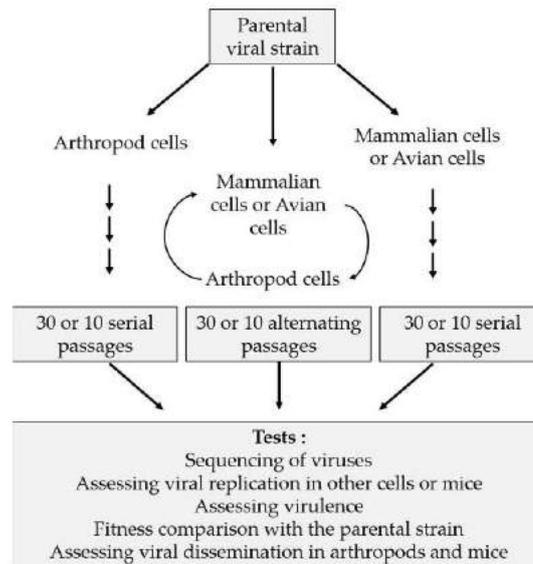
RNA viruses can expand their host range and adapt to new environment. The study of genetic variability helps understanding and anticipating viral emergence. For example, in 2004, Chikungunya

virus (CHIKV) caused major outbreaks in the Indian Ocean, India, Malaysia and Sri Lanka. The virus, which was responsible for these outbreaks, was identified as the African strain of CHIKV usually transmitted to humans by *Aedes aegypti* mosquitoes. The dispersal of this virus from Central/East Africa to Comoros Islands occurred via infected mosquitoes and/or humans. As a result of a single amino acid substitution (A226V) in the E1 envelope glycoprotein, CHIKV was able to infect *Aedes albopictus*, mosquitoes found in La Réunion Island [5]. This change in CHIKV has been described to lower the threshold of viraemia necessary to infect *Ae. albopictus* mosquitoes. A change at this position in Semliki Forest virus (P226S) was previously reported to free the virus from cholesterol dependence [44].

Several studies were conducted with insect-borne viruses in order to understand their genetic variability and fitness. Among those studied, there are viruses belonging to genera *Flavivirus* (WNV, Rabensburg virus (RBGV), *Saint Louis encephalitis virus* (SLEV), *Dengue virus* (DENV) and *Zika virus* (ZIKV)), *Alphavirus* (*Eastern equine encephalitis virus* (EEEV), VEEV, *Sindbis virus* (SINV), *Chikungunya virus* (CHIKV) and *Ross river virus* (RRV)), *Phlebovirus* (*Rift valley fever virus* (RVFV)), *Rhabdovirus* (*Vesicular stomatitis virus* (VSV)) and *Orbivirus* (BTV). The “trade-off” hypothesis, which came as a consequence of these studies, proposes that the alternating host transmission cycle of arbovirus likely constrains their evolution. These studies provide the basis for assessing trade-off in tick-borne viruses and better understanding their emergence. This review focusses on results which were highlighted by previous studies. Both in vitro and in vivo approaches were developed in these studies.

### 2.2.1. In Vitro Studies

Classically, in vitro studies are designed as shown in Figure 1 with serial and alternated passages in mammalian/avian and arthropod cell lines. Various tests are performed to assess fitness, virulence and genetic aspects. Some of these studies result in converging hypotheses. For example, during serial passages, viruses tend to become specialists when they are grown in a single-host cell type, whereas in alternated passages viruses have a similar behaviour as the parental strain. This characteristic was observed with different viruses: RVFV, EEEV, SINV, VEEV, SLEV and WNV [45–49]. Often, adaptation to a single cell type resulted in faster growth kinetics within the same cell type. This is the case of RVFV and SINV, where mammalian cell-adapted strains show faster replication rates as compared to the parental strain, whereas, in mosquito cells, viral titers are lower [45,47]. Following 40 passages in mosquito cells (C6/36), WNV and SLEV showed increased fitness and replication in this cell type [49]. For other viruses such as VEEV, the adaptation was demonstrated by an increase in binding efficiency to mammalian cells after serial passages in this cell type. Indeed, an amino acid substitution (G3K) was identified in the E2 glycoprotein. This position corresponds to the furin cleavage site which is involved in binding to heparan sulfate [48]. Deep sequencing and computational analyses of ZIKV envelope protein (E protein) were performed after transfecting cDNA libraries with codon substitutions into C6/36 or Vero cells. Specific substitutions conferred advantages to replicate in mosquito or primate cells, while other substitutions had negative impact on replication [50]. In a study focussing on RBGV by Ngo et al. (2019) [51], the authors successfully adapted the virus to a vertebrate host. RBGV was classified as lineage 3 of WNV and has never been isolated from vertebrate hosts. After four passages of two strains of RBGV in HEK-293 cells, at increasing temperatures (from 28 to 35 °C), they obtained variants capable of infecting and replicating in vertebrate cells. The majority of changes were found in two genes (NS3 and NS5 genes), which were presumed to play a role in host specificity and fitness. Using reverse genetics, they assessed the impact of mutating NS3 position 5716 (A5716G substitution, identified during the in vitro experimental infections). They tested the potential effect of this substitution on host range. A modest decrease of virus titers in HEK-293 cells was observed at both 28 and 35 °C [51].



**Figure 1.** Experimental strategy to test the genetic variability of arbovirus.

Serial passages reduce the capacity of arboviruses to infect heterologous cell types, resulting in a decreased fitness. CHIKV resulting from seven continuous passages in BHK-21 cells had a greater fitness in BHK-21 than in C6/C36 cells as compared to the parental strain. In addition, the alternated strain (C6/36–BHK-21 and C6/36–HeLa) showed an increased fitness in both cell types as compared to the parental strain [52]. Fitness of VSV varies in a cell-type dependent manner. Indeed, during a persistent infection of sanfly cells (LL-5), the fitness declined as early as the first passage, and then slightly increased, reaching a level of stability after passage 20. By contrast, during serial passages in BHK-21 cells, fitness continuously increased. In alternated passages, fitness initially increased slightly, and then declined, reaching a level of relative stability around passage 20 [53]. Virulence of certain viruses is decreased when they are grown in a single host cell type. The gene encoding phosphoprotein *NSs*, which is responsible for RVFV virulence, is deleted after 30 serial passages in BHK-21 or Aag2 cells, while, during alternated passages, it is not deleted [45]. Other studies showed that the size of EEEV plaques in BHK-21 cells is significantly reduced after 10 serial passages in avian (PDE) or mosquito (C7-10) cells as compared to the parental strain. The strain resulting from alternating the cycle between avian and mosquito cells showed a less important reduction of plaque size [54]. Virulence of VSV decreased after persistent infection in LL-5 and the size of plaques in BHK-21 cells decreased over the passages [53]. A study published in 1947 on BTV showed that virulence is attenuated after serial passages in embryonated eggs. The attenuated strain was injected into Merino sheep which showed no clinical signs and developed a solid immunity to a challenge with a virulent strain [55]. This study established the basis for developing live attenuated vaccines for sheep [56]. Further studies described methods of BTV attenuation, including serotypes 4, 9 and 16. Attenuation of these strains was accomplished by serial *in vitro* passages. BTV-4 and BTV-16 were passaged in Vero cells and BTV-9 in BHK-21 cells. During the process of attenuation, both replication capacity and pathogenicity were assessed in bovine foetal aorta endothelial cells (BFA) and new-born mice, respectively. The authors showed that attenuated BTV by *in vitro* serial passages had a reduced capacity to replicate in BFA cells and failed to kill new-born mice [57].

In DENV serially passaged in Huh-7 mammalian or C6/36 mosquito cells, more substitutions were identified in the genome of the serially passaged virus in mammalian (Huh-7) than that passaged in mosquito cells (C6/36) or by alternation [58]. During a DENV outbreak at the beginning of the 21st century, the virus was sequenced in naturally infected mosquitoes and patients. The sequence variation is lower in mosquitoes than in patients. A complementary study was performed in laboratory with

experimentally infected mosquitoes by intrathoracic injection. Comparable results to those obtained with field-caught mosquitoes were observed. The authors concluded that mosquitoes play a role in stabilising the genome sequence and contribute to transmission of a DENV dominant variant [59]. Another study of CHIKV genetic variability was conducted. Serial and alternated passages of CHIKV in Aag2 and/or BHK-21 cells resulted in fewer amino acid substitutions in invertebrate cells than in mammalian cells or alternation of cells. Five substitutions were identified. Three substitutions were common to CHIKV propagated serially in mammalian cells or by alternation of cells. The genome of CHIKV which was propagated serially in invertebrate cells had only one substitution identified [60]. These results suggest that passages in invertebrates, constrain virus evolution significantly more than during host cycling. In a distinct study involving CHIKV, substitutions were found more frequently during serial mammalian passages than in alternated passages. Furthermore, mutations identified during serial passages were less viable than those found during alternation. All observed sequences in serial passages did not end up in viable virus particles. Genetic diversity is not synonymous with fitness. In alternating cycles, the virus has to maintain high replication competence and high fitness of variants [52]. Ciota et al. [61] assessed the role of the mutant spectrum in adaptation and replication of WNV. The virus was passaged 40 times in mosquito cells (C6/36) or 20 times in chicken embryo fibroblasts (DF-1). An alternated passage was performed in DF-1 following 39 passages in C6/36. Throughout the 40 passages in C6/36, genetic variability of WNV increased significantly but decreased drastically after one passage in DF-1 cells. Over the passages in DF-1 cells, the virus titer reached its peak earlier, as compared to the parental strain. In addition, the genotypic heterogeneity was slightly lower compared with mosquito-derived WNV. These results suggest that the size of the mutant spectrum depends on the host cell [61]. In the latter study, the results support the “trade-off” hypothesis. Vertebrates likely play the role of a genetic bottleneck for this virus, while invertebrate play an essential role in expanding genetic variability of arboviruses.

Genetic diversification of BTV-17 was assessed. Ten serial and alternated passages were performed in cells derived from *Culicoides sonorensis* (cell line CuVaW3) and/or bovine pulmonary artery endothelial cells (BPAEC). The consensus nucleotide sequences from serial or alternated passages was 100% identical to that of the parental strain in all segments, except segments 5 and 10 (>99.8%). After one passage in CuVaW3 or BPAEC cells, amino acid substitutions were found in segments 5 (I229R) and 10 (A360G). These changes were observed in the sequences of segments 5 and 10 of BTV-17 passaged serially or by alternation in the two cell types. Genetic diversity of BTV-17 remains stable independently of cell types or passages serially or by alternation in a mammalian and/or insect cell lines. The parental strain was isolated in BHK-21 cells from an infected sheep. The virus seemed to be subjected to a strong selection in BHK-21 cells and amino acid substitutions in segments 5 and 10 resulted from the adaptation of BTV-17 in CuVaW3 and BPAEC cells [62]. By contrast, another study, conducted with BTV-3, showed that genetic diversity was larger after one passage in *Culicoides sonorensis* (KC) cells when compared with the parental strain, which was isolated from sheep blood. In addition, after one passage in BSR (a clone of BHK-21) cells, diversity dropped in all segments. The passage history of the BTV-3 strain was distinct from that of BTV-17. The blood from BTV-3 infected sheep was inoculated into embryonated chicken eggs (ECE) or KC cells. After passage in ECE (BTV-3E1), the virus was further grown in C6/36 mosquito cells (BTV-3E1/C6-1) followed by three additional passages in BSR cells (BTV-3E1/C6-1/BSR1, BTV-3E1/C6-1/BSR2 and BTV-3E1/C6-1/BSR3). The BTV-3 grown in KC cells (BTV-3KC1) was further passaged three times in BSR cells (BTV-3KC1/BSR1, BTV-3KC1/BSR2 and BTV-3KC1/BSR3). Mutations were observed in VP2 (segment 2) and NS1 (segment 5) of BTV-3E1/C6-1/BSR2 or BTV-3E1/C6-1/BSR3. Other mutations were observed in VP5 (segment 6) and VP6 (segment 9) of BTV-3KC1/BSR2 or BTV-3KC1/BSR3. Non-synonymous nucleotide substitutions (amino acids changes: Q169R and M51) were found in segment 8 (encoding NS2) of all BSR passages. The authors suggested that the various changes are likely involved in virus attenuation and/or host specialisation [63].

In summary, the trade-off hypothesis seems to be compatible with many of studied arboviruses except DENV and CHICKV. The evolution of these two viruses is constrained in their arthropod vector by contrast to WNV and the opposite is observed for WNV, for instance.

During *in vitro* experimental evolutionary studies of arboviruses, care should be taken when deciding upon which multiplicity of infection (MOI) to use. Indeed, when cells are infected at a high MOI, defective interfering particles (DI particles) are likely produced. DI particles were observed for several viruses belonging to different families such as the *Flaviviridae*, *Coronaviridae*, *Togaviridae*, *Paramyxoviridae*, *Rhabdoviridae* and *Reoviridae* [64]. Undiluted passages of viruses lead to accumulation of DI particles and result in a decrease of viral fitness. The DI particles can interfere with the standard virus replication, which can lead to rapid genome evolution. Studies of EEEV and VSV have shown that DI particles were preferentially replicated [46,65].

### 2.2.2. In Vivo Studies

Conducting *in vivo* studies with arboviruses to assess their genetic variability is a less frequent setting, due to the complex nature of these studies. In fact, these studies are subject to approval by ethics committees, require high containment animal facilities, rely on the availability of a relevant animal model and are time consuming, to cite a few essential conditions. Usually, the design of *in vivo* experiments is similar of those done *in vitro*: ten serial or alternated passages are made in mice or hamster and arthropods. For specific viruses, the results obtained *in vitro* are different from those passaged *in vivo*, yet certain characteristics are common to both situations. Host specialisation in serial passages was observed and assessed by measuring replication kinetics and viraemia in vertebrates. A study by Coffey et al. (2008) [48], focussed on VEEV, showed host specialisation of two strains (ID and IC) in mice or hamsters and mosquitoes. The viral strains derived from 10 serial passages in mosquitoes induced low levels of viraemia in mice and resulted in higher infection rates in mosquitoes as compared to the first passage. After 10 sequential passages, viraemia in vertebrates peaked earlier. Characteristics of viraemia were similar to those of parental strain in viruses alternated between mice or hamsters and mosquitoes [48]. These results support that alternation of host likely constrains evolution of a large number of arboviruses. Moreover, a non-synonymous nucleotide substitution was observed after 10 serial passages in mice in the sequence encoding the nsP4 polymerase. The frequency of mutated nsP4 position 6174 (R6174S) increased over the passages and seemed to correlate with earlier and higher levels of viraemia in mice. In addition, during serial passages in hamsters, a distinct amino acid substitution was observed in nsP4 sequence. Serial VEEV passaged in mosquitoes resulted in a synonymous substitution at nucleotide position 123 of the nsP1 sequence. The viral population with the latter substitution occurred at very low frequency, and it was only until the eight passage that its frequency increased, becoming relatively frequent at the tenth passage [48].

The viruses resulting from *in vitro* passages are usually further tested in mice and arthropods to evaluate their phenotypes. Serial *in vitro* passages result in a decreased fitness (and consequently resulted in lower levels of viraemia) *in vivo* as compared to the parental strain. It has been shown for RRV after serial passages in BHK-21 cells, where virulence in mice decreased. By contrast, animals died earlier when RRV was serially passaged in mice, thus selecting more virulent strains [66]. In a study by Moutailler et al. (2011) [45] focussing on RVFV, the strains and clones resulting from serial passages in BHK-21 and Aag2 cells did not cause death in mice. The parental strain and those resulting from alternated passages induced 100% mortality in less than nine days and behaved similarly in animals. Mice were also infected with viruses derived from serial passages in BHK-21 and Aag2 (deleted NSs). These mice were further challenged with the virulent parental strain and all mice were protected from the lethal infection [45].

Subpopulations generated upon infection of mammals/arthropods likely influence the outcome of infection and onward transmission. Despite this knowledge, virus quasi-species were not analysed in a mammalian host/arthropod vector in the majority of published studies. The extent of genetic variation is virus dependent. For instance, analysis of blood collected from mice inoculated with Liao ning

virus (LNV) or Banna virus (BAV) (two members of genus *Seadornavirus*) showed significantly higher sequence variations for LNV than BAV [67].

### 2.3. Genetic Variability of Tick-Borne Viruses

Studying the genetic variability of arboviruses mainly focussed on mosquito- or sandfly-borne viruses, especially those belonging to genera *Flavivirus* and *Alphavirus*. There is a lack of data for tick-borne viruses, yet the “trade-off” hypothesis was extrapolated to all arboviruses, including tick-borne viruses. While mosquitoes, sandflies and ticks do not have the same lifecycle and lifestyle, tick-borne viruses are longer associated with their vectors than mosquito- or sandfly-borne viruses, due to vector life span.

Limited studies were conducted on tick-borne viruses such as TBEV and CCHFV. In 2007, Romanova et al. [68] conducted a study on TBEV in order to compare a tick-adapted strain, variant M to a parental strain EK-328. Variant M is the result of 17 serial passages in *Hyalomma marginatum marginatum* and five passages in mouse brains. The first observed difference between the two strains was the size of plaques: EK-328 produced 7-mm plaques, whereas variant M made 1-mm plaques in majority and few 7-mm plaques (ratio 100:2). The tick-adapted strain was less virulent in mice than the parental strain and viral titers in ticks were higher for variant M after seven days post-inoculation. Furthermore, growth kinetics in PEK cells (pig embryo kidney cells) differed. The yield of variant M in cell culture supernatants was 100 times lower than from EK-328 at 22 h post-infection and did not increase at 60 h post-infection. A full genome sequencing identified fifteen nucleotide substitutions in variant M, six of which were non-synonymous (resulting in changes in protein sequences for E, prM, NS2A and NS4A). Changes in the E protein sequence correlated with the smaller plaque size. Depending on the positions impacted by amino acid changes, they were also linked to stronger or lower affinities of the virus for cellular heparan sulphate and the binding of virions to cellular glycosaminoglycans. Moreover, the neuroinvasive properties in mice have been impacted for specific substitutions in E protein [68]. A Further study was conducted with Langat virus (LGVT, a tick-borne flavivirus), during which two variants were generated. After 20 serial passages in mouse neuroblastoma (MNB) or *Ixodes scapularis* tick (ISE6) cells, variants MNBp20 and ISEp20 were, respectively, identified. Host specialisation was observed in both cell types. The full-length genome sequences of the two variants were determined in order to identify genetic changes associated with adaptation. Amino acid changes found in both viruses were identified in structural and non-structural proteins. The mouse cell adapted virus had amino acid changes in the E (E277K and Y438Y/H), NS4A (E33G) and NS4B (K164K/R) proteins. The tick cell adapted virus had substitutions in prM (K115E), NS3 (F604F/L) and NS4A (A81A/V) proteins. It was concluded that all five proteins E, prM, NS3, NS4A and NS4B are involved in host adaptation of LGTV [69].

In 2016, Han Xia et al. [31] studied how a tick vector and an animal host shape the genome plasticity of CCHFV. They showed transmission of the virus to *Hyalomma marginatum* ticks upon feeding on experimentally infected mice, as well as transstadial transmission in ticks. They also conducted a study to assess the impact of long-term association of CCHFV with ticks on the viral genome. For that purpose, they fed nymphs on infected mice and conserved them one year after they moulted into the adult stage, before RNA extraction from ticks and mice, followed by NGS sequencing. Substitutions in CCHFV genome were observed only in tick samples. In total, fourteen mutations were identified: one, four and nine in the S, M and L segments, respectively, as compared to the virus from infected mice. Specific substitutions were common in the two groups of ticks which were used in the experiment, while other substitutions in segment L were found in one-year-old ticks only. Among the fourteen substitutions, four were non-synonymous in segments M and L. In addition, CCHFV genome diversity was higher in ticks than in mice [31]. These results showed that tick vectors play a principal role in expanding the genetic variability of tick-borne viruses. To assess the “trade-off” hypothesis for CCHFV, it would have been valuable to infect mice using the adult ticks which moulted from infected nymphs.

The sequence of the resulting virus in mice would have been a source of valuable information, to prove or disprove the “trade-off” hypothesis for this tick-borne virus.

### 3. Arbovirus–Vector as a Complex System

#### 3.1. Co-Evolution between Arboviruses and Arthropod Vectors

There are different views as to whether arboviruses co-evolved or not with their arthropod vectors. Looking at genomes of arboviruses in genera where tick-borne, mosquito-borne, sandfly-borne and/or *Culicoides*-borne are encountered such as the flaviviruses or the orbiviruses, different observations are made. One of the important observations pertains to the G + C content of their genomes. For flaviviruses, the G + C content of insect-only viruses is in the range of 50–53%, that of mosquito-borne viruses is in the range of 47–53%, for tick-borne viruses it is 53–54% and for no known vector viruses (NKV) it is 43–48%, with the exception of Tamana bat virus (TABV) genome where G + C content is ~38%. As for orbiviruses, the G + C content of mosquito-borne orbiviruses ranged from 35% to 41%. The G + C content of *Culicoides*-borne viruses ranged from 40% to 45%. For tick-borne orbiviruses, the G + C content ranged from 52% to 58%. The G + C content of arthropod vector genomes is ~56% for ticks, ~39–42% for *Culicoides* and 35–38% for mosquitoes [70,71]. There are clear differences between the two genera. Regarding flaviviruses, only tick-borne viruses have a G + C content which is similar to that of their tick vectors (~57%). G + C content of insect only flaviviruses is very similar to that of tick-borne viruses and for mosquito-borne flaviviruses the G + C content is largely overlapping with that of the insect-only and tick-borne flaviviruses. This largely contrasts with orbiviruses where G + C content is very similar to that of their respective arthropod vectors. These observations and clear specialisation, among other findings, provided ground to suggest that orbivirus ancestors were arthropod viruses which coevolved with their vectors and adapted to vertebrate hosts [70].

Earlier phylogenetic studies classified flaviviruses within four groups: two mosquito-borne groups, a tick-borne group and a group where viruses are designated as non-vectorized or having no known vectors (NKV) [72]. Phylogenetic studies based on NS5 gene showed it to contain insufficient signal to corroborate a specific tree topology. Phylogenetic trees based on the NS3 protein or full polyprotein sequences do suggest that mosquito-borne flaviviruses root all other flaviviruses. They also suggest that these viruses adapted later on to tick transmission [73]. According to the gene used for building a phylogenetic tree for flaviviruses, the phylogenetic relationships between the various groups differ. Trees based on NS5 protein sequence showed that mosquito-borne viruses and tick-borne viruses are sister groups whereas trees based on NS3 protein sequence showed that tick-borne viruses and NKV are sister groups, with insect-specific flaviviruses as outgroup for both [74]. Other studies suggest that NKV flaviviruses do not form a single phylogenetic group. They suggest that possible recombination events may explain discrepancies of clustering in phylogenetic trees (based on full-length polyproteins or specific genes such as the envelope, NS3 or NS5). These studies suggested that *Yokose* (YOK), *Sokoluk* (SOK) and *Entebbe bat* (ENT) virus seem to cluster with mosquito-borne flaviviruses. The other NKV viruses either cluster with tick-borne flaviviruses (Envelope, NS3 or polyprotein trees) or are basal to mosquito and tick-borne flaviviruses (NS5 trees) [75]. It was also suggested that YOKV, SOKV and ENTV may be arboviruses instead of being NKVs and that based on usage of dinucleotide frequencies they do not seem to be specifically adapted to vertebrate hosts. Only TABV seems to be a vertebrate specific virus, having a significantly lower CpG dinucleotide frequency than insect-specific flaviviruses or arthropod/vertebrate flaviviruses [75].

Whether flaviviruses co-evolved with their arthropod vectors (i.e., originated before the split of invertebrates and vertebrates during evolution) or they have originated in one group or the other followed by co-adaptation, remains a debatable question. However, the high G + C content of most flavivirus genomes (including insect-only viruses) raises questions as to whether flaviviruses did originate in ticks or if this trait provided advantage to the dispersal of flaviviruses among various arthropod vectors. Certain insect-borne viruses are capable of infecting and replicating in tick cell lines.

Semliki Forest virus (SFV) and Venezuelan equine encephalitis virus (VEEV), two mosquito-borne alphaviruses, replicate well in tick cell lines *Rhipicephalus decoloratus* BDE/CTVM16 and *Rhipicephalus appendiculatus* RAE/CTVM1 [76,77]. The G+C content of SFV genome is ~53% and that of VEEV is ~50%. Replication of 13 flaviviruses including DENV, WNV, SLEV, yellow fever virus (YFV), TBEV, POWV, Louping ill virus (LIV), Negishi virus (NGV) and LGTV was compared in mosquito and tick cell lines. The mosquito-borne viruses replicate efficiently in mosquito cells and it was shown that WNV is capable of infecting and replicating in four tick cell lines. The tick-borne viruses replicate only in tick cell lines, except LGTV where signs of infection were observed in C6/36 [77]. A previous study using Singh's non-cloned *Ae. albopictus* cells (from which C6/36 were derived) failed to show replication of LGTV [78]. Two NKV flaviviruses were also tested in this study and none replicated in any cell line [77]. The G + C contents of DENV, SLEV and YFV are between 45% and 50%, whereas those of WNV, TBEV, POWV and LIV are up to 51%. Larvae and nymphs, but not adults, of *Amblyomma* species were shown experimentally to be susceptible for infection by WNV or SLEV [79]. These results highlight important differences between flaviviruses in terms of their capacity to potentially infect a distinct arthropod vector.

Colorado tick fever virus (CTFV) and *Eyach virus* (EYAV) are two species belonging to genus *Coltivirus* (family *Reoviridae*). Replication of CTFV or EYAV in mosquito and/or tick cell lines has been explored. CTFV was grown in *Ae. albopictus* cells over seven weeks and the titer reached  $\sim 10^6$  pfu/mL after six weeks, declining afterwards [80]. As compared to titers of the same virus grown mammalian cells ( $\sim 10^8$  pfu/mL), the difference represents approximately 99% less virus in mosquito cells. Limited replication of a EYAV-Fr578 was shown in C6/36 cells [81]. A strain of Kemerovo virus (KEMV, genus *Orbivirus*) was grown both in *Ae. albopictus* C6/36 cells and *I. ricinus* tick cells. While titers of approximately  $10^7$ – $10^8$  pfu/mL were observed in tick cells, titers of  $10^4$  or less were obtained with C6/36 (unpublished data), that is to say 99.9–99.99% less virus in mosquito cells.

In summary, the lower levels of replication of a given animal arbovirus in a heterologous cell culture system suggest that a heterologous arthropod would not act as a likely vector for that particular virus.

### 3.2. Role of Arthropods in Natural Survival and Spread of Arboviruses

Since the 1930s, several basic concepts were established for arbovirus–vector systems. Plant arbovirus associations with their competent insect vectors fall into circulative propagative, circulative non-propagative or non-circulative cycles. There are no examples of circulative non-propagative transmission of an animal arbovirus. Competent arthropod vectors of animal arboviruses ingest their blood meal and the virus replicates in arthropod cells and disseminate, reaching salivary glands to ensure transmission during the next blood meal. In addition, viruses must survive arthropods' behavioural characteristics. Indeed, according to the arthropods, the conditions are not the same if it is an insect or an acarion (e.g., ticks). Contrarily to mosquitoes that can take several blood meals at the same life stage (adult female), hard ticks feed only once before moulting, meaning that viruses must survive upon moulting into the next stage. Moreover, several months can pass between two stages [82]. The extrinsic incubation period (EIP) corresponds to the time between the ingestion of pathogens and the transmission to a next host [83]. Viruses also have to establish strategies to survive in arthropod. Tick-borne viruses need to persist in ticks, for instance by infecting tissues which do not undergo histolysis during moulting [84]. Some tick-borne viruses can also be transmitted trans-ovarially and/or trans-sexually to the next generation. Vertical transmission and transmission by co-feeding between ticks contribute to the natural survival and spread of tick-borne viruses [82].

The EIP spans the time starting with initial virus attachment to midgut cells, replication and dissemination into the arthropod. These are key phases for virus transmission, requesting the crossing of biological barriers including the gut barrier until reaching salivary glands [83]. The gut barrier, a determinant of vector competence, controls the virus both qualitatively and quantitatively and defines the permissivity of an arthropod to a given virus. In addition, the process of blood digestion is important for a successful infection of the arthropod. Ticks are heterophagous, meaning that the

first step of digestion is intracellular (midgut cells) while insects such as mosquitoes digest their blood meal in the lumen of midgut [84]. Tick gut cells were shown to be a site where Thogoto virus (family *Orthomyxoviridae*, genus *Thogotovirus*) genome segments reassort [85]. After crossing the gut, the virus replicates within. It is then released into the haemolymph circulation and is carried until the salivary glands. A new phase of replication takes place within these glands, provided that virus titers are sufficient enough in the haemolymph. A successful dissemination of the virus to key tissues of the arthropod is a parameter for studying vector competence. That was observed in CHIKV upon assessing virus fitness and vector competence of *Aedes* mosquitoes [60]. Furthermore, the concentration of ingested virus as well as ecological factors must be taken into consideration [83]. Antiviral mechanisms developed by hosts and vectors could be the source of genetic variability of viruses. Arthropod vectors developed various innate immune responses to limit or control viral infections. These responses include RNA interference (RNAi, generating short interfering RNA or siRNA), Jak-STAT (Vago), Nf- $\kappa$ B, Imd and Toll and autophagy. siRNA seems to be the most robust pathway to control virus after an infection, by degrading RNA and limiting replication [86].

One of the entomological variables which are considered for pathogen transmission is the vectorial capacity. This variable includes biotic (vectorial competence) and abiotic (geographical area, climate, population density, etc.) factors. Geographical distribution of vectors is influenced by climate change and human activities (farming, deforestation, urbanisation, international travel and trade, etc.). These parameters impact vector ecology and consequently human exposure to infection [87]. Abundance of vectors considerably impacts the emergence of a pathogen. This was observed during the CHIKV outbreak in the Indian Ocean in 2004, where the conditions were optimal (high abundance of *Ae. albopictus*) for the virus to emerge since the amino acid substitution A226V in the E1 envelope glycoprotein helped the virus to switch vector. *Aedes albopictus* has a larger geographical distribution than *Aedes aegypti*, which is almost absent in the Indian Ocean islands [88,89]. The abundance of vectors must be considered, taking into account other abiotic factors such as climate, temperature and seasonality. The emergence of specific viruses can be facilitated by optimal climate conditions and the presence of local competent vectors. The emergence of BTV in the north of Europe in summer of 2006 is a typical example, where transmission occurred by the local midge population. Other examples include ZIKV in Brazil in 2015 and DENV in India in 2015 [90]. Arboviruses and their vectors must be considered as complex systems where several parameters affect their dynamics. The genetic variability of arboviruses strongly influences this system. The genetic variability of insect-borne arboviruses has been assessed for a range of viruses. Additional focus should be placed on tick-borne viruses to bring these studies up to speed.

#### 4. Conclusions

Nowadays, vector-borne diseases are important both medically and economically. Characteristics and molecular aspects of arboviruses were identified during multiple studies aiming to assess their genetic variability and in particular the insect-borne viruses (Table 3). Viruses host-specialise in serial passages or are able to infect two distinct hosts or cell types in alternating passages. The loss or gain of fitness can be evaluated by studying different *in vitro* and *in vivo* characteristics: (i) growth kinetics (time course study of virus titers); (ii) capacity to infect distinct cell types; (iii) induction of viraemia in experimentally infected mice (strain dependent: peaking earlier or later, being lower or higher as compared to the parental strain); (iv) infection rates of arthropods; and (v) virus dissemination in arthropods (see references in Table 3). The experimental set-up influences virulence. Hence, virulence tends to decrease *in vitro* set-ups, whereas the contrary is observed *in vivo* set-ups. Sequence analyses, in particular deep sequencing, helped linking changes in virulence or fitness to specific viral genes. Virulence can be measured by evaluating morbidity/mortality rates in vertebrates. Genes and encoded proteins that are responsible for interactions between viruses and cells, particularly envelope or outer capsid proteins, accumulate mutations which allow the virus to infect efficiently one cell type or distinct vector species.

**Table 3.** Summary of all studies described in this review.

| Virus | In Vitro, In Vitro/In Vivo,<br>In Vivo | Findings  | References |
|-------|--|---|------------|
| WNV   | in vitro                               | Specialisation to a single cell type in serially passaged virus<br>Increased genetic variability after serial passages in mosquito cells as compared to mammalian-derived strain                    | [49,61]    |
| SLEV  | in vitro                               | Specialisation to a single cell type in serially passaged virus   | [49]       |
| RBCV  | in vitro                               | Adaptation to cell culture in mammalian cells at high temperature<br>Role of NS3 in host range  | [51]       |
| DENV  | in vitro                               | Lower number of substitutions in mosquito-cell serially passaged virus as compared to alternated virus  | [58,59]    |
| ZIKV  | in vitro                               | Substitutions in envelop protein that give benefits for replication in a cell type  | [50]       |
| TBEV  | in vivo                                | Tick-adapted strain less virulent in mice than the parental strain<br>Mutations in E, prM, NS2A and NS4A—a role of E protein in fitness   | [68]       |
| LGVT  | In vitro                               | Specialisation to a single cell type in serially passaged virus<br>Mutations in E, prM, NS3, NS4A and NS4B—a role of these proteins in host adaptation  | [69]       |
| EEEV  | in vitro                               | Specialisation to a single cell type in serially passaged virus<br>Same characteristics as parental strain in alternated passages   | [46,54]    |
| VEEV  | in vitro                               | Specialisation to a single cell type in serially passaged virus—Increased binding efficiency to mammalian cells   | [48]       |
| SINV  | in vivo                                | Host specialisation following serial passages in mammals  |            |
| CHIKV | in vitro                               | Faster growth kinetics in single cell type<br>Specialisation to a single cell type of serially passaged virus<br>Same characteristics as parental strain in alternated passages                     | [47]       |
| RRV   | in vitro                               | Fewer amino acid substitutions in invertebrate cells than in mammalian cells and alternation of cells   | [52,60]    |
|       | in vitro                               | Decreased virulence following serial passages   | [66]       |
|       | in vivo                                | Increased virulence following serial passages   |            |
| RVFV  | in vitro                               | Specialisation to a single cell type and decreased virulence following serial passages<br>Faster growth kinetics in the same cell type  | [45]       |
|       | in vitro/in vivo                       | Mammalian-cell adapted strain less virulent in mice than parental and alternated strains  |            |
| VSV   | in vitro                               | Decreased virulence following serial passages<br>Decreased fitness in serial passages in arthropod cells and alternating passages<br>Increased fitness following serial passages in mammalian cells | [53]       |
| BTV   | in vitro                               | Decreased virulence in serially passaged virus<br>Increased genetic diversity in arthropod cells  | [55,57,63] |
| CCHFV | in vivo                                | Substitutions in viral genome observed only in tick samples<br>Genetic variability higher in ticks than in mice   | [31]       |

Several studies of the genetic variability have been conducted with mosquito- or sandfly-borne viruses in order to understand their capacity to emerge and potentially adapt to new hosts, notably by generating virus quasi-species. The latter are produced and compartmentalised into different tissues/organs of the infected subject. Quasi-species should be taken into account upon studies focussing on characterisation of genetic diversity, as important drivers predicting virus emergence

(see references Table 3). Alternating host transmission cycle may constrain arbovirus evolution as suggested by the “trade-off” hypothesis. However, this hypothesis was extrapolated to all animal arboviruses including tick-borne viruses where there is a paucity of information regarding genetic variability. Insects and ticks do not have the same life cycle and behavioural characteristics and viruses might not be exposed to the same pressure depending on the arthropods they infect. In total, 170 tick-borne viruses were identified so far and they are understudied compared to insect borne viruses. During the last few decades, we faced tick-borne virus emergence and it is necessary to understand and anticipate such an emergence. Strategies have been developed to study mosquito- or sandfly-borne viruses. These strategies are useful to build on and study the genetic variability of tick-borne viruses. They will be useful to attempt identifying genes or genetic elements, which are essential for replication in both vectors and hosts and which potentially drive virus emergence into new geographic areas.

**Author Contributions:** Conceptualisation, C.V.M., S.M., and H.A.; writing—original draft preparation, C.V.M.; writing—review and editing, S.M. and H.A.; and funding acquisition, S.M. and H.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** C.V.M.’s Ph.D is supported by a grant from the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES, Cofunding Grant No. PHD2018-2021) and the French Ministry for agriculture & food (DGER, Cofunding Grant No. PHD2018-2021). S.M.’s research is supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES). H.A.’s research is supported by the National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE). H.A. also acknowledges support from the EU H2020 PALE-Blu project, grant number 727393.

**Acknowledgments:** We thank the “Tiques et Maladies à Tiques (TMT)” group of the CNRS “Réseau Ecologie 473 des Interactions Durables” for stimulating discussions and support. UMR BIPAR and UMR Virologie are members of the French Government’s “Investissement d’Avenir” program, Laboratoire d’Excellence “Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases” (Grant No. ANR-10-LABX-62-IBEID).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. World Health Organization. *A Global Brief on Vector-Borne Diseases*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2014; Volume 11.
2. World Health Organization. *World Malaria Report*; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2009.
3. Rushton, J.; Lyons, N. Economic impact of Bluetongue: A review of the effects on production. *Vet. Ital.* **2015**, *51*, 401–406. [CrossRef] [PubMed]
4. Gould, E.A.; Pettersson, J.; Higgs, S.; Charrel, R.; de Lamballerie, X. Emerging arboviruses: Why today? *One Health* **2017**, *4*, 1–13. [CrossRef] [PubMed]
5. Gould, E.A.; Higgs, S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **2009**, *103*, 109–121. [CrossRef] [PubMed]
6. Bonnet, S.; Huber, K.; Joncour, G.; René-Martellet, M.; Stachurski, F.; Zenner, L. Biologie des tiques. In *Tiques et Maladies à Tiques*; IRD: Marseille, France, 2015; pp. 53–84.
7. Jongejans, F.; Uilenberg, G. The Global Importance of ticks. *Parasitology* **2004**, *129*, 3–14. [CrossRef]
8. Bonnet, S.; George, J.-C.; Boulanger, N. L’interface tique-hôte et la transmission des pathogènes. In *Tiques et Maladies à Tiques*; IRD: Marseille, France, 2015; pp. 165–191.
9. Moutailler, S.; George, J.-C.; Hansmann, Y.; Degeilh, B.; Joncour, G.; Jourdain, E.; Malandrin, L.; Umhang, G.; Vayssier-Taussat, M.; Vial, L.; et al. Principales maladies transmises par les tiques: Épidémiologie, clinique et diagnostic. In *Tiques et Maladies à Tiques*; IRD: Marseille, France, 2015; pp. 193–238.
10. Labuda, M.; Nuttall, P.A. Tick-Borne Viruses. *Parasitology* **2004**, 221–245. [CrossRef]
11. Shi, J.; Hu, Z.; Deng, F.; Shen, S. Tick-Borne Viruses. *Viol. Sin.* **2018**, *33*, 21–43. [CrossRef]
12. Mansfield, K.L.; Jizhou, L.; Phipps, L.P.; Johnson, N. Emerging Tick-Borne Viruses in the Twenty-First Century. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*. [CrossRef] [PubMed]
13. CDC Tickborne Diseases Abroad. Available online: <https://www.cdc.gov/ticks/diseases/abroad.html> (accessed on 11 July 2019).

14. Mandl, C.W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.* **2005**, *111*, 161–174. [[CrossRef](#)]
15. Valarcher, J.F.; Häggglund, S.; Juremalm, M.; Blomqvist, G. Tick-borne encephalitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **2015**, *34*, 453–466. [[CrossRef](#)]
16. Kaiser, R. Frühsommermeningoenzephalitis. *Nervenarzt* **2016**, *87*, 667–680. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Hermance, M.E.; Thangamani, S. Powassan Virus: An Emerging Arbovirus of Public Health Concern in North America. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2017**, *17*, 453–462. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Krow-Lucal, E.R.; Lindsey, N.P.; Fischer, M.; Hills, S.L. Powassan Virus Disease in the United States, 2006–2016. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **2018**, *18*, 286–290. [[CrossRef](#)]
19. Růžek, D.; Yakimenko, V.V.; Karan, L.S.; Tkachev, S.E. Omsk haemorrhagic fever. *Lancet* **2010**, *376*, 2104–2113. [[CrossRef](#)]
20. Wang, Z.-D.; Wang, B.; Wei, F.; Han, S.-Z. A New Segmented Virus Associated with Human Febrile Illness in China. *N. Engl. J. Med.* **2019**, *380*, 2116–2125. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Kuivanen, S.; Levanov, L.; Kareinen, L.; Sironen, T.; Jääskeläinen, A.J.; Plyusnin, I.; Zakhm, F.; Emmerich, P.; Schmidt-Chanasit, J.; Hepojoki, J.; et al. Detection of novel tick-borne pathogen, Alongshan virus, in Ixodes ricinus ticks, south-eastern Finland, 2019. *Eurosurveillance* **2019**, *24*, 1–8. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Kholodilov, I.S.; Litov, A.G.; Klimentov, A.S.; Belova, O.A.; Polienko, A.E.; Nikitin, N.A.; Shchetinin, A.M.; Ivannikova, A.Y.; Bell-Sakyi, L.; Yakovlev, A.S.; et al. Isolation and characterisation of Alongshan virus in Russia. *Viruses* **2020**, *12*, 362. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Attoui, H.; Jaafar, F.M.; De Micco, P.; De Lamballerie, X. Coltiviruses and Seadornaviruses in North America, Europe, and Asia. *Emerg. Infect. Dis.* **2005**, *11*, 1673–1679. [[CrossRef](#)]
24. Marfin, A.A.; Staples, J.E.; Stallones, L.; Brackney, M.M.; Keefe, T.; Iv, W.C.B.; Campbell, G.L. Epidemiology of Colorado Tick Fever in Montana, Utah, and Wyoming, 1995–2003. *Vector Borne Zoonotic Dis.* **2010**, *10*, 381–385. [[CrossRef](#)]
25. Savage, H.M.; Godsey, M.S.; Panella, N.A.; Burkhalter, K.L.; Manford, J.; Trevino-Garrison, I.C.; Straily, A.; Wilson, S.; Bowen, J.; Raghavan, R.K. Surveillance for tick-borne viruses near the location of a fatal human case of bourbon virus (Family Orthomyxoviridae: Genus Thogotovirus) in Eastern Kansas, 2015. *J. Med. Entomol.* **2018**, *55*, 701–705. [[CrossRef](#)]
26. Savage, H.M.; Burkhalter, K.L.; Godsey, M.S.; Panella, N.A.; Ashley, D.C.; Nicholson, W.L.; Lambert, A.J. Bourbon virus in field-collected ticks, Missouri, USA. *Emerg. Infect. Dis.* **2017**, *23*, 2017–2022. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Brault, A.C.; Savage, H.M.; Duggal, N.K.; Eisen, R.J.; Staples, J.E. Heartland virus epidemiology, vector association, and disease potential. *Viruses* **2018**, *10*, 498. [[CrossRef](#)]
28. Marczinke, B.I.; Nichol, S.T. Nairobi sheep disease virus, an important tick-borne pathogen of sheep and goats in Africa, is also present in Asia. *Virology* **2002**, *303*, 146–151. [[CrossRef](#)]
29. Davies, F.G.; Casals, J.; Jesset, D.M.; Ochieng, P. The serological relationships of Nairobi sheep disease virus. *J. Comp. Pathol.* **1978**, *88*, 519–523. [[CrossRef](#)]
30. Hawman, D.W.; Feldmann, H. Recent advances in understanding Crimean–Congo hemorrhagic fever virus. *F1000Research* **2018**, *7*, 1715. [[CrossRef](#)]
31. Xia, H.; Beck, A.S.; Gargili, A.; Forrester, N.; Barrett, A.D.T.; Bente, D.A. Transstadial Transmission and Long-term Association of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks Shapes Genome Plasticity. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–12. [[CrossRef](#)]
32. Shayan, S.; Bokaeian, M.; Ranjvar Shahrivar, M.; Chinikar, S. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Lab Med.* **2015**, *46*, 180–189. [[CrossRef](#)]
33. Galindo, I.; Alonso, C. African swine fever virus: A review. *Viruses* **2017**, *9*, 103. [[CrossRef](#)]
34. Kuno, G.; Mackenzie, J.S.; Junglen, S.; Hubálek, Z.; Plyusnin, A.; Gubler, D.J. Vertebrate reservoirs of arboviruses: Myth, synonym of amplifier, or reality? *Viruses* **2017**, *9*, 185. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Wilson, A.J.; Mellor, P.S. Bluetongue in Europe: Past, present and future. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2009**, *364*, 2669–2681. [[CrossRef](#)]
36. Drake, J.W. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *90*, 4171–4175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Domingo, E.; Perales, C. Quasispecies and virus. *Eur. Biophys. J.* **2018**, *47*, 443–457. [[CrossRef](#)]

38. Domingo, E.; Sheldon, J.; Perales, C. Viral Quasispecies Evolution. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **2012**, *76*, 159–216. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Forrester, N.L.; Guerbois, M.; Seymour, R.L.; Spratt, H.; Weaver, S.C. Vector-Borne Transmission Imposes a Severe Bottleneck on an RNA Virus Population. *PLoS Pathog.* **2012**, *8*. [[CrossRef](#)]
40. Forrester, N.L.; Coffey, L.L.; Weaver, S.C. Arboviral bottlenecks and challenges to maintaining diversity and fitness during mosquito transmission. *Viruses* **2014**, *6*, 3991–4004. [[CrossRef](#)]
41. Li, H.; Roossinck, M.J. Genetic Bottlenecks Reduce Population Variation in an Experimental RNA Virus Population. *J. Virol.* **2004**, *78*, 10582–10587. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Manrubia, S.C.; Escarmís, C.; Domingo, E.; Lázaro, E. High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. *Gene* **2005**, *347*, 273–282. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Kurosu, T. Quasispecies of dengue virus. *Trop. Med. Health* **2011**, *39*, S29–S36. [[CrossRef](#)]
44. Chatterjee, P.K.; Vashishtha, M.; Kielian, M. Biochemical Consequences of a Mutation That Controls the Cholesterol Dependence of Semliki Forest Virus Fusion. *J. Virol.* **2000**, *74*, 1623–1631. [[CrossRef](#)]
45. Moutailler, S.; Roche, B.; Thiberge, J.M.; Caro, V.; Rougeon, F.; Failloux, A.B. Host alternation is necessary to maintain the genome stability of Rift Valley fever virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2011**, *5*. [[CrossRef](#)]
46. Weaver, S.C.; Brault, A.C.; Kang, W.; Holland, J.J. Genetic and Fitness Changes Accompanying Adaptation of an Arbovirus to Vertebrate and Invertebrate Cells. *J. Virol.* **1999**, *73*, 4316–4326. [[CrossRef](#)]
47. Greene, I.P.; Wang, E.; Deardorff, E.R.; Milleron, R.; Domingo, E.; Weaver, S.C. Effect of Alternating Passage on Adaptation of Sindbis Virus to Vertebrate and Invertebrate Cells. *J. Virol.* **2005**, *79*, 14253–14260. [[CrossRef](#)]
48. Coffey, L.L.; Vasilakis, N.; Brault, A.C.; Powers, A.M.; Tripet, F.; Weaver, S.C. Arbovirus evolution in vivo is constrained by host alternation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 6970–6975. [[CrossRef](#)]
49. Ciota, A.T.; Lovelace, A.O.; Ngo, K.A.; Le, A.N.; Maffei, J.G.; Franke, M.A.; Payne, A.F.; Jones, S.A.; Kauffman, E.B.; Kramer, L.D. Cell-specific adaptation of two flaviviruses following serial passage in mosquito cell culture. *Virology* **2007**, *357*, 165–174. [[CrossRef](#)]
50. Setoh, Y.X.; Amarilla, A.A.; Peng, N.Y.G.; Griffiths, R.E.; Carrera, J.; Freney, M.E.; Khromykh, A.A. Determinants of Zika virus host tropism uncovered by deep mutational scanning. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 876–887. [[CrossRef](#)]
51. Ngo, K.A.; Rose, J.T.; Kramer, L.D.; Ciota, A.T. Adaptation of Rabensburg virus (RBGV) to vertebrate hosts by experimental evolution. *Virology* **2019**, *528*, 30–36. [[CrossRef](#)]
52. Coffey, L.L.; Vignuzzi, M. Host Alternation of Chikungunya Virus Increases Fitness while Restricting Population Diversity and Adaptability to Novel Selective Pressures. *J. Virol.* **2011**, *85*, 1025–1035. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Zárate, S.; Novella, I.S. Vesicular Stomatitis Virus Evolution during Alternation between Persistent Infection in Insect Cells and Acute Infection in Mammalian Cells Is Dominated by the Persistence Phase. *J. Virol.* **2004**, *78*, 12236–12242. [[CrossRef](#)]
54. Cooper, L.A.; Scott, T.W. Differential evolution of eastern equine encephalitis virus populations in response to host cell type. *Genetics* **2001**, *157*, 1403–1412.
55. Alexander, R.A.; Haig, D.A.; Adelaar, T.F. The Attenuation of Bluetongue Virus by Serial Passage through Fertile Eggs. *Onderstepoort J. Vet. Sci. Anim. Ind.* **1947**, *21*, 231–241.
56. Neitz, W.O. Immunological studies on bluetongue in sheep. *Onderstepoort J. Vet. Res.* **1948**, *23*, 93–136.
57. Franchi, P.; Mercante, M.T.; Ronchi, G.F.; Armillotta, G.; Ulisse, S.; Molini, U.; Di Ventura, M.; Lelli, R.; Savini, G.; Pini, A. Laboratory tests for evaluating the level of attenuation of bluetongue virus. *J. Virol. Methods* **2008**, *153*, 263–265. [[CrossRef](#)]
58. Vasilakis, N.; Deardorff, E.R.; Kenney, J.L.; Rossi, S.L.; Hanley, K.A.; Weaver, S.C. Mosquitoes put the brake on arbovirus evolution: Experimental evolution reveals slower mutation accumulation in mosquito than vertebrate cells. *PLoS Pathog.* **2009**, *5*. [[CrossRef](#)]
59. Lin, S.; Hsieh, S.; Yueh, Y.; Lin, T.; Chao, D.; Chen, W.; King, C.; Wang, W. Study of sequence variation of dengue type 3 virus in naturally infected mosquitoes and human hosts: Implications for transmission and evolution. *J. Virol.* **2004**, *78*, 12717–12721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Arias-Goeta, C.; Moutailler, S.; Mousson, L.; Zouache, K.; Thiberge, J.M.; Caro, V.; Rougeon, F.; Failloux, A.B. Chikungunya virus adaptation to a mosquito vector correlates with only few point mutations in the viral envelope glycoprotein. *Infect. Genet. Evol.* **2014**, *24*, 116–126. [[CrossRef](#)]

61. Ciota, A.T.; Ngo, K.A.; Lovelace, A.O.; Payne, A.F.; Zhou, Y.; Shi, P.; Kramer, L.D. Role of the mutant spectrum in adaptation and replication of West Nile virus. *J. Gen. Virol.* **2007**, *88*, 865–874. [[CrossRef](#)]
62. Kopanke, J.H.; Lee, J.S.; Stenglein, M.D.; Mayo, C.E. The genetic diversification of a single bluetongue virus strain using an in vitro model of alternating-host transmission. *Viruses* **2020**, *12*, 1038. [[CrossRef](#)]
63. Lean, F.Z.X.; Neave, M.J.; White, J.R.; Payne, J.; Eastwood, T.; Bergfeld, J.; Di Rubbo, A.; Stevens, V.; Davies, K.R.; Devlin, J.; et al. Attenuation of bluetongue virus (BTV) in an in ovo model is related to the changes of viral genetic diversity of cell-culture passaged BTV. *Viruses* **2019**, *11*, 481. [[CrossRef](#)]
64. Vignuzzi, M.; López, C.B. Defective viral genomes are key drivers of the virus–host interaction. *Nat. Microbiol.* **2019**, *4*, 1075–1087. [[CrossRef](#)]
65. Spindler, K.; Horodyski, F.; Holland, J.J. High multiplicities of infection favor rapid and random evolution of vesicular stomatitis virus. *Virology* **1982**, *119*, 96–108. [[CrossRef](#)]
66. Taylor, W.P.; Marshall, I.D. Adaptation studies with Ross River virus: Laboratory mice and cell cultures. *J. Gen. Virol.* **1975**, *28*, 59–72. [[CrossRef](#)]
67. Attoui, H.; Jaafar, F.M.; Belhouchet, M.; Tao, S.; Chen, B.; Liang, G.; Tesh, R.B.; de Micco, P.; de Lamballerie, X. Liao ning virus, a new Chinese seadornavirus that replicates in transformed and embryonic mammalian cells. *J. Gen. Virol.* **2006**, *87*, 199–208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Romanova, L.I.; Gmyl, A.P.; Dzhivanian, T.I.; Bakhmutov, D.V.; Lukashev, A.N.; Gmyl, L.V.; Romyantsev, A.A.; Burenkova, L.A.; Lashkevich, V.A.; Karganova, G.G. Microevolution of tick-borne encephalitis virus in course of host alternation. *Virology* **2007**, *362*, 75–84. [[CrossRef](#)]
69. Mitzel, D.N.; Best, S.M.; Masnick, M.F.; Porcella, S.F.; Wolfenbarger, J.B.; Bloom, M.E. Identification of genetic determinants of a tick-borne flavivirus associated with host-specific adaptation and pathogenicity. *Virology* **2008**, *381*, 268–276. [[CrossRef](#)]
70. Mohd Jaafar, F.; Belhouchet, M.; Belaganahalli, M.; Tesh, R.B.; Mertens, P.P.C.; Attoui, H. Full-genome characterisation of orungo, lebombo and changuinola viruses provides evidence for co-evolution of orbiviruses with their arthropod vectors. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86392. [[CrossRef](#)]
71. Belaganahalli, M.N.; Maan, S.; Maan, N.S.; Brownlie, J.; Tesh, R.; Attoui, H.; Mertens, P.P.C. Genetic characterization of the tick-borne orbiviruses. *Viruses* **2015**, *7*, 2185–2209. [[CrossRef](#)]
72. Gould, E.A.; de Lamballerie, X.; Zanutto, P.; Holmes, E.C. Origins, evolution, and vector/host coadaptations within the genus *Flavivirus*. *Adv. Virus Res.* **2003**, *59*, 277–314.
73. Cook, S.; Holmes, E.C. A multigene analysis of the phylogenetic relationships among the flaviviruses (Family: Flaviviridae) and the evolution of vector transmission. *Arch. Virol.* **2006**, *151*, 309–325. [[CrossRef](#)]
74. Billoir, F.; De Chesse, R.; Tolou, H.; De Micco, P.; Gould, E.A.; De Lamballerie, X. Phylogeny of the genus *Flavivirus* using complete coding sequences of arthropod-borne viruses and viruses with no known vector. *J. Gen. Virol.* **2000**, *81*, 781–790. [[CrossRef](#)]
75. Blitvich, B.J.; Firth, A.E. A review of flaviviruses that have no known arthropod vector. *Viruses* **2017**, *9*, 154. [[CrossRef](#)]
76. Bell-Sakyi, L.; Weisheit, S.; Rückert, C.; Barry, G.; Fazakerley, J.; Fragkoudis, R. Microscopic visualisation of zoonotic arbovirus replication in tick cell and organ cultures using Semliki Forest virus reporter systems. *Vet. Sci.* **2016**, *3*, 28. [[CrossRef](#)]
77. Lawrie, C.H.; Uzcátegui, N.Y.; Armesto, M.; Bell-Sakyi, L.; Gould, E.A. Susceptibility of mosquito and tick cell lines to infection with various flaviviruses. *Med. Vet. Entomol.* **2004**, *18*, 268–274. [[CrossRef](#)]
78. Singh, K.R. Growth of arboviruses in arthropod tissue culture. *Adv. Virus Res.* **1972**, *17*, 187–206. [[CrossRef](#)]
79. Flores, F.S.; Zanutto, C.; Guglielmo, A.A.; Duarte dos Santos, C.N.; Labruna, M.B.; Diaz, A. Vector competence for West Nile virus and St. Louis encephalitis virus (flavivirus) of three tick species of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae). *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **2019**, *100*, 1230–1235. [[CrossRef](#)]
80. Yunker, C.E.; Cory, J. Colorado Tick Fever Virus: Growth in a Mosquito Cell Line. *J. Virol.* **1969**, *3*, 631–632. [[CrossRef](#)]
81. Attoui, H. Etude biologique et moléculaire du genre *Coltivirus*. Ph.D. Thesis, Université de la Méditerranée, Marseille, France, 1998.
82. Gargili, A.; Estrada-Peña, A.; Spengler, J.R.; Lukashev, A.; Nuttall, P.A.; Bente, D.A. The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies. *Antiviral Res.* **2017**, *144*, 93–119. [[CrossRef](#)]
83. Rodhain, F. Le fonctionnement des systèmes virus-vecteurs. *Ann. Soc. Belg. Med. Trop.* **1991**, *71*, 189–199.

84. Nuttall, P.A.; Jones, L.D.; Labuda, M.; Kaufman, W.R. Adaptations of arboviruses to ticks. *J. Med. Entomol.* **1994**, *31*, 1–9. [[CrossRef](#)]
85. Davies, C.R.; Jones, L.D.; Green, B.M.; Nuttall, P.A. In vivo reassortment of Thogoto virus (a tick-borne influenza-like virus) following oral infection of *Rhipicephalus appendiculatus* ticks. *J. Gen. Virol.* **1987**, *68*, 2331–2338. [[CrossRef](#)]
86. Kingsolver, M.B.; Huang, Z.; Hardy, R.W. Insect antiviral innate immunity: Pathways, effectors, and connections. *J. Mol. Biol.* **2013**, *425*, 4921–4936. [[CrossRef](#)]
87. Campbell-Lendrum, D.; Manga, L.; Bagayoko, M.; Sommerfeld, J. Climate change and vector-borne diseases: What are the implications for public health research and policy? *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2015**, *370*, 1–8. [[CrossRef](#)]
88. Tssetsarkin, K.A.; Vanlandingham, D.L.; McGee, C.E.; Higgs, S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathog.* **2007**, *3*, 1895–1906. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Tssetsarkin, K.A.; Weaver, S.C. Sequential adaptive mutations enhance efficient vector switching by chikungunya virus and its epidemic emergence. *PLoS Pathog.* **2011**, *7*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Caminade, C.; Turner, J.; Metelmann, S.; Hesson, J.C.; Blagrove, M.S.C.; Solomon, T.; Morse, A.P.; Baylis, M. Global risk model for vector-borne transmission of Zika virus reveals the role of El Niño 2015. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2017**, *114*, 119–124. [[CrossRef](#)]

**Publisher’s Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 4 Le virus Kemerovo

Le virus Kemerovo (KEMV) est un virus transmis par les tiques. Il appartient au genre *Orbivirus* au sein de la sous-famille *Sedoreovirinae* et de la famille *Reoviridae*. Il a été découvert en 1962 dans la région Kemerovo en Russie au cours d'une expédition menée par l'académicien Mikhail Petrovich Chumakov et réunissant 86 scientifiques soviets et 6 tchécoslovaques. Cette expédition avait pour but de collecter des tiques *Ixodes persulcatus* et du sang de personnes ayant été piqués par des tiques en vue d'un dépistage virologique de masse dans la Sibérie de l'ouest (Chumakov 1963). Les premières souches de KEMV ont été isolées par Libikova *et al.* à partir de broyats de femelles *I. persulcatus* collectées dans les villages de Romanovka et Kuchum, dans la région Kemerovo (Libikova, Tesarova, and Rajcani 1970). KEMV a également été isolé à partir de patients présentant chacun une encéphalite (Shapoval *et al.* 1964). Plus tard, plus de 20 souches ont ensuite été isolées à partir de tiques *I. persulcatus*, de patients avec une encéphalite ou de personnes asymptomatiques ayant été piquées par des tiques (Semashko 1971).

### 4.1 La famille *Reoviridae* et les genres associés

#### 4.1.1 La famille *Reoviridae*

Les virus appartenant à la famille des *Reoviridae* sont des virus non enveloppés. La particule virale est composée d'un core entouré d'une capsid externe. Les particules virales mesurent entre 65 et 80 nm de diamètre et présentent une symétrie icosaédrique. Leurs génomes comportent entre 9 et 12 segments d'ARN double brin (ARNdb). Le génome est contenu dans le core, qui empêche tout contact entre l'ARNdb et le cytosol. Au sein du core, un complexe répliatif est composé d'enzymes qui assurent la transcription des ARN, le coiffage des ARN ou encore la réplication de l'ARNdb. Les ARN transcrits sont exportés dans le cytoplasme. Les ARN messagers générés sont coiffés et non polyadénylés. Le cycle de réplication virale s'effectue dans le cytoplasme des cellules infectées (Dermody, Parker, and Sherry 2013).

Neuf familles virales contiennent des virus à ARNdb, la famille des *Reoviridae* en est la plus grande et la plus diverse. En effet, quinze genres viraux y sont décrits et répartis, selon leur morphologie, dans deux sous-familles : *Sedoreovirinae* et *Spinareovirinae*. Les particules virales sont icosaédriques. La sous-famille des *Sedoreovirinae* regroupe les virus dont la surface du core est décrite comme « lisse ou smooth » et sont de forme plutôt sphérique (*Cardoreovirus*, *Mimoreovirus*, *Orbivirus*, *Phytoreovirus*, *Rotavirus*, *Seadornavirus*) (figure 20A). Les virus présentant à leur surface des tourelles (ou turrets) localisées au niveau des 12 sommets de l'icosaèdre sont classés dans la sous-famille des *Spinareovirinae* (*Aquareovirus*, *Coltivirus*, *Cypovirus*, *Dinovernavirus*, *Fijivirus*, *Idnoreovirus*, *Mycoreovirus*,

*Orthoreovirus, Oryza*) (figure 20B) (H. Attoui et al. 2012) (Dermody, Parker, and Sherry 2013). Le core des virus lisses est constitué de deux couches protéiques. La plus en interne présente une symétrie dite T2 tandis que la seconde, plus en externe, a une symétrie en T13. Lors de l'internalisation, la capsid externe est clivée par des enzymes protéolytiques au sein de l'endosome, libérant ainsi un core transcriptionnellement actif. Au sein du core des *Sedoreovirinae*, le complexe de réplication se situe au niveau de la surface interne et est composé de l'ARN polymérase ARN dépendante (RdRp), NTPase et guanylyltransférase. Le core est recouvert par une autre couche constituée de 2-3 autres protéines, qui forment la capsid externe (H. Attoui et al. 2012)(Dermody, Parker, and Sherry 2013).

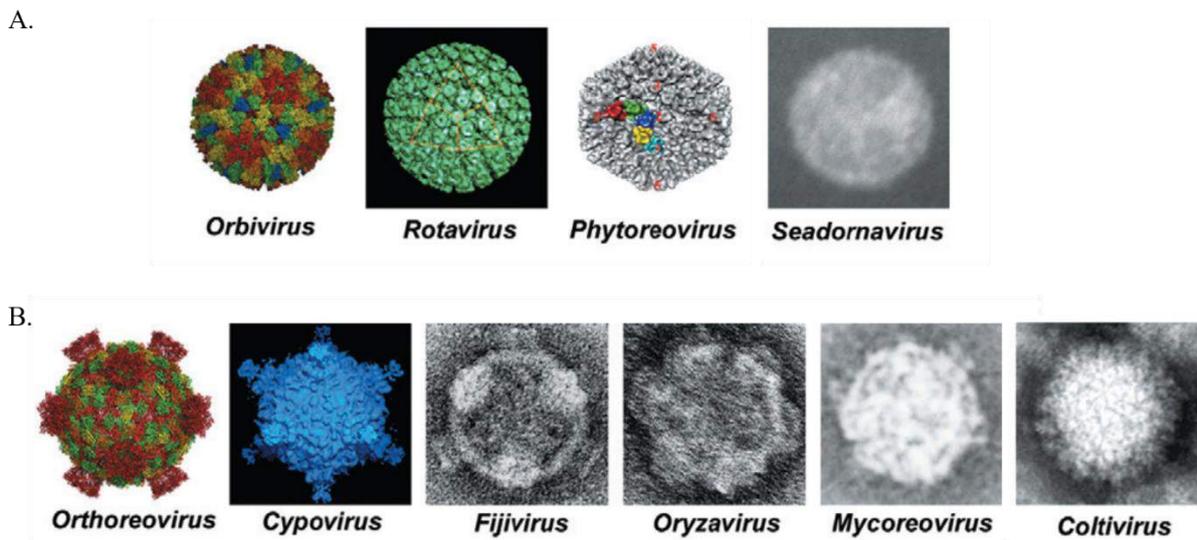


Figure 20: Comparaison morphologique des cores viraux au sein de la famille des *Reoviridae*, sous-famille des *Sedoreovirinae* (A) et sous-famille des *Spinareovirinae* (B), à partir de (H. Attoui et al. 2012)

La famille des *Reoviridae* est l'une des familles virales qui abrite le plus d'arbovirus avec des vecteurs très variés et ayant un impact en santé humaine, animale mais également végétale. Sur les 15 genres viraux, six genres contiennent des arbovirus. Parmi ces genres les fijivirus, les oryzavirus et les phytoreovirus alternent leurs cycles entre les insectes et les plantes tandis que d'autres alternent entre des hôtes vertébrés et arthropodes (les orbivirus, les seadornavirus et les coltivirus). Trois genres au sein de la famille *Reoviridae* regroupent des virus qui ont pour seuls hôtes des insectes, c'est le cas pour les cypovirus, dinovernavirus et les idnoreovirus qui se transmettent verticalement (H. Attoui et al. 2012) (Dermody, Parker, and Sherry 2013).

#### 4.1.2 La sous-famille *Sedoreovirinae*

- Le genre *Seadornavirus*

Les virus appartenant au genre *Seadornavirus* ont un génome composé de 12 segments d'ARNdb et sont vectorisés par les moustiques des genres *Culex*, *Anopheles* et *Aedes*. L'espèce type de ce genre est le virus *Banna* (BAV). Deux autres virus y sont classés : *Kadipiro* (KDV) et *Liao ning* (LNV). L'électrophérotypage sur gel d'agarose à 1% de ces 3 virus est différent. Les segments d'ARNdb de BAV, KDV et LNV migrent, respectivement, en groupe de 6-6, 6-5-1 et 6-2-3-1 (figure 21). Ces profils sont caractéristiques de chaque espèce virale (H. Attoui et al. 2012). BAV a été isolé pour la première fois en Chine en 1987 à partir de sérum et de liquide cébrospinal de patients présentant des troubles neurologiques (Xu et al. 1990)(Chen and Tao 1996).

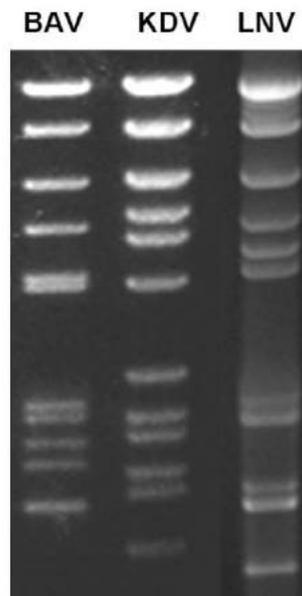


Figure 21: Electrophérotypes sur gel d'agarose à 1% de BAV, KVD et LNV (H. Attoui et al. 2012)

- Le genre *Orbivirus*

Le genre *Orbivirus* regroupe des virus transmis essentiellement par des vecteurs arthropodes (moustiques, tiques, phlébotomes et moucheron de genre *Culicoides*). Le genre regroupe 22 espèces virales (nommées aussi sérogroupes). Au sein des espèces, des sérotypes se distinguent par séroneutralisation. La notion de sérotype repose sur la protéine de la capsid externe qui interagit avec les récepteurs cellulaires et représente aussi la cible des anticorps neutralisants. La séquence de cette protéine varie entre isolats d'un même sérotype (32% pour le BTV par exemple) et entre sérotypes (28.5-59.5% pour le BTV) (N. S. Maan et al. 2012).

Les orbivirus peuvent infecter un large panel d'hôtes vertébrés tels que les ruminants domestiques et sauvages, les équidés, les rongeurs, les chauves-souris, les marsupiaux, les oiseaux, les paresseux, les primates, les humains (Roy 2013b) et les reptiles (Tomazatos et al. 2020). Le virus de la fièvre catarrhale ovine (FCO ou BTV – bluetongue virus) est l'espèce type de ce genre. Il est transmis par les *Culicoides*, des petits diptères piqueurs de la famille des *Ceratopogonidae*. Les arboviroses dues à des orbivirus ont principalement des impacts conséquents en santé animale. Le BTV occasionne des taux de mortalité et de morbidité très élevés dans les élevages ovins. Les formes cliniques du BTV sont variables, elles se déclinent de la forme asymptomatique à la forme suraigüe (Erasmus 1975). Chez les ovins, le premier signe clinique visible est une hyperthermie. Ensuite, les muqueuses buccales, gingivales et nasales apparaissent hyperhémées et congestionnées. Une conjonctivite, des larmoiements, mais aussi un œdème de la face et des lèvres peut apparaître à ce stade. La maladie peut évoluer et présenter des symptômes plus sévères, tel que l'apparition de jetage nasal d'abord séreux puis muco-purulent, parfois hémorragique. Des œdèmes peuvent également apparaître au niveau des lèvres et de la partie inférieure de la mâchoire. Dans certains cas, la langue est très gonflée et cyanosée d'où le nom « bluetongue » ou « maladie de la langue bleue » (Erasmus 1975)(A. J. Wilson and Mellor 2009). Des ruminants sauvages sont également touchés par des infections aux orbivirus tels que le virus de la maladie hémorragique des cervidés (ou EHDV : Epizootic haemorrhagic disease virus). La santé des équidés est également impactée par le virus de l'encéphalose équine (EEV : equine encephalosis virus) et le virus de la peste équine (AHSV : African Horse sickness virus)(MacLachlan and Guthrie 2010). Le BTV et l'AHSV constituent des arboviroses majeures du genre *Orbivirus* et sont inscrites sur la listes des maladies à déclaration obligatoire (OIE 2019b).

Les orbivirus ont également le plus large panel de vecteurs possibles au sein d'un même genre. En effet, les vecteurs concernés sont les moucheron piqueurs du genre *Culicoides*, les tiques molles et dures, les phlébotomes et les moustiques des genres *Culex*, *Aedes* et *Anopheles*. Les études phylogénétiques des orbivirus montrent que les virus forment des clusters regroupant des virus transmis par un même groupe de vecteur (figure 22A). Le G+C% des génomes des orbivirus varie entre 35 et 58%. Le G+C% d'un groupe d'orbivirus est très proche de celui du vecteur arthropode. Le G+C% des orbivirus transmis par les moustiques est compris entre 35 et 41% et celui de ceux transmis par les *Culocoides* est entre 40 et 45%. Il est situé entre 52 et 58% pour les virus à tiques. Par similarité, les G+C% des moustiques, des *Culicoides* et des tiques sont, respectivement, d'environ 35-38%, 39-42% et 56% (Mohd Jaafar, Belhouchet, Belaganahalli, et al. 2014)(Belaganahalli et al. 2015). Des études suggèrent une coévolution des orbivirus avec leurs vecteurs et une adaptation aux hôtes vertébrés (figure 22B). Depuis 2008, plusieurs sérotypes de BTV qui ne se répliquent plus dans le vecteur arthropode ont été isolés. Ces virus sont transmis par contact direct entre animaux. L'utilisation de la génétique inverse a permis d'identifier des gènes viraux impliqués dans le blocage de la réplication chez le vecteur

et d'autres gènes viraux favorisant la transmission horizontale (Pullinger et al. 2016)(Houssam Attoui, Monsion, et al. 2021)(S. Maan et al. 2011).

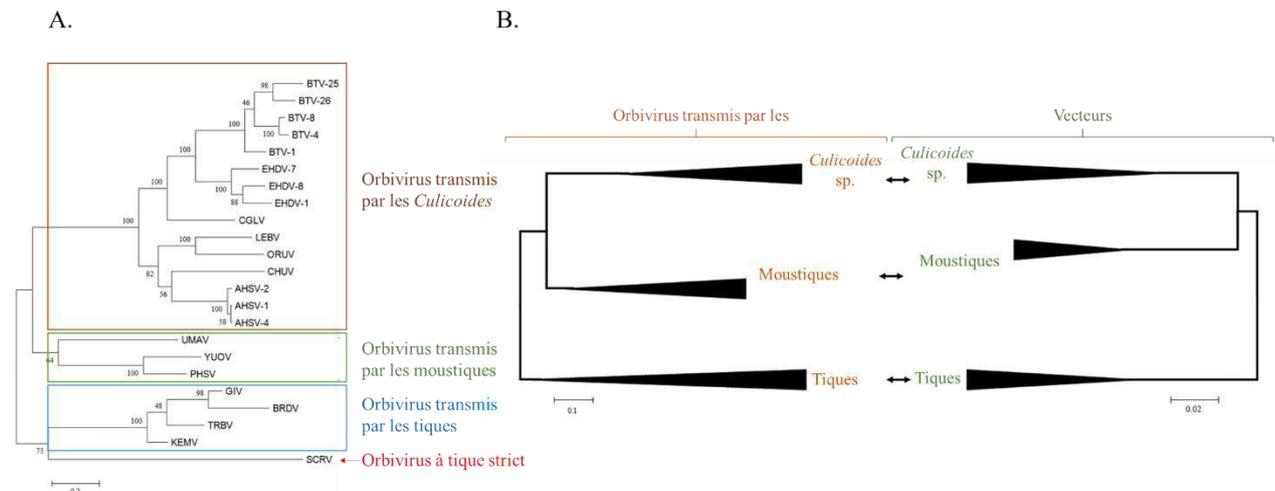


Figure 22: Répartition phylogénétique des orbivirus au sein du genre (arbre phylogénétique construit à partir des séquences en acides aminés de la VP1 (polymérase) (A) et Comparaison des topologies de l'arbre VP1 des orbivirus à celui des vecteurs construit à partir de leur protéine COXI (B), à partir de (Mohd Jaafar, Belhouchet, Belaganahalli, et al. 2014)

#### 4.1.3 La sous-famille *Spinareovirinae*

- Le genre *Coltivirus*

Le génome des coltivirus se compose de 12 segments d'ARNdb. L'espèce type de ce genre est *Colorado tick fever* (CTFV). La seconde espèce associée à ce genre est *Eyach* (EYAV). Les coltivirus ont été isolés chez plusieurs hôtes mammifères, y compris l'homme, ainsi que chez les tiques et moustiques. Plusieurs espèces de tiques sont impliquées : *Dermacentor andersoni*, *D. occidentales*, *D. albipictus*, *D. parumapertus*, *Haemaphysalis leporispalustris*, *Otobius lagophilus*, *Ixodes sculptus*, *I. spinipalpis*, *I. ricinus* et *I. ventalloi* (H. Attoui et al. 2012).

CTFV a été découvert en 1946 par Florio *et al.* à partir du sérum d'un patient (CTFV-Fi) (Florio, Stewart, and Mugrage 1946). Le virus est présent dans la région Rocky Mountain aux États-Unis et au Canada. Sa distribution est étroitement liée avec celle de son vecteur tique *D. andersoni*. L'infection à CTFV se traduit par des symptômes allant d'une fièvre simple ou diphasique jusqu'à l'encéphalite et/ou la polyradiculonévrite. Au sein de l'espèce CTFV, un second sérotype (CTFV-Ca) a été isolé en Californie à partir du sang de lièvre (*Lepus californicus*). Les profils électrophorétiques de CTFV-Fi et CTFV-Ca sont similaires (figure 23) (Houssam Attoui, Mohd Jaafar, De Micco, et al. 2005). La seconde espèce EYAV a, quant à elle, été isolée en Allemagne en 1976 et en France en 1981 à partir de tiques *I. ricinus*. Des analyses de séquences ont montré que EYAV et CTFV sont très proches et cela a été confirmé lors d'observations antigéniques (Houssam Attoui, Mohd Jaafar, De Micco, et al. 2005).

CTFV-FI CTFV-Ca



Figure 23: Electrophérotypes sur gel d'agarose de CTFV (Houssam Attoui, Mohd Jaafar, De Micco, et al. 2005)

#### 4.2 Great Island virus et le séroroupe Kemerovo

Selon l'ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses), quatre espèces d'orbivirus transmis par les tiques sont reconnus : *virus Chenuda* (CNUV), *virus Chobar Gorge* (CGV), *virus Wad Medani* (WMV) et *virus Great Island* (GIV). KEMV est un sous-groupe du GIV au sein duquel 36 sérotypes/souches d'orbivirus transmis par les tiques (*Agars*, *Ornithodoros* et *Ixodes*) dont le virus GIV sont répertoriés (Mertens et al. 2005). Il a été suggéré que KEMV pouvait être considéré comme une espèce (Belhouchet et al. 2010). Les virus Tribeč (TRBV) et Lipovnik (LIPV) sont deux sérotypes génétiquement très proches de KEMV (Belhouchet et al. 2010). Ces trois virus forment le séroroupe Kemerovo. TRBV et LIPV sont retrouvés en République Tchèque et Slovaquie et transmis par *I. ricinus* et *I. persulcatus* (Hubálek and Rudolf 2012). TRBV a été isolé à partir d'*I. ricinus* dans trois régions de Slovaquie en 1961 et 1963 (Libikova, Rehacek, and Somogyiavo 1965).

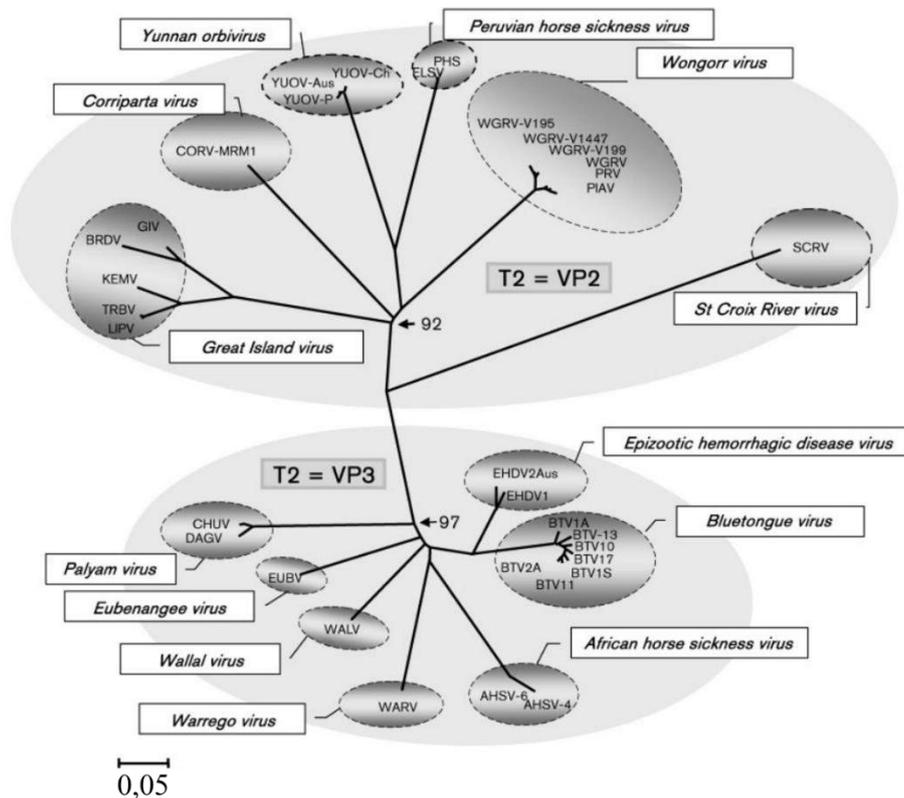


Figure 24: Comparaison phylogénétique des protéines T2 (couche interne du core) de GIV, KEMV, TRBV, LIPV et d'autres espèces d'orbivirus (Belhouchet et al. 2010)

### 4.3 Structure virale et cycle de réplication

Les orbivirus sont des virus non enveloppés avec un génome constitué de dix segments d'ARNdb codant au total 11 protéines : sept protéines structurales (VP1 à VP7) et quatre non-structurales (NS1 à NS4) (Belhouchet et al. 2011). Les protéines VP4 et VP5 forment la capsid externe de KEMV et VP7 et VP2 quant à elles, constituent le core. Les protéines VP1, VP3 et VP6 forment le complexe de transcription à l'intérieur du core (Belaganahalli et al. 2015)(Roy 2013a). La structure du virus broadhaven (BRDV) a été déterminée par Cryo-microscopie électronique (CryoEM). L'organisation structurale est similaire à celle du BTV avec la différence de la protéine de capsid externe qui est la VP2 pour le BTV et VP4 pour BRDV. BRDV appartient à la même espèce que KEMV (Schoehn et al. 1997). Chez les orbivirus, les virus d'une même espèce ont des organisations structurales très similaires, voire identiques (figure 25).

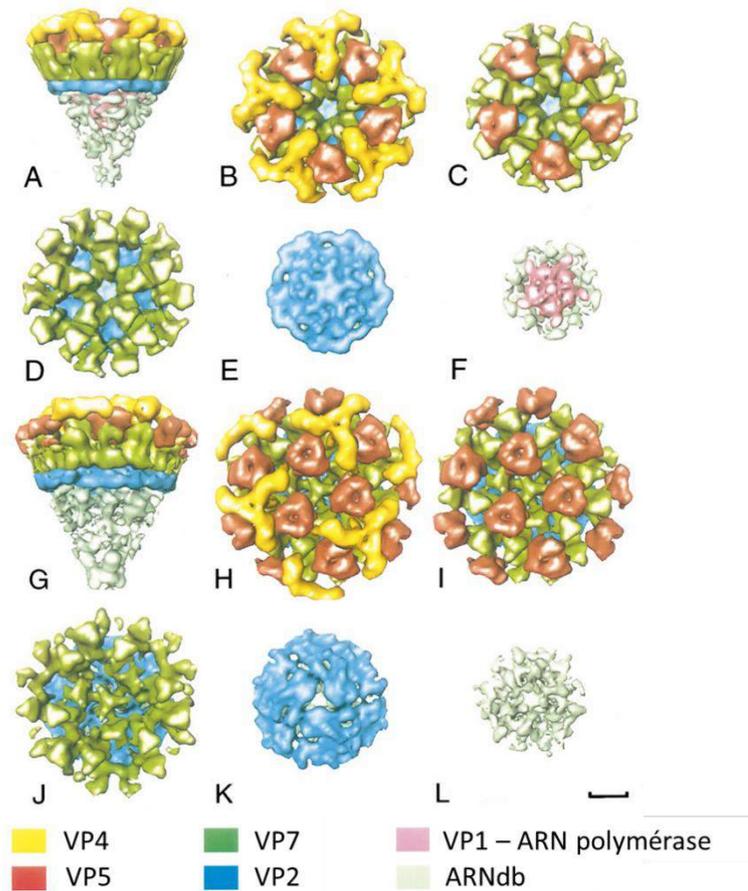


Figure 25: Sections coniques de la reconstruction BRDV centrées sur un axe de type 5 (A-F) et un axe type 3 (G-L) (Schoehn et al. 1997)

#### 4.3.1 Le génome viral

Comme dit précédemment, le génome des orbivirus est composé de 10 segments d'ARNdb. Selon l'orbivirus, la taille des segments diffère (Tableau 2). Chaque segment code une protéine, à l'exception du segment 9 qui possède deux cadres de lecture (ORF : open reading frame). Le profil électrophorétique de chaque virus à ARNdb est propre à l'espèce (figure 26)(S. Maan et al. 2011).

Tableau 2: Correspondance entre les segments et les protéines codées chez différents orbivirus (Mertens, Attoui, and Bamford 2009) (Belaganahalli et al. 2015)(Houssam Attoui, Mohd Jaafar, Belhouchet, et al. 2005)

| Transmis par :     | <i>Culicoides</i> |               | Tiques      |               | Moustiques              |               |
|--------------------|-------------------|---------------|-------------|---------------|-------------------------|---------------|
| Ex. d'orbivirus    | BTV-10            |               | KEMV        |               | YUOV (Yunnan orbivirus) |               |
| Segment            | Taille (pb)       | Protéine      | Taille (pb) | Protéine      | Taille (pb)             | Protéine      |
| 1                  | 3 944             | VP1(Pol)      | 3 896       | VP1(Pol)      | 3 993                   | VP1(Pol)      |
| 2                  | 2 929             | VP2(OC1)      | 2 792       | VP2(T2)       | 2 900                   | VP2(T2)       |
| 3                  | 2 773             | VP3(T2)       | 1 934       | VP3(CaP)      | 2 688                   | VP3(OC1)      |
| 4                  | 1 982             | VP4(CaP)      | 1 730       | VP4(OC1)      | 1 993                   | VP4(CaP)      |
| 5                  | 1 758             | NS1(TuP)      | 1 719       | NS1(TuP)      | 1 957                   | NS1(TuP)      |
| 6                  | 1 629             | VP5(OC2)      | 1 668       | VP5(OC2)      | 1 683                   | VP5(OC2)      |
| 7                  | 1 157             | VP7(T13)      | 1 197       | NS2(TuP)      | 1 504                   | NS2(ViP)      |
| 8                  | 1 121             | NS2(ViP)      | 1 183       | VP7(T13)      | 1 191                   | VP7(T13)      |
| 9                  | 1 070             | VP6(Hel)/NS4  | 1 049       | VP6(Hel)/NS4  | 1 082                   | VP6(Hel)/NS4  |
| 10                 | 822               | NS3(VRP)/NS3a | 707         | NS3(VRP)/NS3a | 825                     | NS3(VRP)/NS3a |
| Taille totale (pb) | 19 185            | -             | 17 875      | -             | 19 816                  | -             |

Pol : Polymérase ; OC1 (outer capsid) : protéine majeure de la capside externe ; OC2 : protéine mineure de la capside externe ; T2 : protéine majeure de la capside interne, symétrie T2 ; T13 : protéine majeure de la capside interne, symétrie T13 ; Hel ; hélicase ; ViP : protéine du corps d'inclusion viral ; VRP : protéine de libération du virus ; TuP : protéine tubulaire ; CaP : enzyme de coiffage

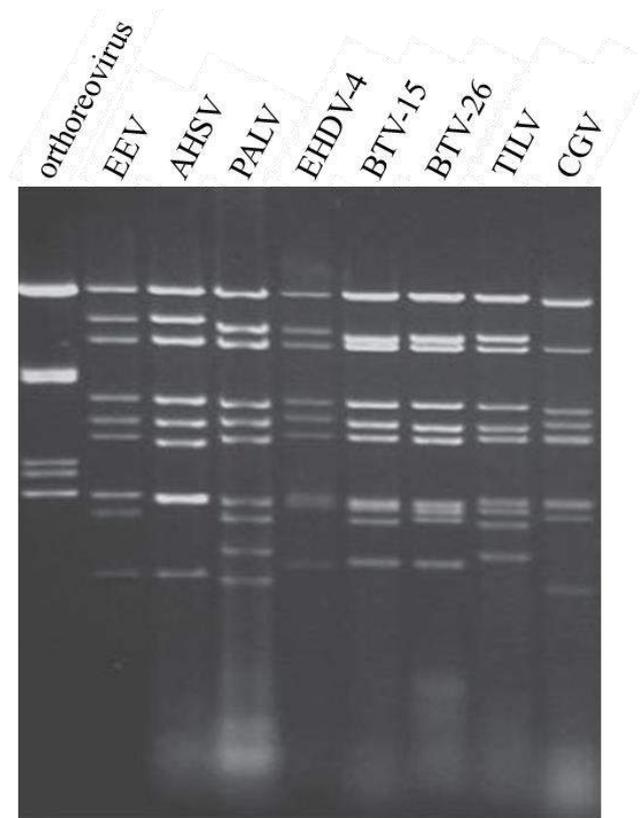


Figure 26 : Electrophérotypes de différents virus à ARNdb (S. Maan et al. 2011) (EEV : equine encephalosis virus, AHSV : African horse sickness virus, PALV : Palyam virus, EHDV : epizootic hemorrhagic disease virus, BTV : bluetongue virus, TILV : Tilligerry virus, CGV : Chobar Gorge virus)

Au sein du core, chacun des 10 segments d'ARNdb est associé avec un complexe répliatif au niveau des axes de type 5 (sommets de l'icosaèdre). Des séquences terminales sont conservées et présentes à chaque extrémité 5' et 3' de chaque segment (tableau 3). La séquence terminale 5' de chaque brin codant est coiffé et méthylé (ARN messenger - ARNm). Le premier codon d'initiation AUG (méthionine) de l'ARNm initie l'ORF de chaque segment. Le segment 10 code deux protéines proches (NS3 et NS3a). Le codon de l'initiation de la traduction de la NS3a se trouve en aval par rapport à celui de la NS3, par conséquent la NS3a est plus courte que la NS3 de quelques acides aminés (Roy 2013a). Le segment 9 présente 2 ORF permettant la synthèse d'une protéine de structure VP6 et d'une protéine non-structurale NS4 (Belhouchet et al. 2011).

Tableau 3: Caractéristiques des segments génomiques de YUOV (Houssam Attoui, Mohd Jaafar, Belhouchet, et al. 2005)

| Segments | Longueur (bp) | Protéines |            | 5' NCR        |                      | 3' NCR        |                      |
|----------|---------------|-----------|------------|---------------|----------------------|---------------|----------------------|
|          |               | Longueur  | Masse (Da) | Longueur (bp) | Séquences terminales | Longueur (bp) | Séquences terminales |
| 1        | 3993          | 1315      | 150971     | 13            | 5'-GUUAAAU---        | ---AAGUAC-3'  | 32                   |
| 2        | 2900          | 940       | 107049     | 11            | 5'-GUUAAAA---        | ---CGAUAC-3'  | 66                   |
| 3        | 2688          | 873       | 100164     | 18            | 5'-GUUAAAA---        | ---AGAUAC-3'  | 48                   |
| 4        | 1993          | 645       | 74180      | 7             | 5'-GUUAAAA---        | ---AAGUAC-3'  | 48                   |
| 5        | 1957          | 574       | 66820      | 30            | 5'-GUUAAAA---        | ---UGAUAC-3'  | 202                  |
| 6        | 1683          | 535       | 58950      | 41            | 5'-GUUAAAA---        | ---AGAUAC-3'  | 34                   |
| 7        | 1504          | 435       | 48143      | 29            | 5'-GUUAAAA---        | ---AGAUAC-3'  | 167                  |
| 8        | 1191          | 355       | 39159      | 19            | 5'-GUUAAAA---        | ---GCAUAC-3'  | 104                  |
| 9        | 1082          | 338       | 37193      | 17            | 5'-GUUAAAA---        | ---CGGUAC-3'  | 48                   |
| 10       | 825           | 253       | 28438      | 15            | 5'-GUUAAAA---        | ---CGGUAC-3'  | 48                   |
|          |               |           |            | Consensus     | 5'-GUUAAAw---        | ---nvrUAC-3'  |                      |

Il a été découvert très tôt que le génome des orbivirus présentait une diversité génétique très large. Pour exemple, au sein du génome du BTV, l'espèce type du genre, et plus particulièrement dans les segments 2 et 5 qui codent les protéines de la capsid externe, une forte diversité est clairement présente et est liée au sérotype du BTV. De même, des réassortiments de segments entre différents sérotypes du BTV ou encore au sein d'un sérotype (espèce) d'orbivirus ont été observés. Des études phylogénétiques faites à partir de plus 300 isolats de BTV ont montré que la séquence nucléotidique du segment 2 du BTV variait entre 29% et 59% entre les différents sérotypes du BTV. Aujourd'hui, 35 sérotypes du BTV ont été identifiés (Roy 2013a) (Ries et al. 2021).

#### 4.3.2 Les protéines structurales

Les protéines structurales sont au nombre de 7 : VP1, VP2, VP3, VP4, VP5, VP6 et VP7 et ont chacune un rôle précis. Les protéines externes de la capsid, VP4 et VP5 pour KEMV, permettent l'attachement cellulaire et l'internalisation du virus au sein des cellules. La capsid externe présente deux structures différentes. En effet, la VP4 est en forme de triskèle, s'associe en homotrimères et dépasse de la surface de la particule virale. Dans le cas du BTV, le trimère de VP2 (l'homologue de la VP4 du KEMV), présente une grande affinité pour les glycoprotéines. Par exemple, la VP2 du BTV va

interagir avec la glycopherine A, retrouvée en très grande nombre dans les cellules de mammifères sensibles au BTV (Noad and Roy 2009). La VP2 permet l'attachement de la particule virale à la cellule via un récepteur glycoprotéique et par la suite son internalisation dans des vésicules recouvertes de clathrine par endocytose médiée par les récepteurs (Noad and Roy 2009). La VP5, quant à elle, présente une structure globulaire, équivalente à celle retrouvée dans les protéines de fusion des virus enveloppés et s'associe également en trimères (figure 27). Elle possède une région hydrophobe en N-terminale qui permet son insertion dans les membranes, suivie d'une longue région comportant une spirale hélicoïdale (région Heptad) et des hélices amphipatiques. Le domaine globulaire se trouve en C-terminale, séparé par une charnière flexible du reste de la protéine. La VP5 permet la sortie du core de l'endosome dans le cytoplasme de la cellule grâce à une activité de perméabilisation des membranes. Cette activité est dépendante d'un pH bas. Un pH acide au sein de l'endosome induit un réarrangement protéique et un changement de conformation de la VP5 qui n'interagit plus avec la VP7 du core. Les hélices amphipatiques sont ainsi libres et vont pouvoir perméabiliser la membrane de l'endosome (Noad and Roy 2009).

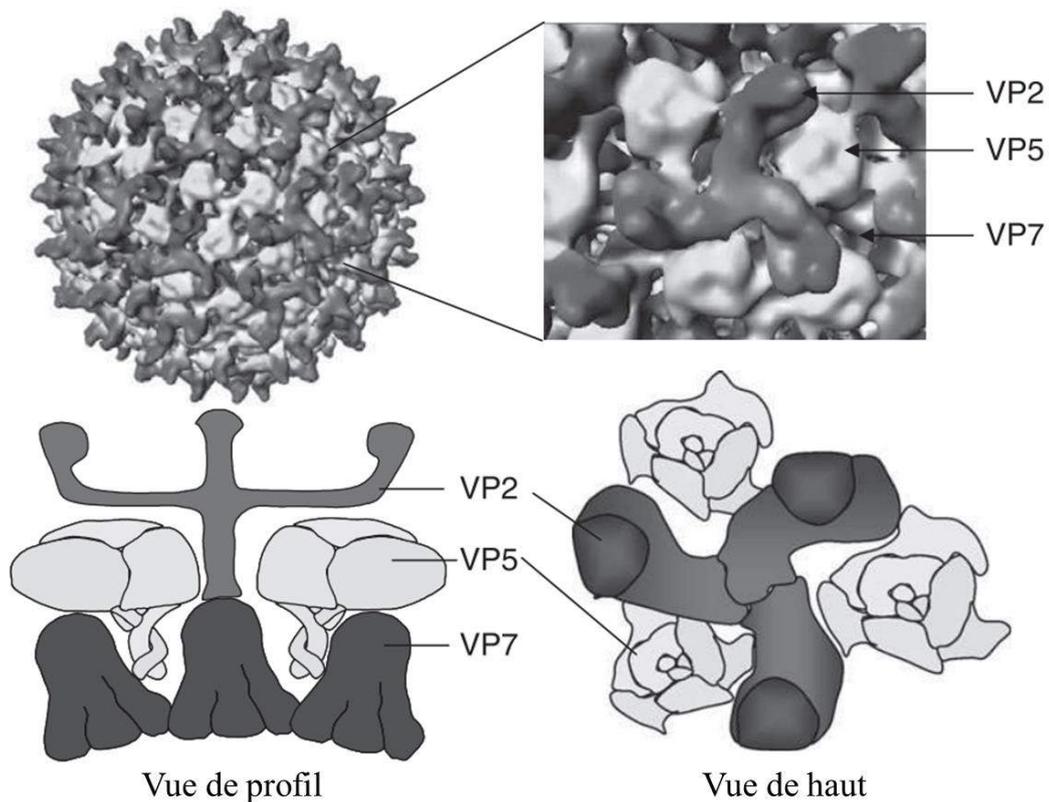


Figure 27 : Représentation schématique de l'arrangement des protéines de la capsid externe, VP2 et VP5, et de la protéine de la couche externe du core, VP7, de BTV (Noad and Roy 2009)

Le core du KEMV est composée des protéines VP7 et VP2, des homologues de la VP7 et VP3 des orbivirus transmis par les insectes. La VP7 des orbivirus transmis par les insectes est considérée comme la protéine qui interagit avec les membranes cellulaires dans les cellules d'arthropode en

l'absence des protéines de capsid externe. La VP7 s'associe en homotrimères et la surface du core présente une symétrie T13. Les monomères de VP7 ont deux domaines : le domaine supérieur et le domaine inférieur. Lors de la trimérisation, les monomères sont arrangés de telle sorte que le domaine supérieur d'un monomère repose sur le domaine inférieur d'un autre (figure 28). La VP3 du BTV est associée en homodimères avec une symétrie en T2. Au sein des dimères de VP3, et bien que les deux copies soient identiques, elles adoptent deux formes (dites A et B) qui se distinguent légèrement d'un point de vue structural. Ces dimères s'associent en décimères et 12 décimères forment ainsi la couche interne du core (Figure 29) (couche T2) (Roy 2013a).

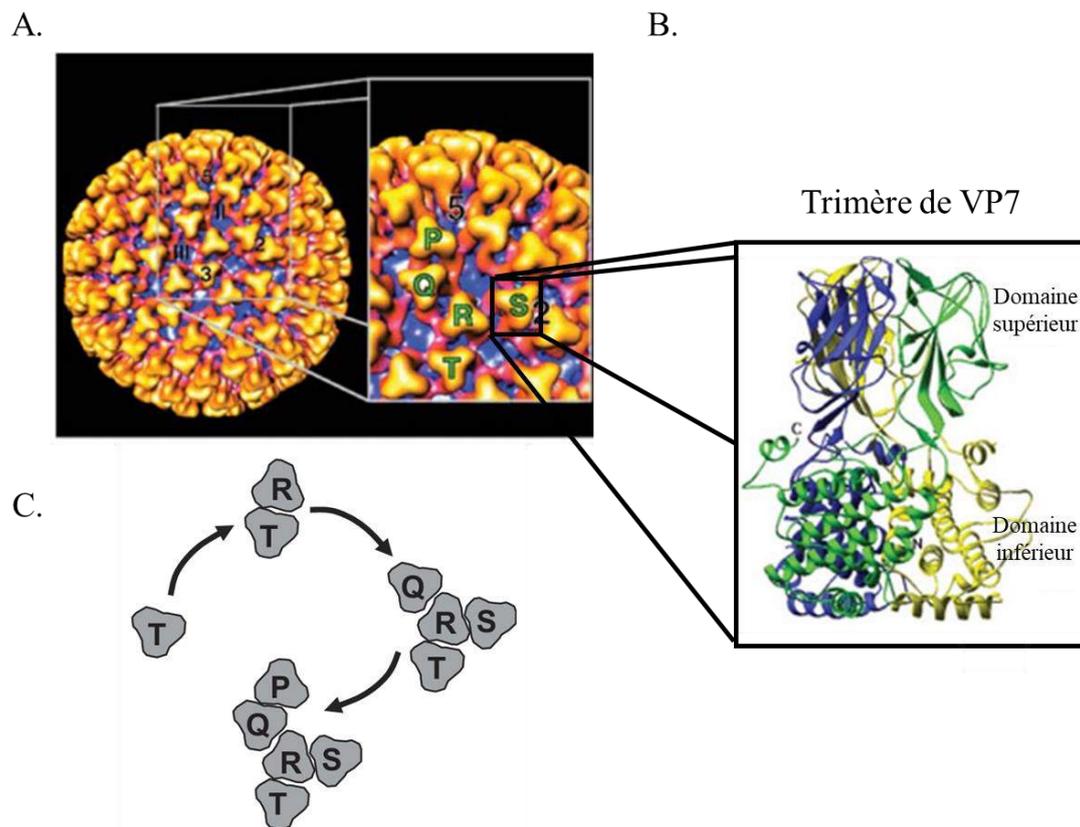


Figure 28: Représentation de la surface des structures tridimensionnelles (3D) du core du BTV-10 obtenue par Cryo microscopie électronique (A), image du trimère de VP7 (B) et mécanisme d'assemblage des trimères de VP7 (Noad and Roy 2009)

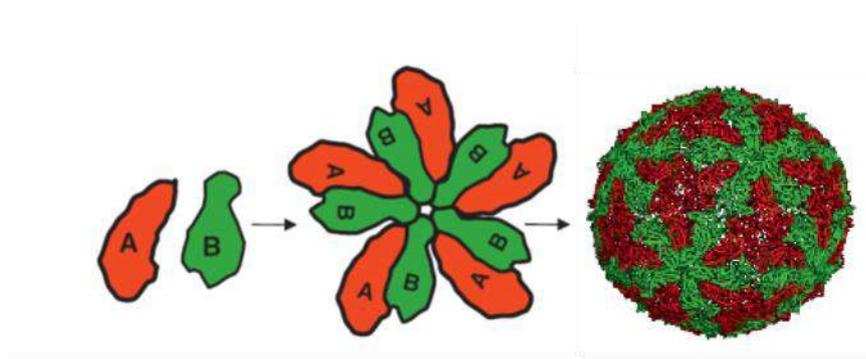


Figure 29: Représentation schématique de la formation de dimères et décimères de VP3 du BTM (Noad and Roy 2009)

Le complexe répliquatif d'un orbivirus transmis par les insectes est composé de la VP1, VP4 et VP6. Elles permettent la décondensation de l'ARN, la synthèse de l'ARN simple brin de polarité positive (ARNm) et de modifier (coiffer) les extrémités 5' des molécules d'ARN néosynthétisées. VP1 et VP4 sont des protéines enzymatiques situées juste en dessous de la couche VP3 (figure 30) au niveau de l'axe de type 5. La VP1 est une ARN polymérase ARN dépendante mais ne permet pas le coiffage des ARNm en 5'. La VP4 est l'enzyme qui catalyse les réactions de coiffage de l'ARNm. La VP6 est une ATPase et une hélicase ARN dépendante. La transcription des ARNdb nécessite l'implication d'une activité hélicase pour soit décondenser l'ARNdb avant la transcription ou soit séparer le brin parental du brin nouvellement synthétisé après la transcription. La VP6 est riche en acides aminés basiques (arginine et leucine) augmentant ainsi son affinité pour les ARNs (Roy 2013a).

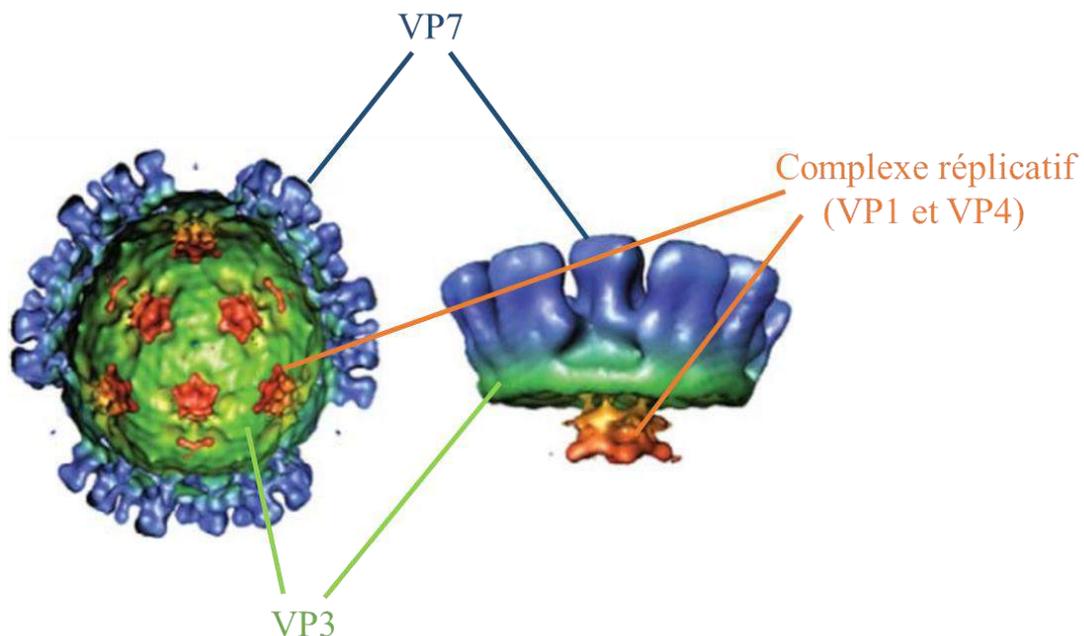


Figure 30: Structure de complexe répliquatif de BTM déterminée par cryo-EM (Roy 2016)

### 4.3.3 Les protéines non-structurales

Les protéines non-structurales sont : NS1, NS2, NS3/NS3a et NS4. La protéine NS1 est l'une des protéines les plus abondantes. Elle joue un rôle dans la morphogénèse du virus et agit comme régulateur positif de la traduction des ARN viraux en remplaçant la poly-A binding protein (PABA) dans le complexe de traduction protéique. Des études ont montré qu'en supprimant la NS1 par génétique inverse, la réplication virale ne pouvait se faire (Roy 2013a). Une étude récente a permis la détermination de la structure atomique de la NS1 du BTV. La structure atomique confirme une forme homopolymérique en tubules (figure 31). Les résultats de ces travaux suggèrent que la délétion de la partie C-terminale de la NS1 empêche la formation des tubules mais n'influence pas la réplication virale (Kerviel et al. 2019).

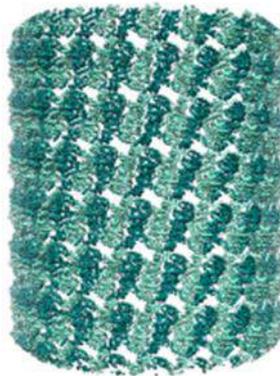


Figure 31: Représentation schématique de tubule de NS1 (Kerviel et al. 2019)

La NS2 joue un rôle important dans l'assemblage des particules virales en formant les corps d'inclusion viraux dans la cellule. NS2 est phosphorylée à 2 positions sur des résidus de sérine. En l'absence de cette double phosphorylation, la formation des corps d'inclusion ne peut se faire et l'assemblage des particules virales se voit restreint (Roy 2013a). Les protéines NS3/NS3a sont des glycoprotéines et ont une partie N-terminale très longue, deux domaines transmembranaires suivi d'une courte région C-terminale cytoplasmique. Leur fonction est assimilable à celle d'une viroporine et permettent aux particules virales nouvellement formées de s'engager dans leur sortie au travers de la membrane qui aurait été perméabilisée. NS3 interagit avec les protéines calpactines situées sur les membranes des cellules hôtes et participe au transport et au relargage des particules virales après réplication. NS3a joue un rôle dans la maturation des virus dans les cellules du vecteur arthropode. La NS3 contribue à contrecarrer la réponse innée dans les cellules de mammifères. La NS4 forme des agrégats dans le cytoplasme où elle interagit aussi avec les gouttelettes de lipides. Dans le noyau, la NS4 interagit avec les nucléoles (Belhouchet et al. 2011). Elle est prédite de former de structure en « coiled-coiles » retrouvées également dans les protéines capables d'interagir avec les acides nucléiques ou associées aux membranes. De plus des similarités avec des protéines nucléaires ont été identifiées

(Belhouchet et al. 2011). La NS4 peut aussi contrecarrer la réponse de l'interféron de type I (Ratinier et al. 2011).

#### 4.3.4 Cycle de réplication

La figure 32 représente de manière schématique le cycle de réplication du KEMV (par analogie au BTV) au sein d'une cellule mammifère. Les études menées avec le BTV suggèrent que l'entrée de KEMV dans la cellule se ferait grâce à l'attachement de la VP4 (analogue de VP2 de BTV) à son récepteur glycoprotéique présent à la surface de la cellule. Une endocytose du virus médiée par des clathrines est ainsi déclenchée et le virus se retrouverait dans un endosome. Au sein de ce compartiment, une acidification est observée et permet un changement de conformation de VP4 et VP5 et la particule perd la capsid externe. Les hélices amphipatiques de la VP5 peuvent agir librement et perméabilise la membrane de l'endosome et ainsi la libération du core dans le cytoplasme est possible. Le core va avoir une double fonction de protection des ARNdb contre les mécanismes antiviraux cellulaires et de compartiment de transcription de l'ARN messager à partir du brin négatif de l'ARNdb. La synthèse des nouveaux brins d'ARNm est alors activée grâce au complexe de transcription VP1/VP3/VP6 (VP1/VP4/VP6 chez le BTV). Les ARNdb sont alors décondensés par la VP6, simultanément la VP1 transcrit le nouveau brin d'ARN positif à partir du brin négatif. La VP3 ajoute ensuite la coiffe à l'ARNm qui servira à la synthèse de protéine à l'extérieur du core (figure 31). Un changement conformationnel de la couche VP2/VP7 permet aux ARNm de sortir via des pores au niveau de la couche VP2 et des anneaux pentamériques de la couche VP7. La synthèse protéique a lieu dans le cytoplasme et l'assemblage des particules peut ainsi débuter dans le corps d'inclusion viral formé par la NS2. Les premières protéines à s'assembler sont la VP2 en décamères et celles du complexe de transcription. Ensuite, les ARN de polarité négative sont synthétisés et les VP7 s'assemblent autour de la couche VP2 pour ainsi former un core viral. L'assemblage de la couche externe de la capsid (VP4 et VP5) s'effectue dans le cytoplasme. La sortie des particules virales peut se faire de deux façons : soit par lyse cellulaire médiée par NS1 soit par exocytose médiée par la NS3 (Noad and Roy 2009)(Roy 2017)(ICTV 2020) (figure 32).

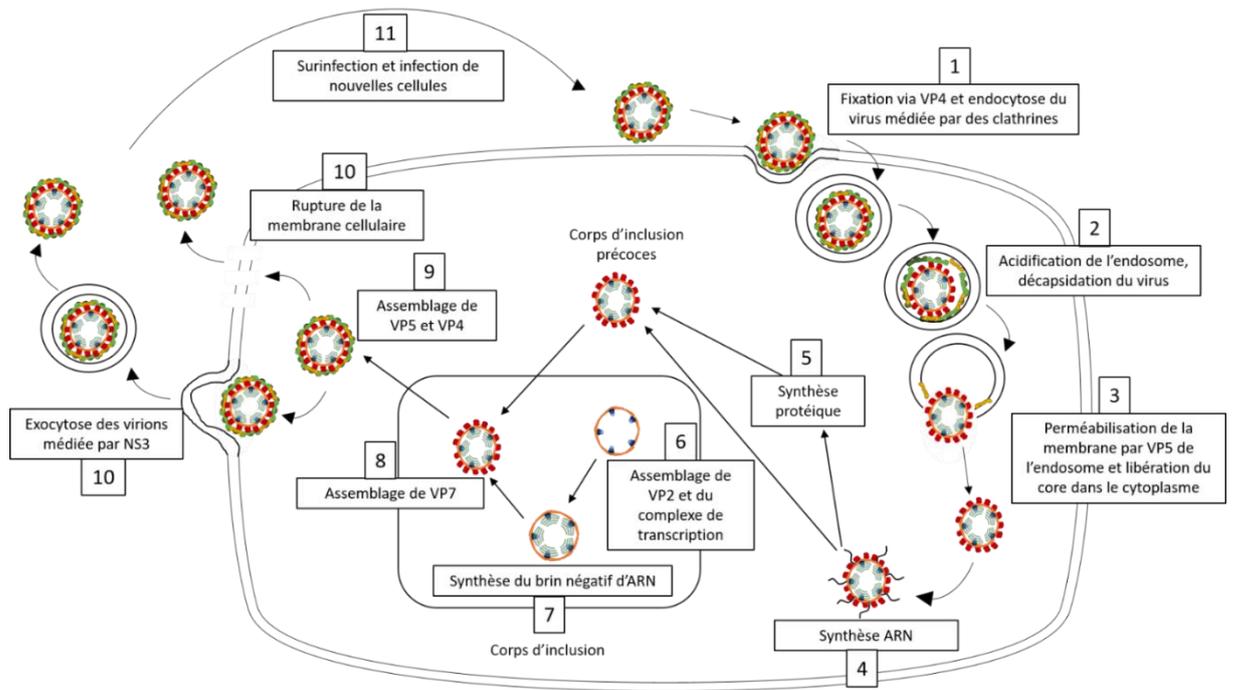


Figure 32: Cycle de répliation de KEMV fait à partir de (H. Attoui et al. 2012)

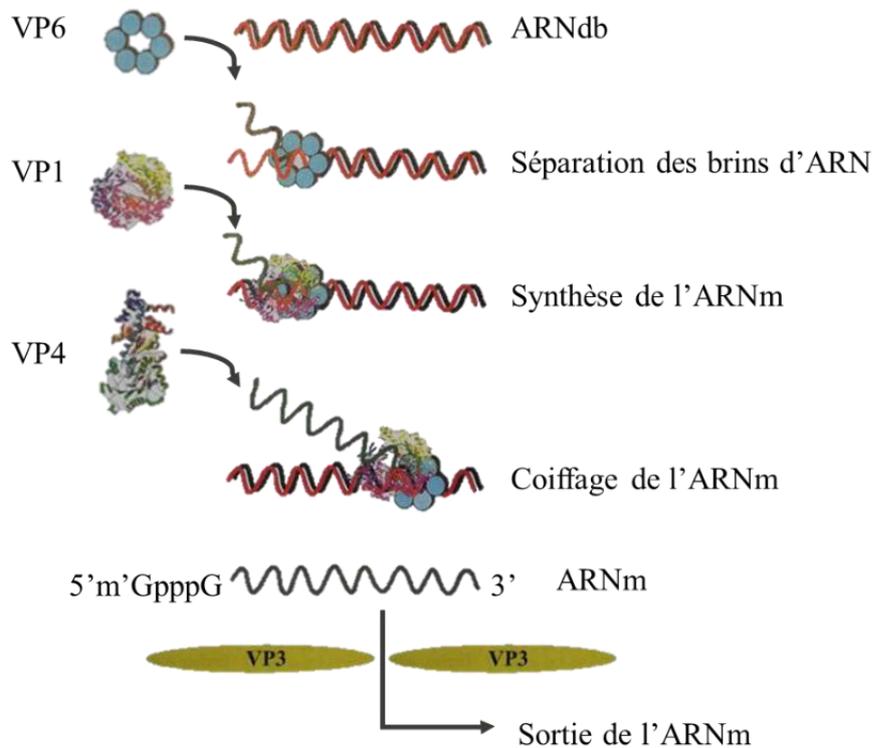


Figure 33: Synthèse des ARNm du BTM (Roy 2013a)

#### 4.4 Epidémiologie et Vecteurs de KEMV

KEMV a été impliqué dans des cas humains d'encéphalites en Russie notamment dans la région Kemerovo (Libikova et al. 1964). LIPV et TRBV sont responsables d'encéphalites et de maladies chroniques neurologiques telles que la polyradiculonévrite en Europe centrale. Le taux de séroconversion à KEMV dans la région Kemerovo dans la population est de l'ordre de 2,8% (Libikova, Tesarova, and Rajcani 1970). Pour les deux sérotypes, dans leur région respective, les montagnes Tribeč et le village Lipovnik, les taux de séroconversion dans les populations sont, respectivement pour TRBV et LIPV, 3% et 18% (Gresíková, Rajcáni, and Hrúzik 1966). KEMV a également été retrouvé en Egypte en 1971 chez un oiseau migrateur *Phoenicurus phoenicurus*, ce qui pourrait laisser suggérer une plus large distribution de KEMV (Schmidt and Shope 1971). Cependant, KEMV a fortement été diagnostiqué dans les années 1960-70 par séroneutralisation (test de diagnostic de référence) mais a été négligé au cours des 40 dernières années au profit d'un diagnostic TBEV. De ce fait, KEMV appartient à la classe des « virus oubliés ». La figure 34 représente la distribution géographique de KEMV et de ses deux sérotypes TRBV et LIPV.

LIPV et TRBV sont co-pathogènes avec TBEV en Europe Centrale. Plus de 50% des patients infectés avec TBEV présentent des anticorps dirigés contre LIPV en République Tchèque. En République Tchèque et Slovaquie, la prévalence de TRBV dans les tiques *I. ricinus* est 5 fois plus importante que TBEV, ce qui suggère que TRBV pourrait être à l'origine d'encéphalite dont l'étiologie n'a pas été identifiée (Dilcher et al. 2012).

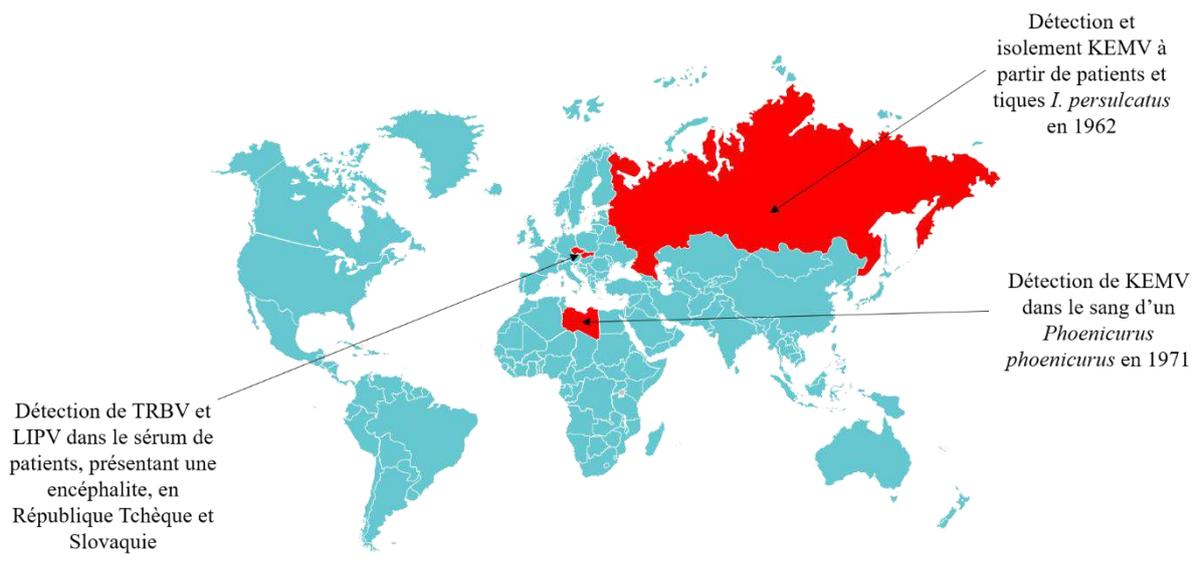


Figure 34: Distribution géographique de KEMV, TRBV et LIPV

KEMV a été, pour la toute première fois, isolé à partir de tiques adultes *I. persulcatus*. Il a ensuite été détecté chez d'autres espèces en Russie : *I. ricinus*, *I. pavlovsky*, *Dermacentor reticulatus* (Dedkov et al. 2014)(S. Tkachev et al. 2014). Sa prévalence en Russie au sein des tiques *Ixodes* varie entre 0,2 et 10,1% selon la région et 0 à 4,9% chez *Dermacentor reticulatus* (Dedkov et al. 2014). Les sérotypes TRBV et LIPV sont, quant à eux, retrouvés chez les tiques *I. ricinus* et *I.persulcatus* (Dilcher et al. 2012) (Hubálek and Rudolf 2012).

## 5 Objectifs de la thèse

Au cours de cette thèse, nous nous sommes intéressés à l'étude des interactions du virus Kemerovo avec ses vecteurs invertébrés et hôtes vertébrés. Même si KEMV est considéré comme un « virus oublié », il est toutefois impliqué dans des cas humains d'encéphalites et est connu pour être associé aux deux espèces de tique les plus présentes en Europe, *I. ricinus* et *I. persulcatus*. L'étudier apportera des informations précieuses sur les interactions des orbivirus transmis par les tiques et leurs tiques vectrices. Ces études permettraient des comparaisons directes entre ce qui est connu pour les orbivirus transmis par les insectes et ceux transmis par les tiques. Il est notable que le genre *Orbivirus* contient des virus pathogènes principalement en santé publique animale, mais aussi humaine. D'après l'état de l'art des études sur la variabilité génomique des arbovirus, il semblerait que le génome des arbovirus soit stable en raison d'une alternance d'hôte (vecteur arthropodes et hôtes mammifères). Cependant, la majorité de ces études a été menée sur des arbovirus transmis par des insectes et l'hypothèse du « trade-off » (l'alternance d'hôte contraint l'évolution des arbovirus) a été élargie à tous les arbovirus, incluant les virus transmis par les tiques. Mais, les insectes comme les moustiques ou les phlébotomes n'ont pas le même mode de vie que les tiques et par conséquent les virus qui y sont hébergés ne subissent pas les mêmes pressions. Pour ces travaux de thèse, des études *in vivo* et *in vitro* ont été menées afin de mieux comprendre ces interactions qui se déroulent à plusieurs niveaux entre le virus et la tique.

Le but de la première partie de la thèse, *in vivo*, a été de mettre au point des modèles d'infection de tique et souris avec le KEMV, pour étudier, par la suite, ses interactions avec son vecteur arthropode et l'effet de l'alternance d'hôtes. La première étape de cette partie a été l'étude de la compétence vectorielle des tiques, *Ixodes ricinus* et *Ixodes persulcatus*, pour KEMV. Ces deux espèces ont été décrites comme étant ses vecteurs mais leur aptitude à le transmettre n'a jamais été étudiée jusqu'à ce jour. Plusieurs aspects ont été abordés pour l'étude de la compétence vectorielle des tiques *I. ricinus* et *I. persulcatus* pour KEMV. Dans un premier temps, la mise en place de la méthode d'infection des tiques a été réalisée en comparant deux techniques d'infection : un système de gorgement artificiel sur peau de gerbille versus une technique d'immersion. Les différents critères qui définissent la compétence vectorielle d'une tique pour un agent pathogène (acquisition du virus, transmission trans-stadiale et transmission à un hôte vertébré au cours d'un repas sanguin) ont été évalués. Enfin, nous nous sommes intéressés à l'impact de l'espèce de tique et de son origine géographique sur son aptitude à transmettre KEMV puisque nous avons travaillé avec des *I. ricinus* de Slovaquie et de France ainsi que des *I. persulcatus* de Russie.

La seconde partie était l'étude, dans des conditions *in vitro*, des interactions plus fines de KEMV avec son vecteur arthropode et l'influence de l'alternance d'hôte sur sa fitness. Pour cela, le KEMV a

été adapté en réalisant 3 *scenarii* de cultures cellulaires. Le virus a subi i) 30 passages en série dans des cellules de mammifère, ii) 30 passages en série dans des cellules de tique et iii) 30 passages en alternance dans ces deux types de cellules. Au cours de ces travaux, plusieurs aspects ont été explorés comme le recueil d'informations sur la biologie de KEMV, car peu sont disponibles, dans le but d'optimiser la purification du virus issu de cellules de tique ou de mammifère. La génération de différents passages en série ou alternance, et l'évaluation de la fitness des souches adaptées dans des souris IFNAR<sup>-/-</sup> représentent une part conséquente de cette partie d'étude. Par définition la fitness correspond à l'étude de la capacité répliquative d'un agent pathogène au sein d'un hôte ou dans une culture cellulaire (Wargo and Kurath 2012). À cela pourrait s'associer des aspects de virulence et de tropisme. Enfin, la finalité de ce projet est l'étude des quasi-espèces générées pendant les 30 passages. Un séquençage NGS, en utilisant la technologie Illumina, est envisagé pour certains passages d'intérêt. Pour cela, la mise au point de la purification des ARNdb (ARN génomique) a été nécessaire.

# Chapitre 1

## Compétence vectorielle

## Introduction du Chapitre 1

La tique représente un risque majeur pour la santé humaine et animale par sa capacité à transmettre la plus grande variété d'agents pathogènes (bactéries, parasites et virus). Chaque année, de nombreux cas de maladies à tiques sont rapportés dans le monde. Les maladies à tiques font partie des infections actuellement considérées comme émergentes. Beaucoup de ces agents pathogènes sont étudiés en laboratoire, particulièrement les bactéries et les parasites (S. Bonnet et al. 2015). Seuls quelques virus le sont. Pourtant au cours des deux dernières décennies, de nombreuses épidémies impliquant des virus transmis par les tiques ont été rapportés. Certains virus étaient déjà connus et d'autres ont été découverts. Certains virus n'affectent que les animaux et d'autres sont zoonotiques avec des symptômes variables chez l'Homme allant de la simple fièvre jusqu'à des symptômes plus sévères tels que des atteintes neurologiques ou fièvres hémorragiques, pouvant entraîner la mort (Labuda and Nuttall 2004).

L'étude de la compétence vectorielle d'une espèce de tique pour un virus donné en laboratoire implique la validation de 3 critères : l'acquisition du virus par la tique au cours d'un repas sanguin sur un hôte vertébré infecté, la transmission trans-stadiale du virus d'un stade de tique à un autre et enfin la transmission du virus par la tique infectée au cours d'un nouveau repas sanguin sur un hôte vertébré sain. Savoir si une tique est compétente ou non pour un virus donne des informations valables quant à la prédiction d'éventuelles épidémies par exemple. Le premier critère nécessite la mise en place de modèle de laboratoire pour reproduire l'infection de la tique. Il existe différentes techniques pour infecter ces arthropodes : inoculation intrathoracique, micro-injection via le pore anal ou encore le gorgement sur animaux virémiques (Belova et al. 2017)(Slovák et al. 2014)(Hurlbut and Thomas 1960)(Talactac et al. 2018). Ces techniques ont leurs avantages et inconvénients. Les méthodes artificielles sont plus ou moins éloignées de ce qui est fait dans la nature.

Au sein de l'UMR BIPAR, un système artificiel pour le gorgement et l'infection des tiques a été mis au point par Sarah Bonnet et a notamment été validé avec plusieurs agents pathogènes tels que *Babesia divergens* (S Bonnet et al. 2007), *Babesia venatorum* (Sarah Bonnet et al. 2009), *Bartonella henselae* (Cotté et al. 2008)(Wechtaison et al. 2020)(Liu et al. 2014) et *Bartonella birtlesii* (Reis et al. 2011). Les tiques se nourrissent alors sur du sang infecté ou non au travers d'une peau de gerbille ou lapin maintenue par un système en verre, pour contenir le sang et les tiques, lui-même relié à une circulation d'eau chauffée à 37°C pour mimer un hôte vertébré.

Pour étudier les interactions entre KEMV et son vecteur arthropode et notamment l'effet de l'alternance d'hôtes, la mise en place de modèles *in vivo* est nécessaire. Cette nécessité implique alors d'avoir les tiques compétentes pour transmettre KEMV mais également des méthodes d'infection des

tiques. La compétence vectorielle des tiques du genre *Ixodes* pour ce virus n'a jamais été étudiée jusqu'à ce jour.

Les objectifs du chapitre 1 sont 1/ de mettre au point des modèles d'infection de tique et souris avec le KEMV, pour ensuite 2/ tester la compétence vectorielle des tiques du genre *Ixodes* pour KEMV. Dans un premier temps, nous avons comparé deux méthodes d'infection des tiques (technique d'immersion et gorgement artificiel sur peau de gerbille). Les différents critères qui définissent la compétence vectorielle d'une tique pour un agent pathogène (acquisition du virus, transmission transstadiale et transmission à un hôte vertébré au cours d'un repas sanguin) ont été évalués. Une fois la validation de la méthode faite, la compétence vectorielle des tiques *I. ricinus* de Slovaquie pour KEMV a été testée. Ces travaux font l'objet d'un article qui a été accepté pour publication dans la revue « Scientific Report ». Dans le but à la fois de mettre en place le modèle *in vivo* mais également de tester la compétence vectorielle pour KEMV des tiques *I. ricinus* de France et d'*I. persulcatus* de Russie. Des infections artificielles ont été réalisées pour mettre en évidence les premières interactions observables entre un virus et son vecteur arthropode. Les résultats de ces travaux ont abouti à un second article scientifique qui est soumis dans la revue « Viruses ».

# Chapitre 1a

## Validation d'une technique d'infection des tiques et compétence vectorielle des tiques *Ixodes ricinus* de Slovaquie pour KEMV

### Introduction du chapitre 1a

L'étude de la compétence vectorielle des tiques *Ixodes ricinus* de Slovaquie pour KEMV a tout d'abord débuté par la validation de la technique d'infection des tiques avec KEMV. En effet, deux techniques d'infection ont été testées pour ces travaux : le gorgement artificiel sur peau de gerbille (S Bonnet et al. 2007) et une technique d'immersion (Mitzel et al. 2007). Après validation de la technique, la compétence vectorielle a ensuite été étudiée. L'ensemble de ces travaux est présenté dans ce manuscrit sous forme d'article. Cet article a été accepté dans la revue « Scientific Reports ». Ces travaux ont fait l'objet d'une collaboration internationale avec l'équipe de Daniel Růžek, de l'institut de Parasitologie de České Budějovice en République Tchèque.

En préambule de cet article, voici une vision globale de la construction de cette étude. La première étape a été de tester et de valider les deux techniques d'infection des tiques. Au cours de cette étude, deux virus ont été utilisés : KEMV et TBEV. TBEV a servi de contrôle positif pour évaluer l'efficacité des deux méthodes avec *I. ricinus*. L'infection des tiques par le biais du gorgeur artificiel avait déjà été réalisée et validée au laboratoire par Sara Moutailler et son équipe. De plus, nos collaborateurs tchèques maîtrisent, quant à eux, l'infection des tiques *I. ricinus* avec TBEV par la technique de l'immersion qui consiste à immerger les tiques dans la suspension virale pendant 45 min à 37°C et de réaliser, après plusieurs lavages des tiques, un gorgement sur souris. Ces deux techniques ont alors été testées avec KEMV et des larves *I. ricinus* de Slovaquie. L'efficacité d'infection a été évaluée par la mesure des taux d'infection des larves gorgées et la transmission trans-stadiale, c'est-à-dire le taux d'infection des nymphes après la mue des larves. Une portion de larves gorgées et de nymphes (après la mue) a été testé individuellement par RT-PCR temps réel.

**ARTICLE:** C. V. Migné *et al.*, "Evaluation of two artificial infection methods of live ticks as tools for studying interactions between tick-borne viruses and their tick vectors," Scientific Report, 2021.



OPEN

# Evaluation of two artificial infection methods of live ticks as tools for studying interactions between tick-borne viruses and their tick vectors

Camille Victoire Migné<sup>1,2,7</sup>, Vaclav Hönig<sup>3,4,7</sup>, Sarah Irène Bonnet<sup>1,6</sup>, Martin Palus<sup>3,4</sup>, Sabine Rakotobe<sup>1</sup>, Clémence Galon<sup>1</sup>, Aurélie Heckmann<sup>1</sup>, Eva Vyletova<sup>3,5</sup>, Elodie Devillers<sup>1</sup>, Houssam Attoui<sup>2</sup>, Daniel Ruzek<sup>3,4</sup> & Sara Moutailler<sup>1✉</sup>

Up to 170 tick-borne viruses (TBVs) have been identified to date. However, there is a paucity of information regarding TBVs and their interaction with respective vectors, limiting the development of new effective and urgently needed control methods. To overcome this gap of knowledge, it is essential to reproduce transmission cycles under controlled laboratory conditions. In this study we assessed an artificial feeding system (AFS) and an immersion technique (IT) to infect *Ixodes ricinus* ticks with tick-borne encephalitis (TBE) and Kemerovo (KEM) virus, both known to be transmitted predominantly by ixodid ticks. Both methods permitted TBEV acquisition by ticks and we further confirmed virus transstadial transmission and onward transmission to a vertebrate host. However, only artificial feeding system allowed to demonstrate both acquisition by ticks and transstadial transmission for KEMV. Yet we did not observe transmission of KEMV to mice (IFNAR<sup>-/-</sup> or BALB/c). Artificial infection methods of ticks are important tools to study tick-virus interactions. When optimally used under laboratory settings, they provide important insights into tick-borne virus transmission cycles.

Ticks represent significant risks for human and animal health. Because they are obligate hematophagous ectoparasites and feed on diverse vertebrate hosts, they are considered as one of the most important vectors of zoonotic pathogens. Ticks can transmit a wide variety of bacteria, parasites and viruses<sup>1–3</sup>. In human and veterinary medicine, most tick-borne pathogens are transmitted by various hard ticks belonging to genera *Ixodes*, *Haemaphysalis*, *Dermacentor*, *Hyalomma* and *Rhipicephalus* and by certain soft ticks belonging to genera *Argas* and *Ornithodoros*. Among tick-borne pathogens, 170 tick-borne viruses (TBVs) were identified and belong to nine virus families and twelve virus genera. Viruses transmitted via tick bites can cause various symptoms in humans and animals, ranging from mild febrile illness to neurological disorders or even haemorrhagic fevers<sup>4,5</sup>.

The oversite and existing gaps in our knowledge of ticks and TBV are partly due to the difficulty of setting effective experimental models to assess vector-competence or study virus-tick interactions in general. In fact, establishing and maintaining laboratory tick colonies and performing experimental infections of ticks remain a challenge<sup>6</sup>. The difficulties relate to the obligate hematophagous nature of hard ticks. Therefore, they need an animal host to feed on and reproduce, requiring lengthy feeding times and ingesting larger blood meals than any other known hematophagous arthropod. Tick-borne viruses received much less attention than viruses transmitted by mosquitoes, especially in terms of interaction with their arthropod vectors. Competent ticks

<sup>1</sup>Anses, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale, 94700 Maisons-Alfort, France. <sup>2</sup>INRAE, Anses, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR VIROLOGIE, Laboratoire de Santé Animale, 94700 Maisons-Alfort, France. <sup>3</sup>Institute of Parasitology, Biology Centre, Czech Academy of Sciences, Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic. <sup>4</sup>Emerging Viral Diseases Research Group, Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, 621 00 Brno, Czech Republic. <sup>5</sup>Faculty of Agriculture and Faculty of Science, University of South Bohemia, Branisovska 31, 370 05 Ceske Budejovice, Czech Republic. <sup>6</sup>Present address: Functional Genetics of Infectious Diseases Unit, Institut Pasteur, CNRS UMR 2000, Université de Paris, 75015 Paris, France. <sup>7</sup>These authors contributed equally: Camille Victoire Migné and Vaclav Hönig. ✉email: sara.moutailler@anses.fr

| Tested parameters    | Control ticks fed on clean blood using AFS | Ticks fed on TBEV-spiked blood using AFS | Ticks immersed in TBEV suspension followed by feeding on CDI mice |
|----------------------|--|--|---|
| % of engorged larvae | 23.16%<br>(2085/9000)                      | 22.32%<br>(2009/9000)                    | 78.32%*<br>(224/286)  |
| % of infected larvae | 0%<br>0/20                                 | 70%<br>(14/20)                           | 72%<br>(18/25)  |
| % of infected nymphs | 0%<br>0/20                                 | 75%<br>(15/20)                           | 48%*<br>(39/82)   |

**Table 1.** Engorgement rates of larvae and TBEV infection in engorged larvae and nymphs infected at larval stage after artificial feeding (AFS) or immersion techniques (khi-2 test, alpha = 5%, \*:  $p$  value < 0.001).

acquire a given arbovirus during their feeding on infected vertebrate hosts or during co-feeding with infected ticks. The virus is then transmitted during the next blood meal after an extrinsic incubation period over which the virus will replicate and disseminate throughout the tick body. Hard ticks take only one blood meal per stage (larva, nymph and adult), meaning that the trans-stadial transmission of the virus is necessary for transmission to a new vertebrate host upon the following blood meal. Indeed, TBVs must survive changes occurring during moulting and maintain their infectivity into the following developmental stage<sup>7</sup>. Because transmission of viruses occurs when saliva is injected during feeding upon the host, the virus must reach and infect the tick salivary glands<sup>8</sup>. The complexity of the whole process starting with virus acquisition and progressing to infection of a new host, involves delicate molecular interactions between viruses and their vectors. Investigating these interactions facilitates the identification of elements and pathways used/abused by TBVs, which could be targeted to attempt blocking virus replication and control TBV-related diseases<sup>9</sup>. Therefore, reproducing transmission cycles of tick-borne viruses under controlled laboratory conditions remains an important prerequisite to study their interactions with respective vectors.

In order to study the complex of ticks and the pathogens they transmit, laboratory tick infection methodologies have been developed<sup>6</sup>. Several methodologies are in use in laboratories such as feeding on a live animal, capillary feeding, inoculation or immersion. Many of these techniques were used to infect ticks with bacteria and/or parasites. For viruses the most widely used methods are intrathoracic inoculation (bypasses the gut barrier), anal pore microinjection (does not bypass gut barrier) or feeding on a viraemic host<sup>10–13</sup>. The main aim of our study is to adapt/develop efficient tick infection methodologies, including an artificial feeding system (AFS)<sup>14</sup> or an immersion technique (IT)<sup>15</sup>. Developing infection methods which allow selective infection of ticks with TBVs facilitates the study of pathogens of interest in the arthropod vector. The AFS relies on ticks feeding through an animal skin and has been validated as a model to infect ticks with *Babesia divergens*<sup>14</sup>, *Babesia venatorum*<sup>16</sup>, *Bartonella henselae*<sup>17–19</sup> and *Bartonella birtlesii*<sup>20</sup>. The IT was validated to infect *Ixodes scapularis* with *Borrelia burgdorferi*<sup>15</sup> and Langat virus (LGTV)<sup>21</sup>. Ticks were directly immersed into a suspension of the pathogen and further fed on a vertebrate host immediately thereafter. Tick infection models with tick-borne encephalitis virus (TBEV, genus *Flavivirus*) have been previously established and validated under laboratory settings. The main techniques include parenteral inoculation and co-feeding on mice<sup>22–24</sup>.

*Ixodes ricinus* is the primary vector of a wide range of pathogens and the most abundant and widely distributed tick species in Europe<sup>25</sup>. In our study, we used viruses belonging to genera *Flavivirus* or *Orbivirus* to infect *I. ricinus*. TBEV is known to be transmitted by *I. ricinus* and responsible for severe neurological illness of humans in Europe and Asia<sup>26</sup>. It was used as a positive control to assess the efficacy of both AFS and IT as infection methods. Kemerovo virus (KEMV, genus *Orbivirus*) is suspected to be the causative agent of encephalitis cases in humans in central Europe and Russia<sup>27,28</sup>. AFS and IT were used to assess vector competence of *I. ricinus* for KEMV. The virus has been isolated/detected in *I. persulcatus* and *I. ricinus*<sup>29</sup>. Up until this study, assessing vector competence of *I. ricinus* for KEMV has never been attempted. Assessing the efficacy of both infection techniques was based on the three criteria of vector competence: (i) virus acquisition by ticks, (ii) trans-stadial transmission, and (iii) transmission of the viruses to a vertebrate host.

## Results

### Artificial feeding and immersion techniques as tools to assess vector competence of *I. ricinus* for TBEV.

**TBEV acquisition by *I. ricinus* ticks and trans-stadial transmission.** The feeding of larvae on clean or TBEV-spiked blood through membrane skin lasted for ten days. Feeding behaviour was not affected by the addition of virus into the sheep blood ( $p$  value = 0.18) (Table 1). Larvae which were immersed in the TBEV suspension fed for only 4 days on mice and the calculated percentage of engorgement is higher compared to membrane skin feeding ( $p$  < 0.001) (Table 1). Using the AFS, 70% of engorged larvae and 75% of nymphs were found positive for TBEV RNA (Table 1). After immersion in TBEV suspension, 72% of engorged larvae and 48% of nymphs were positive for TBEV RNA. The infection rate of larvae with TBEV was not impacted whether the method was AFS or IT ( $p$  = 0.88). However, the success of trans-stadial transmission of TBEV from engorged larvae to moulted nymphs was higher using the AFS than the IT ( $p$  < 0.001) (Table 1). Moreover, after feeding of immersed larvae, two mice showed clinical signs of infection and died on days 9 and 11 post-infestation. The last mouse which also showed clinical signs of infection, recovered and survived until the end of the experiment. Though the presence of TBEV RNA was not tested in these mice, we suspect some form of non-biological transmission of the virus by the larvae. Indeed this could be a mechanical transmission as suggested for lumpy skin disease transmission by *Aedes aegypti*<sup>30</sup> or transmission of specific plant arboviruses by aphids<sup>31</sup>, is a matter which will require further investigation.

| Tested parameters    | Control ticks fed on clean blood using AFS | Ticks fed on KEMV-spiked blood using AFS | Ticks immersed in KEMV suspension followed by feeding on BALB/C mice |
|----------------------|--|--|--|
| % of engorged larvae | 56%<br>(1120/2000)                         | 29%*<br>(581/2000)                       | 73%<br>(886/1200)  |
| % of infected larvae | 0%<br>0/30                                 | 83.3%<br>25/30                           | 26.25%<br>(21/80)*   |
| % of infected nymphs | 0%<br>0/10                                 | 40%<br>4/10                              | 0*<br>0/25   |

**Table 2.** Engorgement rates of larvae and KEMV infection in engorged larvae and nymphs infected at larval stage after artificial feeding (AFS) or immersion techniques (khi-2 test,  $\alpha = 5\%$ , \*:  $p$  value  $< 0.001$ ).

**Transmission of TBEV to a vertebrate host.** The ability of nymphs infected at the larval stage to transmit TBEV to a vertebrate host was assessed by feeding on mice. Twelve months post moulting, nymphs moulted from larvae fed using AFS were placed on one IFNAR<sup>-/-</sup> mouse. After feeding, real-time RT-PCR was used to detect TBEV in engorged nymphs and mouse samples. The engorged nymphs were tested positive for RNA TBEV. IFNAR<sup>-/-</sup> mouse died six days post-infestation, and the virus was detected in the brain, spleen, liver, heart and lungs with Ct values ranging from 20.34 to 24.25.

Nymphs which moulted from larvae immersed in TBEV suspension were left for 3–12 months before being fed on 14 CD1 mice. After feeding, TBEV was detected in 60.0% of engorged nymphs (15/25). Out of the 14 mice, twelve (86%) died or showed typical symptoms of TBEV and were hence euthanised at the humane endpoint of the disease. The mean survival time was 11.6 days ( $\pm 1.75$ ) after infestation. The remaining two mice, which had survived, presented symptoms of TBEV but recovered ultimately.

#### Assessing vector competence of *Ixodes ricinus* ticks for KEMV using artificial feeding or immersion techniques.

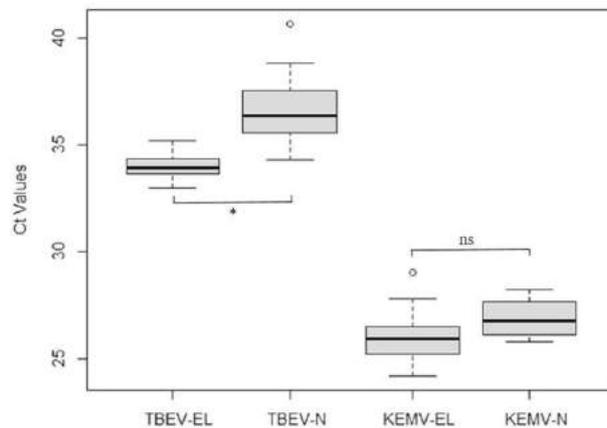
**KEMV acquisition by ticks and trans-stadial transmission.** Larvae feeding on membrane skin lasted seven days in total. The first engorged larvae were collected on day 5. A total of 1120 larvae were collected from the AFS containing the clean sheep blood and another 581 larvae were collected from the AFS containing the KEMV-spiked blood. The presence of KEMV in the AFS seems to reduce the feeding success of larvae ( $p < 0.001$ ) (Table 2). Engorgement of larvae immersed in KEMV suspension was more efficient than engorgement using the AFS ( $p < 0.001$ ) (Table 2). The presence of KEMV in engorged larvae was confirmed by testing randomly 30 individuals immediately after feeding using AFS. About 83.3% of tested larvae were positive for KEMV RNA. Engorged larvae from the control setting (non-spiked blood) were consistently found negative for KEMV by RT-PCR. The mean infection rates of engorged larvae after immersion was 26% (ranged from 0 to 60%, according to the tested batch), revealing a significant difference between the two infection methods ( $p < 0.001$ , Table 2). No clinical signs or mortality were observed in mice after feeding of immersed larvae. Mouse blood remained negative for KEMV RNA up until the end of feeding five days post-infestation.

The trans-stadial transmission from larvae to nymphs was assessed, immediately after the moulting using real-time RT-PCR by testing 10 and 25 nymphs after AFS or IT, respectively. A significant difference was observed between the two infection techniques with infection rates in nymphs of 40% using AFS, and 0% with the IT ( $p < 0.001$ , Table 2). Five and seven months after larval feeding, an additional 25 unfed nymphs which moulted from larvae fed using AFS, were pooled and all tested negative by real-time PCR for the presence KEMV RNA.

***I. ricinus* nymphs infected at the larval stage fail to transmit KEMV to a vertebrate host.** Five to seven months post-moulting, nymphs were fed on 4 BALB/c and 4 IFNAR<sup>-/-</sup> mice for nymphs from immersed larvae and 4 BALB/c and 4 IFNAR<sup>-/-</sup> mice for nymphs from AFS larvae. Feeding on mice lasted for 6 days. The mice were observed for 10 days post-infestation until the end of the experiment. Blood samples were collected on days 0, 5 and 10 to follow up the viraemia. On day 10 post-infestation, mice were euthanised and organs (brain, liver, spleen, lungs, heart and kidneys) were collected. Engorged nymphs, mouse organs and blood samples were tested by real-time RT-PCR for KEMV RNA. All samples were tested negative ruling out the possibility of a KEMV transmission to the mice by the feeding ticks.

#### Comparison of TBEV and KEMV acquisition by ticks and trans-stadial transmission.

We used TBEV experiments as positive controls for the feasibility of artificial infections with KEMV. As shown in Tables 1 and 2, TBEV and KEMV infection rates of larvae with the AFS were similar ( $p = 0.26$ ). Trans-stadial transmission tended to be much better with TBEV than with KEMV ( $p = 0.06$ ). The presence of KEMV or TBEV genomes in the ticks correlates with the uptake of viral particles by the larvae during artificial feeding or immersion. Acquisition using the IT was more efficient with TBEV than with KEMV ( $p < 0.001$ ). Trans-stadial transmission of KEMV was not confirmed using this technique. The distribution of Ct values of engorged larvae and moulted nymphs is shown in Fig. 1 after tick infection with TBEV and KEMV using AFS. Because KEMV cDNA was pre-amplified, the real-time RT-PCR signals for KEMV are earlier than those for TBEV (Fig. 1). The levels of TBEV RNA are lower in nymphs after moulting in comparison with engorged larvae ( $p < 0.001$ ). Levels of KEMV RNA appear to be similar in engorged larvae and nymphs after moulting ( $p > 0.05$ ).



**Figure 1.** Detection of KEMV Seg-2 and TBEV envelope genes by real-time RT-PCR in lysates of individual *Ixodes ricinus* after infection using the artificial feeding system—EL: Engorged Larvae, N: nymphs (N infected at the larval stage) and comparison of mean Ct values for each group (Kruskal–Wallis test, alpha = 5%, \*:  $p$  value < 0.001). The lower and upper lines represent the lower (Q1) and upper (Q3) quartiles. The median is represented in the diagram and data falling outside the Q1–Q3 range are plotted as outliers of the data (circle).

## Discussion

This study investigated two laboratory tick infection methods for tick-borne viruses, namely an AFS<sup>14</sup> and an IT<sup>21</sup>. *I. ricinus* is known to be a competent vector for TBEV<sup>32</sup>. This virus as a positive control to study the potential of the two infection methods for testing tick vector competence. We also assessed vector competence of *I. ricinus* for KEMV, a tick-borne zoonotic orbivirus. We have shown that TBEV can successfully infect *I. ricinus* using either methods and was efficiently passed from the infected ticks to a susceptible mouse model, as confirmed by the development of specific clinical signs and the detection of TBEV RNA in the mouse blood and organs. Our results also shown that the AFS is a more efficient method to infect ticks with TBEV than the IT. In addition, ticks were efficiently infected with KEMV using the AFS, while the IT failed to achieve infection. However, no KEMV transmission from infected ticks to mice as a model vertebrate host was observed.

Both infection methods used in this study, have their advantages and limitations. These techniques allow experimental tick infection without the requirement for viraemic animals. They are also safe methods which avoid the use of glass needles required to inject a virus suspension into ticks<sup>10,11</sup>. Though a versatile technique, intrathoracic injection bypasses the gut barrier and hence is far from representing a natural route of infection<sup>6,10–12</sup>. Oral feeding remains the gold standard to assess key elements of virus-ticks interaction, especially considering that the gut barrier is an important aspect of vector competence. For instance, Dhori and Dugbe viruses are two tick-borne viruses transmitted by *Hyalomma dromedarii/H. marginatum* or *Amblyomma variegatum*. Both viruses replicate efficiently in *R. appendiculatus* haemocoel and are transmitted trans-stadially and to a vertebrate host when the virus is injected into the tick. However, this tick species is not a competent vector of these two viruses and no replication, trans-stadial transmission nor transmission to a vertebrate host were observed when ticks were orally infected using virus spiked blood<sup>33</sup>. However, for the immersion method, it is not clear whether the virus is taken up by oral absorption or diffuses into the tick body through various pores. This method has also the disadvantage of requiring live animals to feed ticks which have been immersed into the virus suspension. Nevertheless it is a low cost method which is easier to set up and is less time consuming than the AFS. For larvae, the IT lasts 4 days, which spans the immersion of the ticks and the feeding on mice. Yet, the major limitation of IT is the generation of cohorts of infected ticks with an equal pathogen burden. In this study, the number of infected ticks with either virus using the IT was lower than using AFS. For TBEV infection, we obtained 224 engorged ticks after immersion, with an estimated infection rate at 72%, whereas using AFS we obtained 2009 engorged ticks with a comparable infection rate. Comparatively, the AFS lasts a minimum of 7 days with daily blood changes. It is also noted that our results with TBEV or KEMV suggest that the efficacy of the immersion method could rely on the nature of the virus/virus family. Unlike TBEV, we did not observe trans-stadial transmission of KEMV from larvae to nymphs using IT, when such a transmission was demonstrated with AFS.

Using the IT, the number of obtained engorged ticks is limited for further analysis due to a limited number of ticks per animal and limited number of animals used for ethical reasons. By contrast, the AFS allows feeding of a higher number of ticks<sup>6</sup>. AFS is a better method in terms of infection with TBEV and KEMV and it generates a larger cohort of infected ticks. In addition, it is an infection technique that is closer to the natural mode of tick infection (feeding on an infected viraemic vertebrate). However, it appears that the success of tick feeding is higher with live animals than upon using AFS. In addition, and despite good engorgement rates for control ticks in the KEMV experiment (56%), the observed engorgement rates with blood spiked with KEMV (29%) or with TBEV (22 to 23%) were lower than those described in the scientific literature (ranging from 43 to 84.5%).<sup>17–19</sup> Indeed, one of the limiting factor with this method is the unpredictability of feeding rates due to tick behaviour, as ticks may resist to feed, but this can also be a problem with feeding on live animals<sup>6</sup>.

The IT was efficient with TBEV, as observed with significant infection rates in nymphs which moulted from immersed larvae (48%). This technique was successful with LGTV in *I. scapularis* ticks with similar infection rates in engorged larvae of 96% and 87% in nymphs after moulting<sup>21</sup>. However, it was not the case with KEMV where the infection rates of larvae and nymphs after moulting were 26.25% and 0%, respectively. One possible explanation of the observed differences in infection efficiency can be the virus titre in the suspension used for immersion of larvae. In our study, the TBEV titre ( $2.5 \times 10^8$  PFU/mL) was 100-fold higher than KEMV titre ( $4.4 \times 10^6$  PFU/mL). In the LGTV study, the virus titre was  $10^7$  PFU/mL<sup>21</sup>. The nature of the virus may also provide additional explanations to the observed differences. TBEV and LGTV are both enveloped flaviviruses with a single-stranded RNA genome, while KEMV is an orbivirus having a dsRNA genome and is non-enveloped. Thus, the two groups of viruses differ substantially in terms of structure of the virus particles (enveloped versus non-enveloped) and particular mechanisms involved in cell entry (endocytosis versus fusion) and tissue dissemination<sup>34–39</sup>. Furthermore, during the feeding on a vertebrate host, ticks inject saliva that modifies the local environment at the bite location. It has been demonstrated that saliva plays a role in the transmission of tick-borne pathogens to a vertebrate host and also in the pathogens acquisition<sup>40</sup>. Certain molecules present in vector saliva substantially influence infectivity and survival of TBVs in the tick<sup>8</sup>, and it has been shown that salivary proteases enhance infectivity of insect-borne orbiviruses<sup>38</sup>. If we assume that KEMV was taken up through body pores other than the mouth parts, its infectivity may have been less efficient to the larval tissues. Consequently, as the IT is further from a natural mode of feeding than AFS, it might influence infection efficacy of specific viruses and AFS remains a better tool to study the virus-tick interactions particularly to evaluate vector competence.

Like TBEV, KEMV was associated with *I. ricinus* in the field<sup>29</sup>. KEMV was isolated from these ticks in 1964 in Czechoslovakia<sup>41</sup> and Vologda region in Russia in 1975<sup>29</sup>. However, up until this study, vector competence studies of *I. ricinus* for KEMV has been never attempted. Our results cast reasonable doubt about *I. ricinus* being a natural vector for KEMV. We have shown that *I. ricinus* larvae can be infected with KEMV during a blood meal and remain infected after moulting (two weeks after) when infected using our AFS. Although a relatively high infection rate was observed in engorged larvae (83.3%), a low efficacy of trans-stadial transmission resulted in only 40% of infected nymphs two weeks after moulting was reported. The first trials of KEMV transmission were performed five months post-moulting and we did not observe transmission to mice. The virus seemed to have disappear from the nymphs which were found negative for KEMV RNA 5 months post-moulting. These results suggest that the ticks cleared the virus during this period. Arthropods have antiviral innate immune responses. The most robust antiviral response is RNA interference (RNAi) which targets viral RNA degradation, thus keeping virus replication in check<sup>42</sup>. This pathway is well known in mosquitoes but not clearly understood in ticks. A previously published study showed the involvement of Dcr and Ago proteins in the antiviral RNAi response after TBEV or LGTV infection of IDE8 tick cells (a cell line derived from *I. scapularis*)<sup>43</sup>. It is possible that *I. ricinus* antiviral immunity cleared the virus or even KEMV failed to disseminate from the site of entry into the tick to other tick organs, a process that is crucial to infect salivary glands and onward transmission to vertebrate hosts. Our studies showed that *I. ricinus* larvae were infected with the virus, which survived moulting into nymphs, but real-time RT-PCR detecting KEMV RNA was performed with RNA extract from whole ticks, and localisation of the virus within the nymphs has not been identified so far.

The detection of KEMV RNA in larvae extract after immersion may have resulted from particles which remained on the body surface or from particles which have been taken up by the tick through body pores without further replication. Larvae moulting into nymphs is accompanied by a loss of the cuticle (apolysis)<sup>44</sup> and the loss of any potentially virus particles present on the surface of their bodies. However, it should be noted that the non-biological transmission by immersed larvae via a possible contamination of the mouthparts suspected for TBEV, was not observed with KEMV.

Moreover, interaction between arboviruses and their vector is a complex process. Vector competence is genetically determined and could rely on a particular virus strain and on a particular arthropod geographical strain. This has been shown previously for other arboviruses such as TBEV, bluetongue, Rift Valley fever virus or chikungunya virus<sup>45–50</sup>. The *I. ricinus* ticks we used in our studies were from Slovakia. The prevalent serotypes of KEMV in Slovakia are Lipovnik (LIPV) and Tribeč (TRBV) virus as previously reported<sup>41</sup>, and both viruses have been isolated from *I. ricinus*. The KEMV strain used in this study was isolated in Russia in 1962 where several KEMV isolates were obtained from *I. persulcatus*<sup>27</sup>, the principal *Ixodid* tick in that geographical region<sup>51</sup>. Thus the geographical origin of the tick population could be a contributing factor to the observed results. We have currently ongoing studies with laboratory reared *I. persulcatus* larvae from Russia, which will provide clear cut information about the role of this tick species in maintaining KEMV in the field and evaluation of our experimental infection methods. Studies with *I. ricinus* from Russia would also provide additional valuable information as to whether geographical variants of this tick may influence competence. Alternatively, an assessment of vector competence of *I. ricinus* from Slovakia towards TRBV or LIPV could also shed light on potential genetic traits that are virus and tick population related.

## Conclusion

We have assessed two experimental techniques to infect ticks with tick-borne viruses. We validated two tick infection methods, an AFS and an IT, with TBEV using *I. ricinus* and showed vector competence of *I. ricinus* for TBEV in the laboratory. Our preliminary results suggest that *I. ricinus* appears to be poorly competent for KEMV but further studies are required to confirm such a result. Both techniques presented in this study have their advantages and limitations but as the IT is further from a natural mode of feeding than AFS, it might influence infection efficacy of specific viruses and AFS remains a better tool to study the virus-tick interactions, tick co-infections (viruses, bacteria and parasites) and more particularly to evaluate vector competence. These

studies are essential to understand mechanisms of evolution, emergence/re-emergence of tick-borne pathogens, and to identify new methods to control tick-borne diseases for which an urgent public health response is needed.

## Methods

**Experimental design.** The experimental design of the study is shown in Fig. 2. It involves virus acquisition by *I. ricinus* larvae (Fig. 2A). After feeding, engorged larvae need approximately one month to moult into the nymphal stage. The trans-stadial transmission of the virus was assessed immediately after the engorged larvae have moulted into nymphs. A real-time RT-PCR assay was used to quantify virus replication (Fig. 2B). Nymphs were placed on mice for at least two months and up to one-year post-moulting to assess virus transmission to a vertebrate host (Fig. 2C).

**Viruses.** *Tick-borne encephalitis virus (TBEV).* Ticks were infected with TBEV strain Hypr. This strain was originally isolated in 1953 in the Czech Republic from the blood of a child with TBE<sup>52</sup>. TBEV Hypr was passaged 4 times in suckling mice brains and twice in Vero E6 cells<sup>53</sup> and was used in the experiments.

*Kemerovo virus (KEMV).* A KEMV virus stock was prepared in BSR cells (a clone of BHK-21<sup>54</sup>). The virus was originally isolated from the brain of a patient who died of acute encephalitis in 1962<sup>27</sup>. This isolate was further amplified once in suckling mouse brain and passaged twice in Vero cells in 1969. Before use, the initial stock of the virus was propagated three times in BSR cells.

**Plaque assay.** TBEV titre was determined using plaque assay using either porcine PS or monkey kidney Vero E6 cells. On the day before the assay, cells were plated ( $1.5 \times 10^5$  cells/well) in 24-well plates with Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with penicillin (50 IU/mL), streptomycin (50 µg/mL) and 10% foetal bovin serum (FBS) at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>. Ten-fold serial dilutions of TBEV were prepared in serum-free DMEM. Two hundred microliters of each dilution were added per well for 1.5 h at 37 °C. Cells were covered with a carboxy-methyl cellulose (CMC) overlay in DMEM. After five days of incubation at 37 °C, cells were rinsed three times with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed/stained with a 10% formaldehyde solution containing 0.1% crystal violet. TBEV titre was determined as  $2.5 \times 10^8$  PFU/mL.

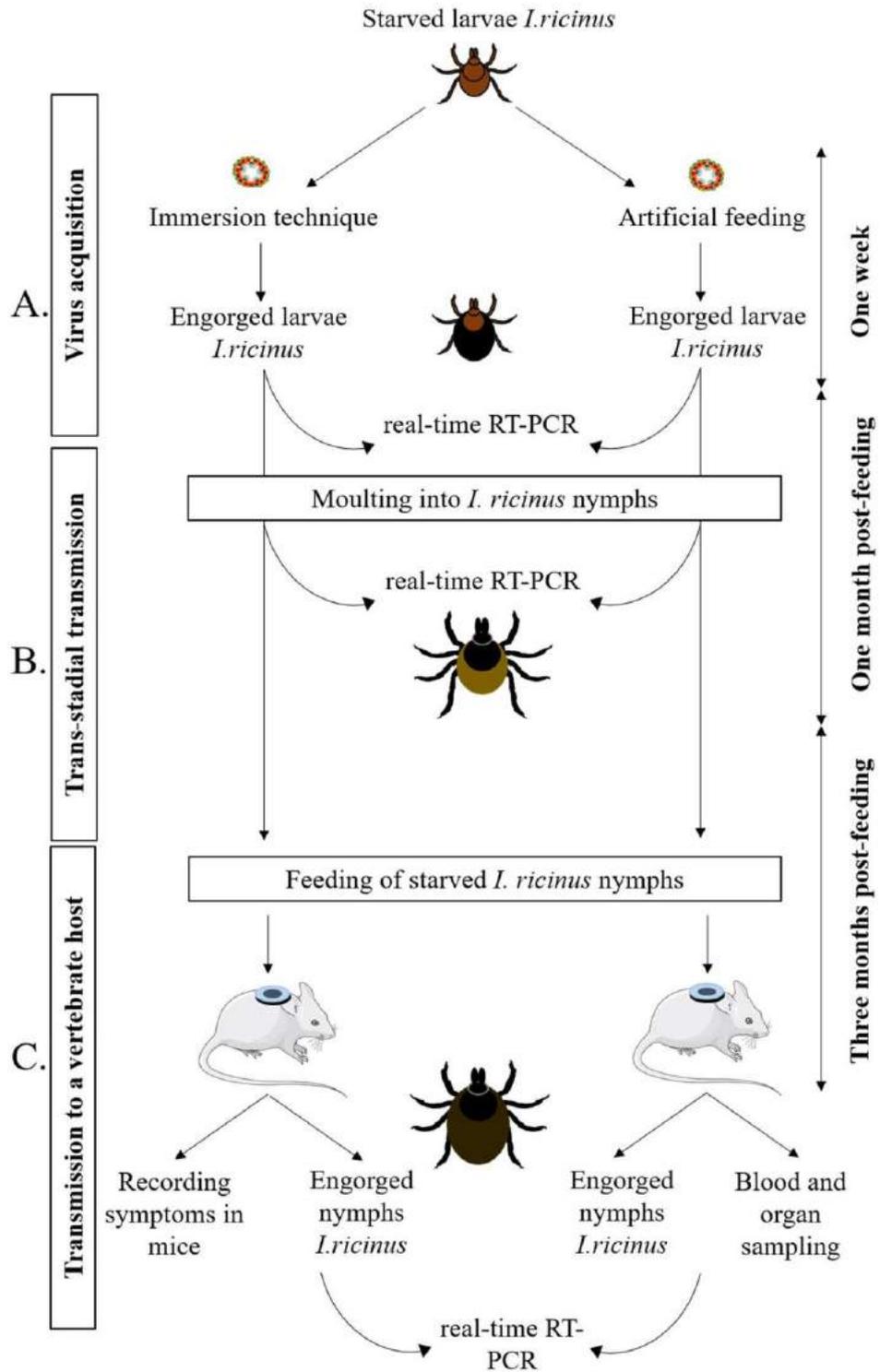
KEMV titre was also determined by plaque assay as described previously<sup>55</sup>. On day 5 post-infection, BSR cell debris were pelleted by centrifugation at 2000 g for 10 min at 4 °C. The supernatant was discarded, and cell debris were suspended in 5 mL of serum-free culture medium and treated with an equal volume organic solvent, Vertrel XF (Sigma-Aldrich, United States), to free virus particles from cell debris as described previously<sup>56</sup>. The mixture was shaken manually and centrifuged at 2000 g for 5 min. The aqueous phase, containing free virus particles, was carefully recovered. Briefly, BSR cells were plated ( $1 \times 10^5$  cells/well) in 24-well plates a day before running the assay in DMEM supplemented with penicillin (50 IU/mL) and streptomycin (50 µg/mL), 10% of FBS at 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>. Ten-fold serial dilutions of the virus were prepared in serum-free DMEM and 250 µL of each dilution was added per well for 2 h at 37 °C. Cells were then covered with 1 mL of molten 1% low melting point agarose in DMEM. After incubation at 37 °C for 5 days, 2 mL of 10% formaldehyde was added to each well. Cells were stained with 0.1% naphthalene-black solution after removal of the agarose plugs, and plaques counted. The virus titre was determined as  $4.4 \times 10^6$  PFU/mL.

**Ticks.** For TBEV infection studies, we used *I. ricinus* larvae derived from the 1<sup>st</sup> generation of ticks collected in the Murbach forest from the Alsace region in France, or from a laboratory colony of ticks initially collected in the Czech Republic. For KEMV infection studies, we used larvae from the 4<sup>th</sup> generation of a laboratory colony provided by the Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia. Ticks were maintained at 22 °C with 95% relative humidity and a 12 h light/dark cycle in the animal facilities as described in<sup>14</sup>. In each case, after egg-laying, females were tested for KEMV and TBEV RNA before larvae were used in the experiments.

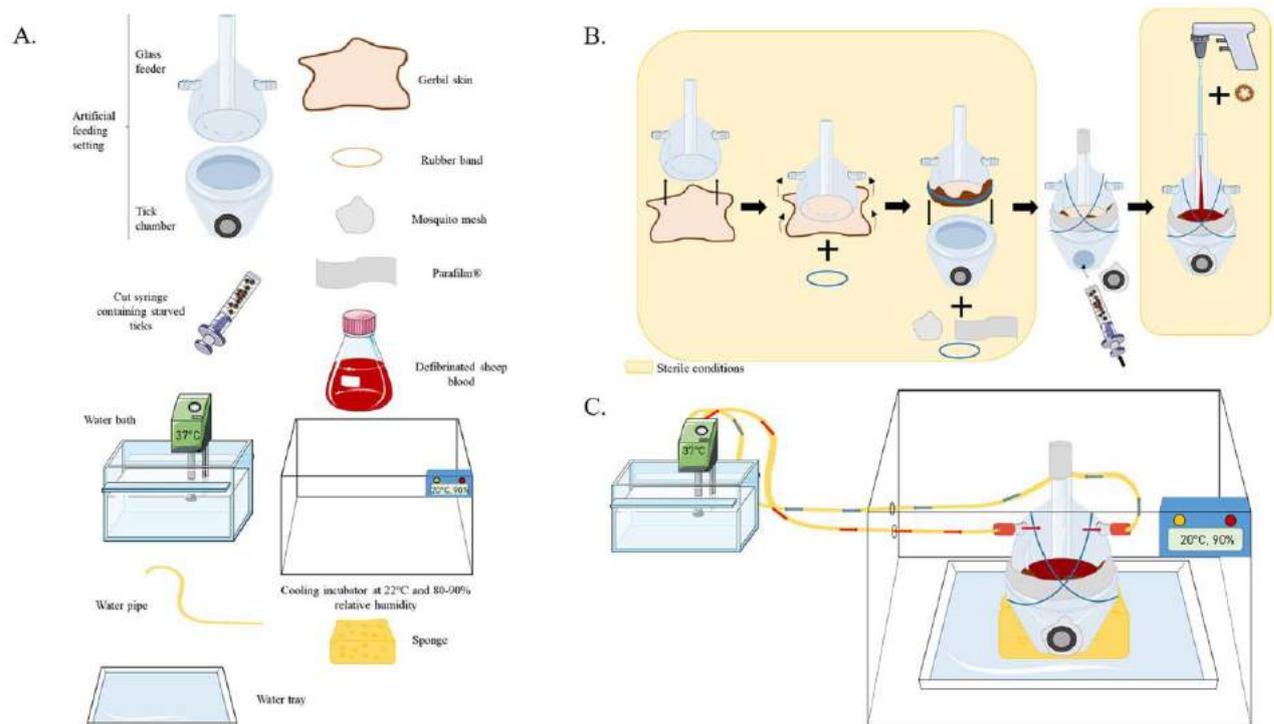
**Mice.** TBEV-infected ticks from immersion experiments were fed on three weeks old specific pathogen-free (SPF) female mice of the ICR (CD1) strain (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Germany) known for their susceptibility to TBEV infections<sup>57</sup>. TBEV-infected ticks from the artificial feeding experiments, were fed on adult (4–5 weeks old) type I interferon receptor knock-out mice (IFNAR<sup>-/-</sup>, genetic background: A129SvEvBrd) kindly provided by Prof. Michel Aguet (Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne)<sup>58,59</sup>. These mice are also susceptible for TBEV infections and develop severe clinical signs ending by death around day 6 post-infection<sup>60</sup>.

BALB/c female mice (7 weeks old) (Charles River Company, Saint Germain Nuelles, France) and IFNAR<sup>-/-</sup> female mice (10 weeks old) were used for feeding KEMV-infected ticks. BALB/c mice were used for feeding after immersing ticks in the viral suspension and for assessing the transmission of the virus to the vertebrate host. IFNAR<sup>-/-</sup> mice were used for assessing the virus transmission from the infected ticks to the host only. The use of these strains is warranted by previous findings. BALB/c mice are commonly used for infection with orbiviruses<sup>61</sup>, and IFNAR<sup>-/-</sup> usually develop severe clinical signs of infection with KEMV, including neurological signs, haemorrhage, and prostration (Camille Migné PhD thesis, in progress). In addition, IFNAR<sup>-/-</sup> mice are well known to be susceptible for orbivirus infections<sup>55,62</sup>.

The mice were individually held in plastic cages with wood-chip bedding, fed ad libitum and kept in standardised conditions (22 °C, 65% relative air humidity, 12:12 light/dark cycle) at the SPF animal facilities of the Institute of Parasitology and ANSES. The present research was conducted in compliance with all relevant European Union guidelines for work with animals and with the Czech or French national law guidelines on the use of experimental animals and protection of animals against cruelty. Experimental protocols were approved by the



**Figure 2.** Schematic representation of the experimental design for assessing vector competence of ticks for pathogens through immersion technique and artificial feeding. (A) pathogen acquisition, (B) trans-stadial pathogen transmission and (C) transmission of the pathogen to a vertebrate host. Ticks were allowed to feed to repletion and harvested immediately after feeding. Real-time RT-PCR is performed to specifically detect the pathogen’s RNA in ticks and mice at different steps of the protocol.



**Figure 3.** Schematic representation of (A) the necessary material, (B) the setting of the tick artificial feeding system and (C) the complete assembly of the system (adapted from<sup>13</sup>).

Committee on the Ethics of Animal Experimentation at the Institute of Parasitology, the Departmental Expert Committee for Approval of Projects of Experiments on Animals at the Czech Academy of Sciences (Permit No. 29/2016) and by ANSES-ENVA-UPEC Ethics Committee for Animal Experimentation (Agreement Number: 13-021, 19-004, 19-005 and 19-028).

**Tick infection by artificial feeding.** The previously described tick AFS<sup>14</sup> was used to infect *I. ricinus* with TBEV and KEMV. The system, material and the setting are shown in Fig. 3. All procedures with the artificial feeding system were performed under sterile conditions. A cut gerbil skin were used to feed larvae as described in<sup>14</sup>. Commercial defibrinated sheep blood was purchased from Eurobio scientific (France). Before use, the blood was supplemented with 17 U/mL of heparin (Merck, Germany). Gentamicin (Invitrogen, Germany) and Amphotericin B (Invitrogen, Germany) at a final concentration of 10 mg/mL and 250 µg/mL, respectively. For infection studies, the blood was directly spiked with  $10^5$  PFU/mL for TBEV<sup>63–65</sup> or  $10^4$  PFU/mL for KEMV<sup>55</sup>. For each experiment, control and infected settings were used in parallel. Ticks were placed in the tick chamber and enclosed with a mosquito mesh allowing them to breathe. To attract ticks, the setting was maintained at 37 °C by a circulating warmed water circuit (Fig. 3C)<sup>14</sup>.

For TBEV infection, triplicate feeders (per experiment) were used for virus-spiked or clean bloods. Approximately 3,000 larvae were placed in each chamber. Ticks for KEMV experimentation were a gift from colleagues in Slovakia. We thus used a single setting for KEMV-spiked blood and a single control setting each containing approximately 2,000 larvae, availability of ticks being here a limiting factor.

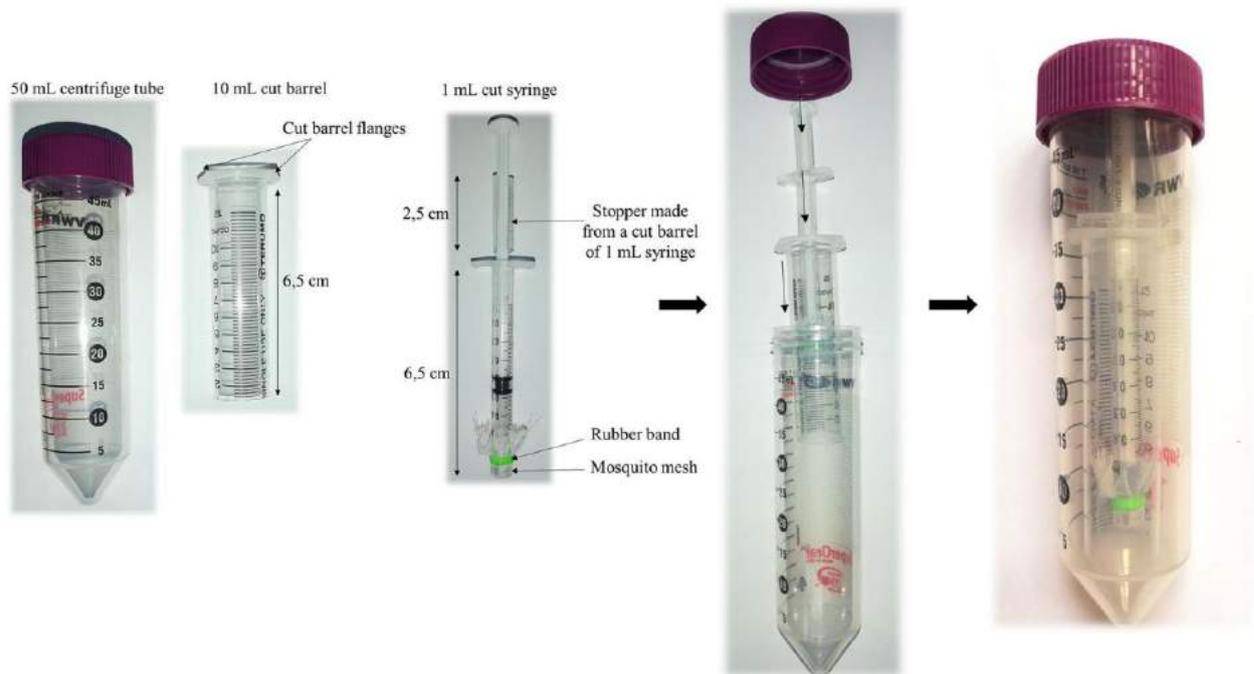
**Assessment of virus infectivity in sheep blood and frequency of blood changes.** The frequency of blood changes in the AFS was decided based on an initial assessment of virus infectivity in sheep blood spiked with cell-culture derived TBEV or KEMV.

TBEV infectivity in sheep blood was assessed over a time course of 30 h. The blood was spiked with  $10^5$  PFU/ml using a fresh TBEV suspension. Blood samples were recovered from the setting at 0, 4, 8, 10, 24 and 30 h and titrated by plaque assay as described above. TBEV was titrated at different time's intervals after blood spiking. After 10 h post-infection, the titre decreased by about 1.5 log.

Similarly, sheep blood was spiked with  $10^4$  PFU/ml of fresh KEMV suspension and blood samples were recovered at 0, 4, 8, 10 and 24 h post-spiking and assessed by real-time RT-PCR. We observed a slight drop in KEMV genome copy numbers after 12 h (see Supplementary Figure S1).

Blood was changed daily for control ticks. We decided to replace TBEV or KEMV spiked sheep blood in the AFS twice a day to avoid any potential reduction of infectious virus titres in the system.

**Tick collection.** Ticks were allowed to feed to repletion. Feeding experiments usually took six days with an attachment rate to the membrane skin of around 90% and a repletion rate of 80–90% of engorged larvae<sup>14</sup>.



**Figure 4.** Material to infect ticks using the immersion technique.

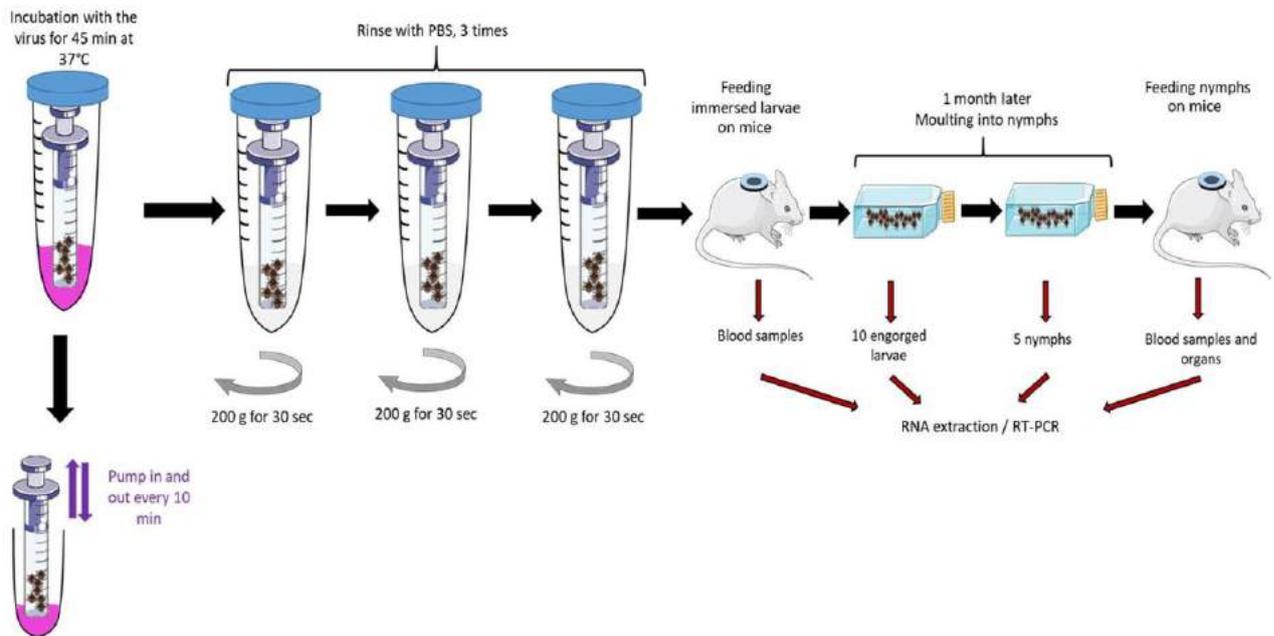
A randomly chosen subset of engorged larvae (20 and 30 engorged larvae for TBEV and KEMV settings, respectively) was placed at  $-80^{\circ}\text{C}$  immediately after collection to further detect viral RNA.

**Tick infection through immersion technique.** The IT was initially developed to infect *Ixodes scapularis* with *Borrelia burgdorferi*<sup>15</sup> and Langkat virus<sup>21</sup> and adapted here for TBEV and KEMV.

**Tick immersion in the virus suspension.** To immerse ticks easily, the tip of a 1 mL syringe was cut and covered with a mosquito mesh attached with a rubber band. Between 100 and 200 larvae were placed in this syringe, inserted into another syringe of 10 mL, the tip of which was also cut (acts as holder for the smaller syringe), and finally inserted into a 50 mL centrifuge tube (Fig. 4). Ticks were immersed in a non-diluted virus suspension ( $4.4 \times 10^6$  PFU/mL for KEMV and  $2.5 \times 10^8$  PFU/mL for TBEV) of 5 mL for 45 min at  $37^{\circ}\text{C}$ . The fluid was pumped in and out using the plunger every 10 min to ensure immersion of all ticks. Ticks were then rinsed three times with PBS and centrifuged at 200 g for 30 s to remove the supernatant between each washing (Fig. 5). The 50 mL falcon tube and the syringe holder were changed between the washings. Immediately after the procedure, ticks were placed on mice within a capsule system (feeding chamber) as described previously<sup>66</sup>. Briefly, feeding chambers were mounted on a shaved spot at the back of the mouse close to the neck. Mouse cages were placed over water reservoirs, which serve as traps to prevent escape of ticks in case of accidental chamber damage. Three female mice of the ICR (CD1) strain were used for feeding TBEV-immersed ticks and eight female BALB/c mice were used for feeding KEMV-immersed ticks.

**Tick collection.** Ticks were allowed to feed for four days. The first engorged larvae were collected on day three post-infestation and the latest on day four post-infestation. Symptoms of infection and/or mortality of mice were monitored throughout the experiments which lasted for 5 days post-infestation for KEMV and 11 days post-infestation for TBEV. Blood samples were collected only from mice used in the KEMV experiment. Engorged larvae were placed in flasks and maintained at a relative humidity of 95% at  $22^{\circ}\text{C}$ . Between 9–12 engorged larvae per mouse were randomly chosen and stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  to check for the presence of viral RNA.

**Virus transmission to mice following experimental infections.** To check if nymphs which were infected at the preceding larval stage can transmit the virus to a vertebrate host, ticks were placed on mice within a capsule system as described above. Nymphs which moulted from larvae infected with TBEV were fed on IFNAR<sup>-/-</sup> (larvae infected using artificial feeding) or CD1 (larvae immersed in TBEV suspension) mice. Nymphs which moulted from larvae infected with KEMV were fed on IFNAR<sup>-/-</sup> mice or BALB/c mice. Symptoms of the infection and/or mortality were recorded for each mouse throughout the experiments. At the end of the experiments (6 and 10 days post-infestation for TBEV and KEMV, respectively), mouse blood and organs (brain, spleen, liver, heart and lungs) were sampled (except for TBEV/IT, where only symptoms and/or death were recorded). Presence of virus in mouse blood and tissue samples was assessed by real-time RT-PCR for TBEV and KEMV as described below. All procedures are summarised in Table 3.



**Figure 5.** Schematic representation of the immersion technique used to infect ticks with KEMV and TBEV (adapted from<sup>14,20</sup>).

| Methods used to infect larval stages | Virus | Infestation date after moulting (months) | Number of mice       |        |     | Nymphs per mouse | Organ sampling | Blood sampling | End (days post-infestation) |
|--------------------------------------|-------|--|----------------------|--------|-----|------------------|----------------|----------------|-----------------------------|
|                                      |       |  | IFNAR <sup>-/-</sup> | BALB/c | CD1 |                  |                |                |                             |
| Artificial feeding                   | TBEV  | 12                                       | 1                    | -      | -   | 2                | Yes            | Yes            | 6                           |
|                                      | KEMV  | 5  | 4                    | 4      | -   | 30               | Yes            | Yes            | 10                          |
| Immersion                            | TBEV  | 3–12                                     | -                    | -      | 14  | 10               | No             | No             | 30                          |
|                                      | KEMV  | 5  | 4                    | 4      | -   | 30               | Yes            | Yes            | 10                          |

**Table 3.** Experimental design of virus transmission from nymphs infected at the larval stage to a vertebrate host.

**Virus detection by real-time RT-PCR.** Virus acquisition by larvae, trans-stadial transmission from larvae to nymph, and transmission from nymphs to mice were assessed by detecting virus genome in both ticks and mouse organs and blood, using real time RT-PCR.

For RNA extraction, ticks were homogenised individually (except engorged nymphs after assessing TBEV transmission to the mice, which were pooled 2 by 2), in 350 µL of lysis buffer and 3.5 µL of β-mercaptoethanol with six stainless-steel beads (2.8 mm diameter) using Precellys®24 Dual homogeniser (Bertin, Paris, France) at 5500 × rpm for 20 s or a single sterile stainless-steel bead (5 mm diameter) in TissueLyzer II (Qiagen, Hilden, Germany) at 30 Hz for 3 min. RNA was then extracted from individual ticks, pooled ticks or 40 µL of whole mouse blood using NucleoSpin® RNA extract II (Macherey Nagel, Germany) as described by the manufacturer. All mouse organs were individually homogenised (½ heart, ½ lung, ½ spleen, ¼ liver, ½ brain) in 1 mL of DMEM culture medium supplemented with 10% FBS with six stainless-steel beads using the Precellys®24 Dual homogeniser at 5500 rpm for 20 s. RNA was extracted from 500 µL of homogenate using NucleoSpin® RNA extract II kit (Macherey Nagel, Germany). All RNA samples were eluted in 30 µL of RNase-free water and stored at -80 °C until further used.

Tick or organ lysates were tested individually by real-time RT-PCR. Because the genome of KEMV consists of segmented double-stranded RNA, heat-denaturation is a prerequisite for a successful reverse transcription<sup>67</sup>. Thus, before real-time RT-PCR, the dsRNA is heat denatured at 99 °C for 5 min using an appropriate heating system, such as a thermal cycler. Renaturation of dsRNA must be prevented by immediately quenching the tubes on wet ice. Reverse transcription was performed using the qScript cDNA Supermix kit (Quanta Biosciences, Beverly, USA) as previously described<sup>68</sup>. The reaction was carried out in a final volume of 5 µL containing 1 µL of qScript cDNA Supermix 5X, 3 µL of RNase-free water and 1 µL of RNA. The thermal cycling programme consisted of a single cycle at 25 °C for 5 min, followed by one cycle at 42 °C for 30 min and one final cycle at 85 °C for 5 min. DNA preamplification was performed in presence of primers KEMV\_F -GTCAGACGGATTTTCGAC CTC- and KEMV\_R -GCGAGCCAGATCCCGATGT, targeting genome segment 2 (encoding the VP2 protein). The preamplification was carried out in a final volume of 5 µL, containing 1 µL of 5X Perfecta Preamp Supermix (Fluidigm, USA), 1.25 µL of primers solution (0.2 µM final concentration each), 1.5 µL of distilled water and

1.25 µL of KEMV cDNA. The PCR cycling programme consisted of one cycle at 95 °C for 2 min, 14 successive cycles of denaturation at 95 °C for 15 s and amplification at 60 °C for 4 min. The pre-amplified DNA were 1:2 diluted and stored at –20 °C until further used. The real-time PCR was performed using the LightCycler® 480 Probes Master kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Germany). The following primers and probe were used: KEMV\_F (final concentration: 0.5 µM), KEMV\_R (final concentration: 0.5 µM) and KEMV\_P ACGGGCCAACACTCGTTCATCACAG (final concentration: 0.25 µM)<sup>68</sup>. All samples were tested in duplicates. The PCR cycling programme consisted of one cycle at 95 °C for 30 s, 45 successive cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 1 s. The programme ended by a cooling cycle at 40 °C for 30 s.

TBEV RNA was detected using either the genisig Tick-borne encephalitis virus Polyprotein Advanced Kit (Primerdesign, UK) together with Oasig™ lyophilised OneStep qRT-PCR Mastermix (Primerdesign, UK) or LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes kit following manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Germany). The following primers and probes, targeting the 3' non coding region (3'NCR), were used: TBEV\_F GGGCGGTTCTTGTCTCC (final concentration: 0.5 µM), TBEV\_R ACACATCACCTCCTTGTC AGACT (final concentration: 0.5 µM) and TBEV\_P TGAGCCACCATCACCCAGACACA (final concentration: 0.25 µM)<sup>69</sup>. The PCR cycling programme consisted of one cycle of reverse transcription at 63 °C for 3 min, followed by one cycle at 95 °C for 30 s, 45 successive cycles at 95 °C for 10 s, 60 °C for 30 s and 72 °C for 1 s. The programme ended by a cooling cycle at 40 °C for 30 s.

**Approval for animal experiments.** The authors confirm the study was carried out in compliance with the ARRIVE guidelines.

### Data availability

Data are available upon request from the corresponding author.

Received: 30 August 2021; Accepted: 8 December 2021

Published online: 11 January 2022

### References

- Springer, A., Glass, A., Probst, J. & Strube, C. Tick-borne zoonoses and commonly used diagnostic methods in human and veterinary medicine. *Parasitol. Res.* <https://doi.org/10.1007/s00436-020-07033-3> (2021).
- Wikel, S. K. Ticks and tick-borne infections: Complex ecology, agents, and host interactions. *Vet. Sci.* **5**(2), 60 (2018).
- Jongejan, F. & Uilenberg, G. The global importance of ticks. *Parasitology* **129**, 3–14 (2004).
- Labuda, M. & Nuttall, P. A. Tick-borne viruses. *Parasitology* **129**, 221–245 (2004).
- Shi, J., Hu, Z., Deng, F. & Shen, S. Tick-borne viruses. *Virol. Sin.* **33**(1), 21–43 (2018).
- Bonnet, S. & Liu, X. Y. Laboratory artificial infection of hard ticks: A tool for the analysis of tick-borne pathogen transmission. *Acarologia* **52**(4), 453–464 (2012).
- Nuttall, P. A., Jones, L. D., Labuda, M. & Kaufman, W. R. Adaptations of arboviruses to ticks. *J. Med. Entomol.* **31**(1), 1–9 (1994).
- Jones, L. D., Hodgson, E. & Nuttall, P. A. Enhancement of virus transmission by tick salivary glands. *J. Gen. Virol.* **70**(7), 1895–1898 (1989).
- de la Fuente, J. *et al.* Tick–pathogen interactions and vector competence: Identification of molecular drivers for tick-borne diseases. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**(April), 1–13 (2017).
- Belova, O. A. *et al.* Properties of the tick-borne encephalitis virus population during persistent infection of ixodid ticks and tick cell lines. *Ticks Tick Borne Dis.* **8**(6), 895–906 (2017).
- Slovák, M. *et al.* Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* **5**(6), 962–969 (2014).
- Hurlbut, H. & Thomas, J. The experimental host range of the arthropod-borne animal viruses in arthropods. *Virology* **12**, 391–407 (1960).
- Talactac, M. R. *et al.* Vector competence of *Haemaphysalis longicornis* ticks for a Japanese isolate of the Thogoto virus. *Sci. Rep.* **8**(1), 1–8 (2018).
- Bonnet, S. *et al.* Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology* **134**(2), 197–207 (2007).
- Policastro, P. F. & Schwan, T. G. Experimental infection of *Ixodes scapularis* Larvae (Acari: Ixodidae) by immersion in low passage cultures of *Borrelia burgdorferi*. *J. Med. Entomol.* **40**(3), 364–370 (2003).
- Bonnet, S., Brisseau, N., Hermouet, A., Jouglin, M. & Chauvin, A. Experimental in vitro transmission of *Babesia* sp. (EU1) by *Ixodes ricinus*. *Vet. Res.* **40**(3), 1–8 (2009).
- Cotté, V. *et al.* Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. *Emerg. Infect. Dis.* **14**(7), 1074–1080 (2008).
- Wechtaison, W., Bonnet, S. I., Lien, Y. Y., Te Chuang, S. & Tsai, Y. L. Transmission of *Bartonella henselae* within rhipicephalus sanguineus: Data on the potential vector role of the tick. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **14**(10), 1–14 (2020).
- Liu, X. Y., Cote, M., Paul, R. E. L. & Bonnet, S. I. Impact of feeding system and infection status of the blood meal on *Ixodes ricinus* feeding. *Ticks Tick Borne Dis.* **5**(3), 323–328 (2014).
- Reis, C. *et al.* Vector competence of the tick *Ixodes ricinus* for transmission of *Bartonella birtlesii*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **5**(5), 1–6 (2011).
- Mitzel, D. N. *et al.* Tick-borne flavivirus infection in *Ixodes scapularis* larvae: Development of a novel method for synchronous viral infection of ticks. *Virology* **365**(2), 410–418 (2007).
- Labuda, M. *et al.* An antivector vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen. *PLoS Pathog.* **2**(4), 251–259 (2006).
- Labuda, M. *et al.* Non-viraemic transmission of tick-borne encephalitis virus: A mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia* **49**(9), 802–805 (1993).
- Labuda, M. *et al.* Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission. *Virology* **219**(2), 357–366 (1996).
- Rizzoli, A. *et al.* *Ixodes ricinus* and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: New hazards and relevance for public health. *Front. Public Health* **2**, 1–26 (2014).
- Valarcher, J. F., Hägglund, S., Juremalm, M. & Blomqvist, G. Tick-borne encephalitis. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* **34**(2), 453–466 (2015).
- Chumakov, M. Report on the isolation from *Ixodes persulcatus* ticks and from patients in western Siberia of a virus differing from the agent of tick-borne encephalitis. *Acta Virol.* **7**, 82–83 (1963).

28. Tkachev, S., Panov, V., Dobler, G. & Tikunova, N. First detection of Kemerovo virus in *Ixodes pavlovskiyi* and *Ixodes persulcatus* ticks collected in Novosibirsk region, Russia. *Ticks Tick Borne Dis.* **5**(5), 494–496 (2014).
29. Dedkov, V. G. *et al.* Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation. *Ticks Tick Borne Dis.* **5**(6), 651–655 (2014).
30. Chihota, C. M., Rennie, L. F., Kitching, R. P. & Mellor, P. S. Mechanical transmission of lumpy skin disease virus by *Aedes*. *Epidemiol. Infect.* **126**, 317–321 (2001).
31. Brault, V., Uzest, M., Monsion, B., Jacquot, E. & Blanc, S. Aphids as transport devices for plant viruses. *Comptes Rendus Biol.* **333**(6–7), 524–538 (2010).
32. Gritsun, T. S., Nuttall, P. A. & Gould, E. A. Tick-borne flaviviruses. *Adv. Virus Res.* **61**, 317–371 (2003).
33. Steele, G. M. & Nuttall, P. A. Difference in vector competence of two species of sympatric ticks, *Amblyomma variegatum* and *Rhipicephalus appendiculatus*, for Dugbe virus (Nairovirus, Bunyaviridae). *Virus Res.* **14**(1), 73–84 (1989).
34. Mandl, C. W. Steps of the tick-borne encephalitis virus replication cycle that affect neuropathogenesis. *Virus Res.* **111**(2), 161–174 (2005).
35. Laureti, M., Narayanan, D., Rodriguez-Andres, J., Fazakerley, J. K. & Kedzierski, L. Flavivirus receptors: Diversity, identity, and cell entry. *Front. Immunol.* **9**, 2180 (2018).
36. Hassan, S. H. & Roy, P. Expression and functional characterization of Bluetongue Virus VP2 protein: Role in cell entry. *J. Virol.* **73**(12), 9832–9842 (1999).
37. Patel, A. & Roy, P. The molecular biology of Bluetongue virus replication. *Virus Res.* **182**, 5–20 (2014).
38. Mertens, P. P. C. *et al.* Enhanced infectivity of modified bluetongue virus particles for two insect cell lines and for two *Culicoides* vector species. *Virology* **217**(2), 582–593 (1996).
39. Tan, B.-H. *et al.* RGD tripeptide of Bluetongue Virus VP7 protein is responsible for core attachment to *Culicoides* cells. *J. Virol.* **75**(8), 3937–3947 (2001).
40. Šimo, L., Kazimirova, M., Richardson, J. & Bonnet, S. I. The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, 1–23 (2017).
41. Libikova, H., Rehacek, J. & Somogyiavo, J. Viruses related to the Kemerovo virus in *Ixodes ricinus* ticks in Czechoslovakia. *Acta Virol.* **9**, 76–82 (1965).
42. Kingsolver, M. B., Huang, Z. & Hardy, R. W. Insect antiviral innate immunity: Pathways, effectors, and connections. *J. Mol. Biol.* **425**(24), 4921–4936 (2013).
43. Schmettler, E. *et al.* Induction and suppression of tick cell antiviral RNAi responses by tick-borne flaviviruses. *Nucleic Acids Res.* **42**(14), 9436–9446 (2014).
44. Hornok, S., Horváth, G., Jongejan, F. & Farkas, R. Ixodid ticks on ruminants, with on-host initiated moulting (apolyosis) of *Ixodes, Haemaphysalis* and *Dermacentor* larvae. *Vet. Parasitol.* **187**(1–2), 350–353 (2012).
45. Liebig, K. *et al.* Tick populations from endemic and non-endemic areas in Germany show differential susceptibility to TBEV. *Sci. Rep.* <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71920-z> (2020).
46. Ciota, A. T. *et al.* Effects of Zika virus strain and *Aedes* mosquito species on vector competence. *Emerg. Infect. Dis.* **23**(7), 1110–1117 (2017).
47. Zouache, K. *et al.* Three-way interactions between mosquito population, viral strain and temperature underlying chikungunya virus transmission potential. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **281**(1792), 20141078 (2014).
48. Paslaru, A. L., Mathis, A., Torgerson, P. & Veronesi, E. Vector competence of pre-alpine *Culicoides* (Diptera: Ceratopogonidae) for bluetongue virus serotypes 1, 4 and 8. *Parasit. Vectors* **11**(1), 1–12 (2018).
49. Moutailler, S., Krida, G., Schaffner, F., Vazeille, M. & Failloux, A. B. Potential vectors of Rift Valley fever virus in the Mediterranean region. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **8**(6), 749–754 (2008).
50. Vega-Rua, A., Zouache, K., Girod, R., Failloux, A.-B. & Lourenco-de-Oliveira, R. High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya Virus. *J. Virol.* **88**(11), 6294–6306 (2014).
51. Veronesi, E. *et al.* Measurement of the infection and dissemination of Bluetongue Virus in *Culicoides* biting midges using a semi-quantitative RT-PCR assay and isolation of infectious virus. *PLoS ONE* **8**(8), 1–8 (2013).
52. Wallner, G. *et al.* Characterization and complete genome sequences of high- and low-virulence variants of tick-borne encephalitis virus. *J. Gen. Virol.* **77**(5), 1035–1042 (1996).
53. Yasumura, Y. & Kawakita, Y. Studies on SV40 in tissue culture—preliminary step for cancer research in vitro. *Nihon Rinsho* **21**, 1201–1212 (1963).
54. Sato, M., Maeda, N., Yoshida, H., Urade, M. & Saito, S. Plaque formation of herpes virus hominis type 2 and rubella virus in variants isolated from the colonies of BHK21/WI-2 cells formed in soft agar. *Arch. Virol.* **53**(3), 269–273 (1977).
55. Mohd Jaafar, F. *et al.* Immunisation with bacterial expressed VP2 and VP5 of bluetongue virus (BTV) protect  $\alpha/\beta$  interferon-receptor knock-out (IFNAR<sup>-/-</sup>) mice from homologous lethal challenge. *Vaccine* **32**(32), 4059–4067 (2014).
56. Mohd Jaafar, F., Attoui, H., Mertens, P. P. C., De Micco, P. & De Lamballerie, X. Structural organization of an encephalitic human isolate of Banna virus (genus *Seadornavirus*, family *Reoviridae*) Printed in Great Britain. *J. Gen. Virol.* **86**, 1147–1157 (2005).
57. Helmová, R. *et al.* Tick-borne encephalitis virus adaptation in different host environments and existence of quasispecies. *Viruses* **12**(8), 1–17 (2020).
58. Huang, S. *et al.* Immune response in mice that lack the interferon-gamma receptor (see comments). *Science* **259**, 1742–1745 (1993).
59. Müller, U. *et al.* Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* **264**, 1918–1921 (1994).
60. Weber, E. *et al.* Type I interferon protects mice from fatal neurotropic infection with Langat virus by systemic and local antiviral responses. *J. Virol.* **88**(21), 12202–12212 (2014).
61. Karabatsos, N. *International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates* 3rd edn. (American Society of Tropical Medicine and Hygiene for The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses, 1985).
62. Calvo-Pinilla, E., Rodriguez-Calvo, T., Anguita, J., Sevilla, N. & Ortego, J. Establishment of a bluetongue virus infection model in mice that are deficient in the alpha/beta interferon receptor. *PLoS ONE* **4**(4), e5171 (2009).
63. Haviernik, J. *et al.* An E460D substitution in the NS5 protein of tick-borne encephalitis virus confers resistance to the inhibitor Galidesivir (BCX4430) and also attenuates the virus in mice. *Proceedings* **50**(1), 12 (2020).
64. Radda, A., Hofmann, H. & Pretzmann, G. Threshold of viraemia in *Apodemus flavicollis* for infection of *Ixodes ricinus* with tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol.* **13**(1), 74–77 (1969).
65. Chunikhin, S. P. & Kurenkov, V. Viraemia in *Clethrionomys glareolus*—A new ecological marker of tick-borne encephalitis virus. *Acta Virol.* **23**(3), 257–260 (1979).
66. Mateos Hernandez, L. A capsule-based model for immature hard tick stages infestation on laboratory mice. *JoVE* <https://doi.org/10.3791/61430> (2020).
67. Attoui, H. *et al.* Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes. *J. Virol. Methods* **89**(1–2), 147–158 (2000).
68. Gondard, M. *et al.* Prevalence of tick-borne viruses in *Ixodes ricinus* assessed by high-throughput real-time PCR. *Pathog. Dis.* **76**(8), 1–13 (2018).
69. Schwaiger, M. & Cassinotti, P. Development of a quantitative real-time RT-PCR assay with internal control for the laboratory detection of tick borne encephalitis virus (TBEV) RNA. *J. Clin. Virol.* **27**, 136–145 (2003).

## Acknowledgements

We thank the “Tiques et Maladies à Tiques (TMT)” group of the CNRS “Réseau Ecologie des Interactions Durables” for stimulating discussion and support. We thank Océane Le Bidet and Alain Bernier for their help in the animal facilities.

## Author contributions

Conceptualization, D.R., H.A. and S.M.; methodology, C.V.M., V.H., M.P., S.R., C.G., A.H., E.V., E.D.; formal analysis, C.V.M., V.H., M.P., S.R., C.G., A.H., E.V., E.D.; writing—original draft preparation, C.V.M., V.H.; writing—review and editing, C.V.M., V.H., M.P., D.R., H.A., S.B., S.M.; supervision, D.R., H.A., S.M.; funding acquisition, D.R. and S.M. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

## Funding

VH, MP, EV and DR were supported by the Czech Science Foundation project No. 20-14325S. CVM, HA, SB and SM research were supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES) and the French National Institute for Agricultural Research (INRAE). UMR BIPAR is supported by the French Government’s Investissement d’Avenir program, Laboratoire d’Excellence “Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases” (grant No. ANR-10-LABEX-62-IBEID).

## Competing interests

The authors declare no competing interests.

## Additional information

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41598-021-04498-9>.

**Correspondence** and requests for materials should be addressed to S.M.

**Reprints and permissions information** is available at [www.nature.com/reprints](http://www.nature.com/reprints).

**Publisher’s note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article’s Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article’s Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

## Supplementary Material for

### Evaluation of two artificial infection methods of live ticks as tools for studying interactions between tick-borne viruses and their tick vectors

Camille Victoire Migné <sup>1,2\*</sup>, Vaclav Hönig <sup>3,4\*</sup>, Sarah I Bonnet <sup>1</sup>, Martin Palus <sup>3,4</sup>, Sabine Rakotobe <sup>1</sup>, Clémence Galon <sup>1</sup>, Aurélie Heckmann<sup>1</sup>, Eva Vyletova<sup>3,5</sup>, Elodie Devillers<sup>1</sup>, Houssam Attoui <sup>2</sup>, Daniel Ruzek <sup>3,4</sup>, Sara Moutailler <sup>1#</sup>

<sup>1</sup> Anses, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale, Maisons-Alfort, F-94700, France;

<sup>2</sup> UMR1161 Virologie INRAE, Anses, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, F-94700, France;

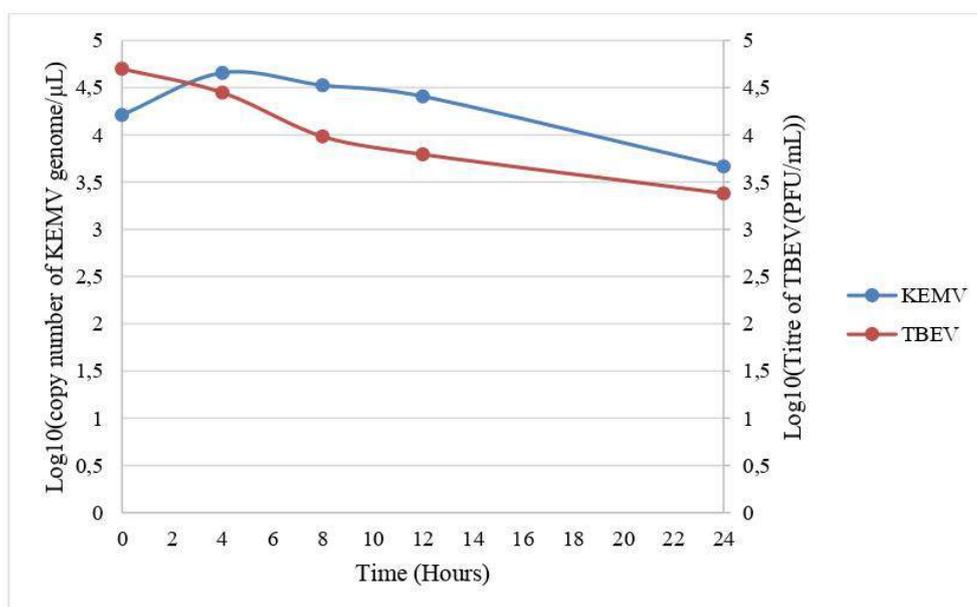
<sup>3</sup> Institute of Parasitology, Biology Centre, Czech Academy of Sciences, Branisovska 31, 370 05, Ceske Budejovice, Czech Republic

<sup>4</sup> Emerging Viral Diseases Research Group, Veterinary Research Institute, Hudcova 296/70, 621 00, Brno, Czech Republic

<sup>5</sup> Faculty of Agriculture & Faculty of Science, University of South Bohemia, Branisovska 31, 370 05, Ceske Budejovice, Czech Republic

\* Authors contributed equally

# Correspondence: Sara Moutailler, sara.moutailler@anses.fr



Supplementary Figure S1: Copy numbers of KEMV genome and virus titres (PFU/mL) of TBEV over 24 hours in sheep blood

# Chapitre 1b

## Compétence vectorielle des tiques du genre *Ixodes* pour KEMV

### Introduction du chapitre 1b

Il a été démontré que la compétence vectorielle d'un vecteur arthropode pour un arbovirus donné dépendait de plusieurs facteurs biologiques tels que la souche virale et l'espèce de l'arthropode. En effet des études menées avec des virus transmis par les moustiques (virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV) et virus chikungunya (CHIK)) (Sara Moutailler et al. 2008) (Vega-Rua et al. 2014) et d'autres avec le virus de la peste porcine africaine (ASFV) (Pereira de Oliveira et al. 2019) (Pereira De Oliveira et al. 2020) ont montré l'importance de la souche virale utilisée ainsi que l'origine des arthropodes lors d'essais d'infection et de compétence vectorielle. Le virus Kemerovo a été isolé en 1962 à partir de femelles *I. persulcatus* et plus tard détecté chez *I. ricinus* en Russie. Dans cette étude, la compétence vectorielle des tiques *I. ricinus* collectées en France et *I. persulcatus* de Russie a été testée pour KEMV. De plus, pour compléter l'étude précédente, la compétence vectorielle des tiques *I. ricinus* de Slovaquie a de nouveau été éprouvée avec une infection effectuée au stade nymphal pour mettre en évidence un potentiel « effet stade d'infection ». L'ensemble de ces travaux est présenté dans ce manuscrit sous forme d'article.

**ARTICLE:** C.V. Migné *et al.*, "Evaluation of vector competence of *Ixodes* ticks for Kemerovo virus", submitted Viruses, 2021.

# Evaluation of vector competence of *Ixodes* ticks for Kemerovo virus

Camille Victoire Migné<sup>1,2</sup>, Hélène Braga de Seixas<sup>1</sup>, Aurélie Heckmann<sup>1</sup>, Clémence Galon<sup>1</sup>, Fauziah Mohd Jaafar, Baptiste Monsion, Houssam Attoui<sup>2\*</sup> and Sara Moutailler<sup>1\*</sup>

- <sup>1</sup> Anses, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale, Maisons-Alfort, F-94700, France ; [camille.migne.ext@anses.fr](mailto:camille.migne.ext@anses.fr); [helene.bragadeseixas.ext@anses.fr](mailto:helene.bragadeseixas.ext@anses.fr); [aurelie.heckmann@anses.fr](mailto:aurelie.heckmann@anses.fr); [clemence.galon@anses.fr](mailto:clemence.galon@anses.fr); [sara.moutailler@anses.fr](mailto:sara.moutailler@anses.fr)
- <sup>2</sup> UMR1161 Virologie INRAE, Anses, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, F-94700, France; [fauziah.mohd-jaafar@vet-alfort.fr](mailto:fauziah.mohd-jaafar@vet-alfort.fr); [baptiste.monsion@vet-alfort.fr](mailto:baptiste.monsion@vet-alfort.fr) [houssam.attoui@vet-alfort.fr](mailto:houssam.attoui@vet-alfort.fr)
- \* Correspondence: [houssam.attoui@vet-alfort.fr](mailto:houssam.attoui@vet-alfort.fr); Tel.: +33 1 43 96 70 07; [sara.moutailler@anses.fr](mailto:sara.moutailler@anses.fr); Tel.: +33 1 49 77 46 50

**Abstract:** Tick-borne viruses are responsible for various symptoms in humans and animals, ranging from simple fever to neurological disorders or haemorrhagic fevers. Kemerovo virus (KEMV) is a tick-borne orbivirus which was suspected to be responsible for human encephalitis cases in Russia and central Europe. It was isolated from *Ixodes persulcatus* and *Ixodes ricinus* ticks. In a previous study, we assessed vector competence of *I. ricinus* larvae from Slovakia for KEMV, using an artificial feeding system. In the current study, we used the same system to infect different tick population/species, including *I. ricinus* larvae from France and nymphs from Slovakia and *I. persulcatus* larvae from Russia. We successfully confirmed the first two criteria of vector competence, including virus acquisition and trans-stadial transmission for both tick species which we have tested. However, the animal model we used was probably not optimal to confirm the third criterion of vector competence, given the high minimum infectious dose of KEMV required to infect IFNAR<sup>-/-</sup> mice. The observations resulting from this study suggest specificities between viral strains and tick species/developmental stages.

**Citation:** Lastname, F.; Lastname, F.; Lastname, F. Title. *Viruses* 2021, 13, x. <https://doi.org/10.3390/xxxxx>

**Keywords:** ticks, Kemerovo virus, tick-borne orbivirus, vector competence

Academic Editor: Firstname Lastname

Received: date  
Accepted: date  
Published: date

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 0. How to Use This Template

The template details the sections that can be used in a manuscript. Note that each section has a corresponding style, which can be found in the "Styles" menu of Word. Sections that are not mandatory are listed as such. The section titles given are for articles. Review papers and other article types have a more flexible structure.

Remove this paragraph and start section numbering with 1. For any questions, please contact the editorial office of the journal or [support@mdpi.com](mailto:support@mdpi.com).

## 1. Introduction

Ticks are the primary vectors of pathogens for both human and animal health in Europe. They can transmit the widest variety of microorganisms, including bacteria, parasites and viruses. Among these pathogens, 170 tick-borne viruses (TBV) were identified to date. They are classified into 9 virus families and 12 genera. The TBV symptoms in humans and animals range from simple fever to neurological disorders or haemorrhagic fevers [1]. *Ixodes ricinus* is the most common tick in Europe and can transmit several pathogens that are responsible for severe diseases in human and animal, such as Lyme borreliosis, piroplasmiasis, tick-borne encephalitis,... [2].

TBV are arboviruses (arthropod-borne viruses) and their geographical distribution is correlated with their competent arthropod vectors [3]. KEMV is a tick-borne virus belonging to genus *Orbivirus* within the family *Reoviridae*. It was discovered in 1962 and first isolated from *I. persulcatus* ticks in the Kemerovo region in Russia [4]. It was also isolated from *I. ricinus* in 1964 in Czechoslovakia [5] and in 1975 in Vologda region in Russia [4]. KEMV is suspected to be responsible for human encephalitis cases in Russia and central Europe [6][7]. Studying vector competence of a tick species for a specific pathogen involves the validation of three criteria, including: pathogen acquisition (during a first blood meal on an infected host), trans-stadial transmission (from one stage to the other one) and transmission to a susceptible naïve vertebrate host (upon a new blood meal on a host). In a previous study, we assessed vector competence of *I. ricinus* ticks from Slovakia for KEMV. We used an artificial feeding system to infect larvae and validated the first two criteria of vector competence (virus acquisition and trans-stadial transmission) for this *I. ricinus* tick population. The last criterion was not shown [8]. In the current study, we used the same system to infect different tick populations from two distinct *Ixodes* tick species: *I. ricinus* larvae from France and nymphs from Slovakia and *I. persulcatus* larvae from Russia.

## 2. Materials and Methods

### 2.1 Virus

A KEMV virus stock was prepared in BSR cells (a clone of BHK-21, [9]). The virus was originally isolated from the brain of a patient who died of acute encephalitis in 1962 [6]. This isolate was further amplified once in suckling mouse brain and passaged twice in Vero cells in 1969. Before use, the initial stock of the virus was propagated three (designated KEMV smb1/Vero2/BSR3) or four (KEMV smb1/Vero2/BSR4) times in BSR cells.

#### 2.1.1 Plaque assay

KEMV titre was also determined by plaque assay as described previously [10][8]. On day 5 post-infection, BSR cell debris were pelleted by centrifugation at 2000 g for 10 minutes at 4°C. The supernatant was discarded, and cell debris were suspended in 5 mL of serum-free culture medium and treated with an equal volume organic solvent, Vertrel XF (Sigma-Aldrich, United States), to free virus particles from cell debris as described previously [11]. The mixture was shaken manually and centrifuged at 2000 g for 5 min. The aqueous phase, containing free virus particles, was carefully recovered. Briefly, BSR cells were plated ( $1 \times 10^5$  cells/well) in 24-well plates a day before running the assay in DMEM supplemented with penicillin (50 IU/mL) and streptomycin (50 µg/mL), 10% of FBS at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Ten-fold serial dilutions of the virus were prepared in serum-free DMEM and 250 µl of each dilution was added per well for 2 h at 37°C. Cells were then covered with 1 ml of molten 1% low melting point agarose in DMEM. After incubation at 37°C for 5 days, 2 mL of 10% formaldehyde was added to each well. Cells were stained with 0.1% naphthalene-black solution after removal of the agarose plugs, and plaques counted. The virus titres of KEMV smb1/Vero2/BSR3 and KEMV smb1/Vero2/BSR4 were determined as  $4.4 \times 10^6$  PFU/mL and  $10^9$  PFU/mL, respectively.

### 2.2 Ticks

In this study, we used two different tick species: *I. ricinus* and *I. persulcatus* (Table 1). Our ticks were tested for KEMV genome by real time RT-PCR prior to being used in the experimental procedure. Tested ticks included females immediately after egg laying and unfed larvae or nymphs.

Table 1: *Ixodes* ticks used for the evaluation of vector competence for KEMV

| Tick species | Origin | Generation | Stage | Tested stage for KEMV |
|--------------|--------|------------|-------|-----------------------|
|--------------|--------|------------|-------|-----------------------|

|                       |   |  |        |                         |
|-----------------------|---|--|--------|-------------------------|
| <i>I. ricinus</i>     | Slovakia (Institute of Zoology, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, Slovakia)                         | 4 <sup>th</sup> generation of a laboratory colony  | Nymph  | Unfed nymph             |
|                       | France (Provided by Sarah Bonnet, Senart forest, France)  | 1 <sup>st</sup> generation of ticks collected in the Sénart forest from the Ile de France region | Larvae | Female after egg-laying |
| <i>I. persulcatus</i> | Russia (Siberia) (Institute of Parasitology, Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic) | 3 <sup>rd</sup> generation of a laboratory colony  | Larvae | Unfed larvae            |

92

### 2.3 Mice

93

IFNAR<sup>-/-</sup> mice (8 weeks old) were used for feeding KEMV-infected ticks. IFNAR<sup>-/-</sup> mice are well known to be susceptible for orbivirus infections [10][12][13].

94

95

The present research was conducted in compliance with all relevant European Union guidelines for work with animals and with the French national law guidelines on the use of experimental animals and protection of animals against cruelty. Experimental protocols were approved by ANSES-ENVA-UPEC Ethics Committee for Animal Experimentation (Licence Number: 19-028)

96

97

98

99

100

#### 2.3.1 Determination of the minimal infectious dose of KEMV in IFNAR<sup>-/-</sup> mice

101

IFNAR<sup>-/-</sup> were tested for their susceptibility to KEMV infection by inoculating subcutaneously serial dilutions of a titrated KEMV suspension. In order to determine the minimal infectious dose, the mice were subcutaneously injected with 100 µl of a suspension with titres ranging from 0.1 to 10<sup>5</sup> PFU/ml of KEMV smb1/Vero2/BSR3. Blood samples were collected on days 0, 2, 3 and 5 in order to follow-up viraemia. The presence of KEMV in blood was assessed by real time RT-PCR as described below. Each KEMV dose was tested in two mice. Details of IFNAR mice are shown in table 2. The mice were monitored for 5 days post-inoculation and were euthanised at the end of the experiment. From previous experience with other orbiviruses, such as bluetongue or African horse sickness virus, sex had no influence on the outcome of infection [10][12][13].

102

103

104

105

106

107

108

109

110

111

Table 2: Details of IFNAR<sup>-/-</sup> mice used to determine minimum infectious dose of KEMV smb1/Vero2/BSR3 by subcutaneous inoculation

112

113

| Doses (PFU)     | Number of mice per dose | Female | Male |
|-----------------|-------------------------|--------|------|
| 10 <sup>4</sup> | 2                       | 2      | 0    |
| 10 <sup>3</sup> |                         | 1      | 1    |
| 10 <sup>2</sup> |                         | 1      | 1    |
| 10              |                         | 1      | 1    |
| 1               |                         | 0      | 2    |
| 0,1             |                         | 0      | 2    |

114

#### 2.4 Tick infection by artificial feeding

The system we used to infect ticks has been previously described [8]. Briefly, a cut gerbil skin was used to feed ticks. Commercial defibrinated sheep blood was purchased from Eurobio scientific (France). Before use, the blood was supplemented with 17 U/mL of heparin (Merck, Germany), gentamicin (Invitrogen, Germany) and amphotericin B (Invitrogen, Germany) at a final concentration of 10 mg/mL and 250 µg/mL, respectively. For infection studies, the blood was directly spiked with 10<sup>4</sup> PFU/mL for KEMV. Ticks were placed in the tick chamber and enclosed with a mosquito mesh allowing them to breathe. To attract ticks, the setting was maintained at 37°C by a circulating warmed water circuit [8]. In this study, we used 3000 *I. ricinus* larvae from France, 250 *I. ricinus* nymphs from Slovakia and 2000 *I. persulcatus* from Russia. Blood used to feed French Larvae was spiked with KEMV smb1/Vero2/BSR3 and that used to feed Slovak and Russian ticks was spiked with KEMV smb1/Vero2/BSR4.

Blood was changed twice a day (morning and evening) in order to avoid any reduction of infectious virus titre in the blood as described in [8]. Ticks were allowed to feed to repletion. Feeding experiments usually took six days with an attachment rate to the membrane skin of around 90% and a repletion rate of 80-90% of engorged larvae [14].

#### 2.5 Virus transmission to mice

To check if nymphs or adults that were infected at the preceding stage (larvae or nymph) are able to transmit KEMV to a naïve vertebrate host, ticks were placed on IFNAR<sup>-/-</sup> mice four months post-moulting. A capsule system which we previously described [15] was used to keep ticks in contact with the mouse skin. The capsule is made of with 2 layers of foam which were mounted on a shaved spot at the back close to the neck of the mouse. Ticks were allowed to feed to repletion. Thirty nymphs of *I. ricinus* or *I. persulcatus* or a couple of *I. ricinus* adult (1 male and 1 female) were placed per mouse. Table 3 summarised all the procedure. Engorged ticks were sampled at the end of the experiment and tested by real time RT-PCR for KEMV as described below.

Mice were monitored daily to identify potential clinical signs of infection. In addition, in order to follow-up the viraemia, mouse blood was sampled on days 0, 2, 6 and 10 post-infestation. At the end of the experiment, on day 10, mice were euthanised and organs were sampled (liver, spleen, kidneys, lungs, heart and brain). All samples were tested by real time RT-PCR for KEMV as described below.

Table 3: Experimental design of KEMV transmission from nymphs or adult *Ixodes* ticks infected at the preceding stage to a naïve IFNAR<sup>-/-</sup> mice

| Ticks                         | Infestation date after moulting (months) | Number of IFNAR <sup>-/-</sup> mice | Ticks per mouse | Organ sampling | Blood sampling | End (days post-infestation) |
|-------------------------------|--|-------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|-----------------------------|
| French <i>I. ricinus</i>      |  | 4                                   | 30 nymphs       |                |                |                             |
| Slovak <i>I. ricinus</i>      | 4  | 3                                   | 2 (1 ♀ and 1 ♂) | Yes            | Yes            | 10                          |
| Russian <i>I. persulcatus</i> |  | 3                                   | 30 nymphs       |                |                |                             |

#### 2.6 Virus detection by real-time RT-PCR

Virus acquisition by larvae or nymphs, trans-stadial transmission from larvae to nymph or nymph to adult, and transmission from nymphs or adults to naïve mice were assessed by testing for virus genome in ticks, mouse organs or mouse blood, using real time RT-PCR.

For RNA extraction, ticks were homogenised individually in 350 µL of lysis buffer and 3.5µL of β-mercaptoethanol with six stainless-steel beads (2.8 mm diameter) using Precellys®24 Dual homogeniser (Bertin, Paris, France) at 5500 rpm for 20 sec. All mouse

organs were individually homogenised (½ heart, ½ lung, ½ spleen, ¼ liver, ½ brain) in 500µL of DMEM culture medium supplemented with 10% FBS with six stainless-steel beads using the Precellys®24 Dual homogeniser at 5500 rpm for 20 sec. RNA was then extracted from individual ticks, 20 µL of whole mouse blood and 250µL of organ homogenate using NucleoSpin® RNA extract II (Macherey Nagel, Germany) as described by the manufacturer. RNA was eluted from columns in 40µL of RNase-free water and stored at -80°C until further used.

Because the genome of KEMV consists of segmented double-stranded RNA, heat-denaturation is a prerequisite for a successful reverse transcription [16]. Thus, before real-time RT-PCR, the dsRNA is heat denatured at 99°C for 5 min using an appropriate heating system, such as a thermal cycler. Renaturation of dsRNA must be prevented by immediately quenching the tubes on wet ice.

RNA from ticks, mouse blood and organs were tested by real-time RT-PCR using the LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis Probes as directed by the manufacturer. Primers designed from KEMV genome segment 2 sequence [17] were used: KEMV\_F (final concentration: 0.5 µM), KEMV\_R (final concentration: 0.5 µM) and KEMV\_P AC-GGGCCAACACTCGTTCATCACAG (final concentration: 0.5 µM). All samples were tested in duplicates. The real-time RT-PCR cycling programme consisted of one cycle at 63°C for 3 min and another one at 95°C for 30 s, 45 successive cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 30 s and 72°C for 1 s. The programme ended by a cooling cycle at 40°C for 30 s.

In order to improve detection of the target sequence, RNA from French ticks were preamplified. Reverse transcription was performed using the qScript cDNA Supermix kit (Quanta Biosciences, Beverly, USA) as previously described [17]. The reaction was carried out in a final volume of 5µL containing 1µL of qScript cDNA Supermix 5X, 3µL of RNase-free water and 1µL of RNA. The thermal cycling programme consisted of a single cycle at 25°C for 5 min, followed by one cycle at 42°C for 30 min and one final cycle at 85°C for 5 min. DNA preamplification was performed in presence of primers KEMV\_F -GTCAGACGGATTTTCGACCTC- and KEMV\_R -GCGAGCCAGATCCCGATGT, targeting genome segment 2 (encoding the VP2 protein). The preamplification was carried out in a final volume of 5µL, containing 1µL of 5X Perfecta Preamp Supermix (Fluidigm, USA), 1.25µL of primers solution (0.2µM final concentration each), 1.5µL of distilled water and 1.25µL of KEMV cDNA. The PCR cycling programme consisted of one cycle at 95°C for 2 min, 14 successive cycles of denaturation at 95°C for 15 s and amplification at 60°C for 4 min. The pre-amplified DNA were 1:2 diluted and stored at -20°C until further used. The real-time PCR was performed using the LightCycler® 480 Probes Master kit according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics, Germany) and using the same primers and probe described above. The PCR cycling programme consisted of one cycle at 95°C for 5min, 45 successive cycles at 95°C for 10 s, 60°C for 30 s and 72°C for 1 s. The programme ended by a cooling cycle at 40°C for 30 s.

### 3. Results

#### 3.1 Determination of the minimal infectious dose of KEMV in IFNAR<sup>-/-</sup> mice

Mice were subcutaneously inoculated with KEMV with different doses ranging from 0.01 to 10<sup>4</sup> PFU. Blood was sampled every other day. On day 2 post-inoculation, none of the mice showed any form of clinical signs. Throughout the experiment, mice that were inoculated with 0.01 to 10<sup>2</sup> PFU showed no clinical signs or viraemia until the end of the experiment.

The mice that were inoculated with 10<sup>3</sup> and 10<sup>4</sup> PFU showed viraemia on day 2 post-inoculation and clinical signs on day 3 post-inoculation (Figure 1). The symptoms included prostration, eyes remaining shut, falling ears and haemorrhage from eyes, nose, mouths, fingers and toes. The liver and spleen were enlarged. The liver was discoloured

and appeared yellowish and the spleen has yellowish spotty appearance. The results indicates that the minimal infectious dose of KEMV in IFNAR<sup>-/-</sup> mice is 10<sup>3</sup> PFU.

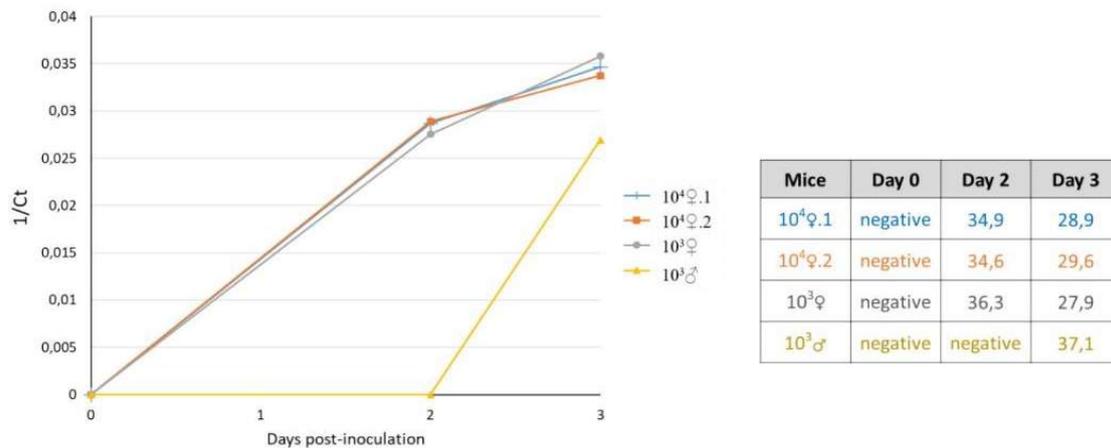


Figure 1 : Follow-up of viraemia in mice (Ct value). The table indicates the Ct value.

### 3.2 KEMV acquisition by *I. ricinus* and *I. persulcatus* ticks and trans-stadial transmission

Prior to artificial feeding, larvae and nymphs (10 *I. persulcatus* or 30 *I. ricinus*, respectively) and French female *I. ricinus* (collected immediately after egg-laying) were all tested for KEMV genome. All samples were negative.

French larvae and Slovak nymphs feeding lasted 7 and 14 days, respectively. *I. persulcatus* larvae fed for up to 14 days. Total numbers of engorged ticks recovered after artificial feeding are summarised in Table 3. The presence of KEMV genome in engorged *I. ricinus* ticks (larvae and nymphs) was confirmed by real-time RT-PCR in 88.3% of tested larvae from France and 100% of tested nymphs from Slovakia. KEMV was also found in 100% of tested *I. persulcatus* larvae (Table 3).

Immediately after moulting, 10 French *I. ricinus* nymphs, 4 Slovak *I. ricinus* adults (2 males and 2 females) and 5 *I. persulcatus* nymphs were tested in order to assess KEMV trans-stadial transmission. Only 10% of French ticks were positive, contrasting with Slovak and Russian ticks where 100% of tested ticks were positive for KEMV genome (Table 3). The Ct values in *I. ricinus* ticks (from France or Slovakia) were similar whatever the developmental stage. For *I. persulcatus*, Ct values in engorged larvae were higher than in nymphs (Figure 2). Levels of viral RNA were higher in nymphs than in engorged larvae.

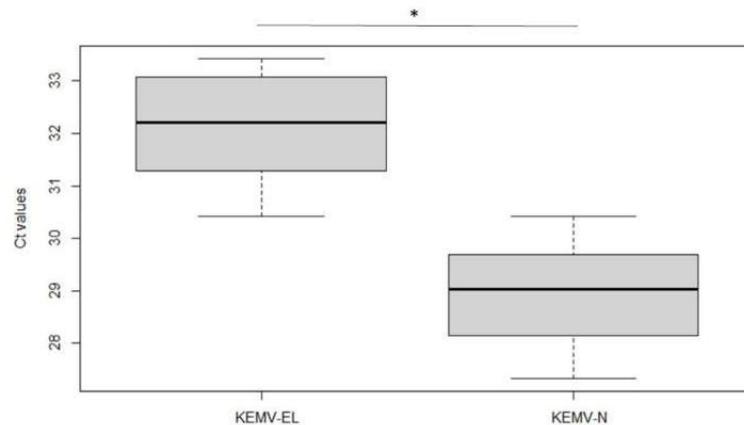
Before assessing transmission to a vertebrate host, ticks were again tested to ensure they remained positives for KEMV (in a previous study [8], we observed clearance of the virus several months post-moulting). Four months post-moulting, using real-time RT-PCR, we tested a pool of 25 French nymphs, 4 individual Slovak adult ticks (2 males and 2 females) and 2 individual *I. persulcatus* nymphs. *I. ricinus* nymph pool from France was found negative whereas *I. ricinus* adult ticks from Slovakia and *I. persulcatus* ticks from Russia were all positive for KEMV.

Table 4: Engorgement rates of larvae and KEMV infection in engorged larvae and nymphs after artificial feeding and trans-stadial transmission

| Tested parameters          | <i>I. ricinus</i> from France | <i>I. ricinus</i> from Slovakia | <i>I. persulcatus</i> from Russia |
|----------------------------|-------------------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| Stage for AFS with KEMV    | Larvae                        | Nymphs                          | Larvae                            |
| % of engorgement after AFS | 22.6%<br>678/3000             | 22%<br>55/250                   | 4.5%<br>90/2000                   |

|                                 |                                  |  |                                 |
|---------------------------------|----------------------------------|--|---------------------------------|
| % of infected ticks after AFS   | 88.3%<br>(27/30 engorged larvae) | 100%<br>(4/4 engorged nymphs)                | 100%<br>(10/10 engorged larvae) |
| % of trans-stadial transmission | 10%<br>(1/10 unfed nymphs)       | 100%<br>(2/2 unfed female<br>2/2 unfed male) | 100%<br>(5/5 unfed nymphs)      |

240



241

Figure 2: Detection of KEMV Seg-2 by real-time RT-PCR in lysates of individual *Ixodes persulcatus* after infection using the artificial feeding system – EL: Engorged Larvae, N: nymphs (N infected at the larval stage) and comparison of mean Ct values for each group (Kruskal-Wallis test, alpha = 5%, \*: p-value < 0.001). The lower and upper lines represent the lower (Q1) and upper (Q3) quartiles. The median is represented in the diagram and data falling outside the Q1-Q3 range are plotted as outliers of the data (circle).

### 3.3 Assessing transmission of KEMV by *I. ricinus* and *I. persulcatus* to naïve IFNAR<sup>-/-</sup> mice

Four months post-moulting, ticks were placed on naïve IFNAR<sup>-/-</sup> mice. Feeding lasted for 6 days for nymphs and 8 days for adults. Blood was sampled on days 0, 2, 6 and 10 to follow-up the viraemia. Blood samples, mouse organs and engorged ticks were tested for KEMV genome by real time RT-PCR. Engorged French nymphs were tested negative, only one Slovak adult male was positive and at least 2 Russian ticks per mouse were positive (3 individual ticks tested per mouse and the rest was pooled prior to testing). We did not detect KEMV genome in mouse blood or organs and did not observe any clinical signs of KEMV infection in mice infested with the 3 tick populations (French and Slovak *I. ricinus* and Russian *I. persulcatus*).

## 4. Discussion

This study aimed to assess vector competence of *I. ricinus* and *I. persulcatus* ticks for KEMV, a tick-borne orbivirus. In order to validate vector competence, three criteria are considered for ticks to be competent for the transmission of a pathogen: pathogen acquisition during a blood meal on an infected vertebrate, trans-stadial transmission from one stage to the other after moulting and transmission to a naïve vertebrate host upon the next blood meal. For that purpose, *I. ricinus* larvae and nymphs from France and Slovakia, respectively, and *I. persulcatus* larvae from Russia fed on KEMV spiked-blood using an artificial feeding system. The current study completes our previously published study conducted with *I. ricinus* larvae from Slovakia [8].

Our experimental results validate the first two criteria of vector competence for all *Ixodes* ticks we used, including KEMV acquisition and its trans-stadial transmission upon moulting. Unfortunately, we did not validate the last criterion (transmission to naïve mice as a vertebrate model) as no virus transmission was observed. We also demonstrated that

the minimal infectious dose of KEMV delivered by the subcutaneous route in IFNAR<sup>-/-</sup> mouse is about 10<sup>3</sup> PFU.

Four months post-moulting, we observed that *I. ricinus* nymphs from France cleared the virus and KEMV genome was not detected by real-time RT-PCR. This results compares to our previous findings regarding clearance of KEMV from Slovak *I. ricinus* [8]. In that study 83.8 % of engorged larvae and 40% of nymphs which moulted were tested positive for KEMV. Yet, five months post-moulting, nymphs appeared to clear the virus [8]. The French *I. ricinus* ticks appear to be poorly competent for KEMV [8]. The trans-stadial transmission was very low (10%) as compared to Slovak *I. ricinus* nymphs after moulting in our previous study. Tick genetic determinants control vector competence and influence the ability of ticks to transmit a pathogen [18]. High genetic diversity was observed within ticks belonging to the same species from distinct geographical regions [19], hence affecting vector competence for a given pathogen. For instance, *Ornithodoros turicata* from Texas or Florida transmitted *Borrelia turicata* to mice with varying efficiencies, with the tick population from Florida being significantly more efficient [20]. African populations of *O. erraticus* and *O. verrucosus* ticks from Africa are established vectors for the African strains of African swine fever virus (ASFV). Studies with the Eurasian strain of ASFV suggest that *O. erraticus* and *O. verrucosus* are unlikely vectors of ASFV strains currently circulating in Eurasia [21]. In addition to the influence of the vectors' genetic diversity, the genetic variability of arboviruses plays an important role in the determinism of vector competence [22], thus affecting levels of infection in the arthropod vector. For example, the vector competence of *Ae. albopictus* and *Ae. aegypti* was assessed for three strains of CHIKV: the East-Central-South African (ECSA) CHIKV\_0621, ECSA CHIKV\_115 and the Asian CHIKV. It has been shown that *Ae. albopictus* transmits ECSA CHIKV\_0621 with a higher efficiency, while transmission efficiency of ECSA CHIKV\_115 and Asian CHIKV is higher with *Ae. aegypti* [23]. A comparative study of vector competence of different *Ornithodoros* species (*O. moubata*, *O. erraticus*, and *O. verrucosus*) using several strains of ASFV showed variable infection rates depending on the tick-virus pairs assessed [24]. To our knowledge, KEMV is not an autochthonous virus of France. In our study, we used French *I. ricinus* ticks and a Russian KEMV isolate. The prevalent serotypes of KEMV in Slovakia are Lipovnik (LIP) and Tribeč (TRB) virus and both were isolated from *I. ricinus* [5]. Additional studies with these serotypes are likely to provide important insight into the influence that geographical variants of both *I. ricinus* ticks and virus may exert on competence.

The developmental stage when the tick acquires the virus may significantly impact *I. ricinus* ability to transmit KEMV, as suggested by the results with Slovak *I. ricinus*. KEMV acquisition and trans-stadial transmission were estimated at 100% contrasting with previous results [8]. Four months post-moulting, adult ticks remained positive for KEMV. However, KEMV was not transmitted to naïve IFNAR<sup>-/-</sup> mice upon tick feeding. Engorged adults which fed to repletion were collected from the capsules and we tested 3 females and 3 males by real-time RT-PCR. To our surprise, only one male tested positive for KEMV genome. Unfortunately, we obtained only few adult ticks after moulting which hampered further analyses. KEMV was detected in *I. ricinus* collected in the field in Vologda region in Russia [4]. Therefore, assessing vector competence of Russian *I. ricinus* should bring to conclusion whether the geographical origin of this tick species influences vector competence to KEMV.

Our results with *I. persulcatus* ticks contrast with those obtained with *I. ricinus*. Indeed, engorgement rate was very low as compared with other ticks. It was necessary to stimulate them to attach to the gerbil skin and feed by sprinkling faeces from actively feeding ticks. In our experience with ticks, we observed that when ticks successfully feed, the excreted faeces stimulate unfed ticks to attach and feed. *I. persulcatus* refusal to feed may be linked to their short span between the time we received them and the actual experimental procedure. Hence they may have been not correctly adapted to our laboratory environment despite being similar to that of donor laboratory (Institute of Parasitology, Czech Academy of Sciences, České Budějovice, Czech Republic). The adult ticks which we

initially received, were mated and fed on a rabbit. First generation of larvae which hatched in our laboratory were used in this study and resulted in fewer engorged larvae. Even though fewer *I. persulcatus* ticks were tested by real-time RT-PCR, the infection rates in engorged larvae were comparable between *I. persulcatus* and *I. ricinus* (100% and 88.3%). However, the infection rates of nymphs showed a strong contrast between the two tick species (100% for *I. persulcatus* as compared to 10% for *I. ricinus*). In addition, *I. persulcatus* ticks remained infected when tested virus four months after the moulting but no virus transmission was observed in mice upon feeding. Our experimental design did not include dissection of ticks in order to assess KEMV dissemination within the tick and whether the virus reached and infected salivary glands, a crucial process for the onward transmission to vertebrates hosts upon a new blood meal [25]. We attempted isolating KEMV from nymphs four months post-moulting by inoculating BSR cells with nymph lysate, but failed to observe virus replication even though we blindly passaged the inoculated BSR culture once (data not shown). It is possible that virus titre inoculated by *I. persulcatus* into the mice was lower than the effective minimum infectious dose required to infect IFNAR<sup>+/−</sup> mice. For instance, BTV serotypes differ in terms of the virus titres causing lethal infection in IFNAR<sup>−/−</sup> mice [12]. Other animal models may be more suitable, which will need further investigations.

## 5. Conclusions

We assessed vector competence of *I. ricinus* from France and Slovakia and *I. persulcatus* ticks from Russia for Kemerovo virus. We used an artificial feeding system for the tick infection. For all ticks, we validated the first two criteria of vector competence including virus acquisition and trans-stadial transmission. However, the animal model we used was probably not optimal to confirm the third criterion of vector competence, given the high minimum infectious dose of KEMV required to infect IFNAR<sup>+/−</sup> mice. Our results suggest specificities between viral strains and tick species/developmental stages. Further studies with other vertebrate models would be necessary.

**Author Contributions:** Conceptualization, HA and SM; methodology, CVM, HBS, AH, CG, FMJ, BM, AH; formal analysis, CVM, HBS, AH, CG, FMJ, BM; writing—original draft preparation, CVM; writing—review and editing, CVM, CG, FM, BM, HA, SM; supervision, HA, SM; funding acquisition, SM. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** CVM, HBS, AH, CG, FMJ, BM, HA and SM research were supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health and Safety (ANSES) and the French National Institute for Agricultural Research (INRAE). UMR BIPAR is supported by the French Government's Investissement d'Avenir program, Laboratoire d'Excellence "Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases" (grant No. ANR-10-LABEX-62-IBEID).

**Institutional Review Board Statement:** The present research was conducted in compliance with all relevant European Union guidelines for work with animals and with the French national law guidelines on the use of experimental animals and protection of animals against cruelty. Experimental protocols were approved by ANSES-ENVA-UPEC Ethics Committee for Animal Experimentation (Licence Number: 19-028).

**Acknowledgments:** We thank the "Tiques et Maladies à Tiques (TMT)" group of the CNRS "Réseau Ecologie des Interactions Durables" for stimulating discussion and support. We thank Océane L.e Bidel and Alain Bernier for their help in the animal facilities. We thank Filip Dámek for his help during on-call week-end in the animal facilities.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- [1] M. Labuda and P. A. Nuttall, "Tick-Borne Viruses," *Parasitology*, no. 129, pp. 221–245, 2004.
- [2] A. Rizzoli *et al.*, "Ixodes ricinus and its transmitted pathogens in urban and peri-urban areas in Europe: New hazards and

- relevance for public health," *Front. Public Heal.*, vol. 2, no. DEC, pp. 1–26, 2014. 377
- [3] C. V. Migné, C. Beck, G. Gonzalez, S. Lecollinet, and S. Moutailler, "Which tools for monitoring emerging arboviruses within their mammalian hosts and arthropod vectors?," *Virologie*, vol. 25, no. 1, pp. 12–28, 2021. 378  
379
- [4] V. G. Dedkov *et al.*, "Prevalence of Kemerovo virus in ixodid ticks from the Russian Federation," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 5, no. 6, pp. 651–655, 2014. 380  
381
- [5] H. Libikova, J. Rehacek, and J. Somogyiavo, "VIRUSES RELATED TO THE KEMEROVO VIRUS IN IXODES RICINUS TICKS IN CZECHOSLOVAKIA," *Acta Virol.*, vol. 9, pp. 76–82, 1965. 382  
383
- [6] M. Chumakov, "Report on the isolation from *Ixodes persulcatus* ticks and from patients in western Siberia of a virus differing from the agent of tick-borne encephalitis," *Acta Virol.*, vol. 7, pp. 82–83, 1963. 384  
385
- [7] S. Tkachev, V. Panov, G. Dobler, and N. Tikunova, "First detection of Kemerovo virus in *Ixodes pavlovskyi* and *Ixodes persulcatus* ticks collected in Novosibirsk region, Russia," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 5, no. 5, pp. 494–496, 2014. 386  
387
- [8] C. V. Migné *et al.*, "Evaluation of two artificial infection methods of live ticks as tools for studying interactions between tick-borne viruses and their tick vectors," *Scientific Reports*, 2021. 388  
389
- [9] M. Sato, N. Maeda, H. Yoshida, M. Urade, and S. Saito, "Plaque formation of herpes virus hominis type 2 and rubella virus in variants isolated from the colonies of BHK21/WI-2 cells formed in soft agar," *Arch. Virol.*, vol. 53, no. 3, pp. 269–73, 1977. 390  
391  
392
- [10] F. Mohd Jaafar *et al.*, "Immunisation with bacterial expressed VP2 and VP5 of bluetongue virus (BTV) protect  $\alpha/\beta$  interferon-receptor knock-out (IFNAR $^{-/-}$ ) mice from homologous lethal challenge," *Vaccine*, vol. 32, no. 32, pp. 4059–4067, 2014. 393  
394  
395
- [11] F. Mohd Jaafar, H. Attoui, P. P. C. Mertens, P. De Micco, and X. De Lamballerie, "Structural organization of an encephalitic human isolate of Banna virus (genus Seadornavirus, family Reoviridae) Printed in Great Britain," *J. Gen. Virol.*, vol. 86, pp. 1147–1157, 2005. 396  
397  
398
- [12] E. Calvo-Pinilla, T. Rodríguez-Calvo, J. Anguita, N. Sevilla, and J. Ortego, "Establishment of a bluetongue virus infection model in mice that are deficient in the alpha/beta interferon receptor," *PLoS One*, vol. 4, no. 4, 2009. 399  
400
- [13] J. Castillo-Olivares *et al.*, "A Modified vaccinia Ankara virus (MVA) vaccine expressing African horse sickness virus (AHSV) VP2 protects against AHSV challenge in an IFNAR 2/2 mouse model," *PLoS One*, vol. 6, no. 1, 2011. 401  
402
- [14] S. Bonnet *et al.*, "Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique," *Parasitology*, vol. 134, no. 2, pp. 197–207, 2007. 403  
404
- [15] L. Mateos Hernandez, "A capsule-based model for immature hard tick stages infestation on laboratory mice," *JoVE*, 2020. 405
- [16] H. Attoui, F. Billoir, J. F. Cantaloube, P. Biagini, P. De Micco, and X. De Lamballerie, "Strategies for the sequence determination of viral dsRNA genomes," *J. Virol. Methods*, vol. 89, no. 1–2, pp. 147–158, 2000. 406  
407
- [17] M. Gondard *et al.*, "Prevalence of tick-borne viruses in *Ixodes ricinus* assessed by high-throughput real-time PCR," *Pathog. Dis.*, vol. 76, no. 8, pp. 1–13, 2018. 408  
409
- [18] J. de la Fuente *et al.*, "Tick-Pathogen Interactions and VECTOR Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. April, pp. 1–13, 2017. 410  
411
- [19] A. Paulauskas, E. Galdikaitė-Brazienė, J. Radzijeuskaja, A. Aleksandravičienė, and M. Galdikas, "Genetic diversity of *Ixodes ricinus* (Ixodida: Ixodidae) ticks in sympatric and allopatric zones in Baltic countries," *J. Vector Ecol.*, vol. 41, no. 2, pp. 244–253, 2016. 412  
413  
414
- [20] A. Krishnavajhala, B. A. Armstrong, and J. E. Lopez, "Vector competence of geographical populations of *Ornithodoros turicata* for the tick-borne relapsing fever spirochete *Borrelia turicatae*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 84, no. 21, pp. 1–9, 2018. 415  
416  
417
- [21] R. P. de Oliveira *et al.*, "Comparative vector competence of the Afrotropical soft tick *Ornithodoros moubata* and Palearctic 418

- species, *O. Erraticus* and *O. Verrucosus*, for African swine fever virus strains circulating in Eurasia," *PLoS One*, vol. 14, no. 11, pp. 1–16, 2019. 419  
420
- [22] C. V. Migné, S. Moutailler, and H. Attoui, "Strategies for assessing arbovirus genetic variability in vectors and/or mammals," *Pathogens*, vol. 9, no. 11, pp. 1–18, 2020. 421  
422
- [23] A. Vega-Rua, K. Zouache, R. Girod, A.-B. Failloux, and R. Lourenco-de-Oliveira, "High Level of Vector Competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus," *J. Virol.*, vol. 88, no. 11, pp. 6294–6306, 2014. 423  
424  
425
- [24] R. Pereira De Oliveira *et al.*, "Differential vector competence of *Ornithodoros* soft ticks for African swine fever virus: What if it involves more than just crossing organic barriers in ticks?," *Parasites and Vectors*, vol. 13, no. 1, pp. 1–15, 2020. 426  
427
- [25] L. D. Jones, E. Hodgson, and P. A. Nuttall, "Enhancement of virus transmission by tick salivary glands," *J. Gen. Virol.*, vol. 70, no. 7, pp. 1895–1898, 1989. 428  
429  
430

## Discussion et perspectives du chapitre 1

Le premier objectif de ce chapitre a été de déterminer la meilleure méthode pour infecter les tiques avec le virus Kemerovo au laboratoire en comparant deux techniques : le système de gorgement artificiel (S Bonnet et al. 2007) et une technique d'immersion (Mitzel et al. 2007). La compétence vectorielle des tiques *Ixodes* pour KEMV a ensuite été testée en utilisant deux populations géographiquement distinctes d'*I. ricinus* (France et Slovaquie) et des tiques *I. persulcatus* de Russie.

La technique du gorgement artificiel a montré une plus grande efficacité en termes d'infection en comparaison avec celle de l'immersion. Environ 80% des larves gorgées qui se sont nourries sur du sang infecté avec KEMV, ont été trouvées positives pour le virus, tandis que les tiques immergées ont présenté un taux d'infection d'environ 48%. Selon la technique, le taux d'infection des nymphes (transmission trans-stadiale) est différent puisqu'après gorgement artificiel, les nymphes sont à 40% positives pour KEMV alors que les nymphes testées issues de l'immersion ont toutes été trouvées négatives. Les deux techniques présentées dans cette étude ont leurs avantages et leurs limites. La technique d'immersion est facile et peu coûteuse à mettre en place mais elle est aussi plus éloignée du mode d'infection naturel des tiques. Son efficacité d'infection peut dépendre du genre voire de la famille virale testée. En effet, dans cette étude un flavivirus et un orbivirus ont été utilisés et les mécanismes d'entrée dans les cellules ne sont pas les mêmes. Il est également difficile de savoir si l'infection au cours de l'immersion se fait via les pièces buccales ou par les divers orifices qu'il y a à la surface des tiques. Au vu des résultats obtenus et des remarques précédentes, le système de gorgement artificiel est la meilleure technique pour reproduire au plus près la réalité des infections de tiques et a donc été utilisée pour toute l'étude de la compétence vectorielle des tiques *Ixodes* pour KEMV. Chaque critère de la compétence vectorielle a été testé : acquisition de virus des larves ou nymphes gorgées, transmission trans-stadiale (taux d'infection au stade suivant : nymphes ou adultes) et la transmission à un hôte vertébré.

Le modèle vertébré utilisé ici est la souris IFNAR<sup>-/-</sup> pour laquelle la dose minimale infectieuse de KEMV a été déterminée en réalisant des injections par voie sous-cutanée de différentes doses (en PFU) de virus. Le suivi s'est fait par observations des symptômes et du développement d'une virémie par RT-PCR en temps réel. Les symptômes sont la prostration, larmoiement, dos vouté, poils hérissés et des signes hémorragiques au niveau des doigts, des orteils, du nez et de la bouche. La virémie est apparue deux jours post-inoculation. Le foie et la rate de ces souris avait une taille plus grande qu'en temps normal. Le foie est décoloré et la rate très foncée. Cette dose a été estimée à 10<sup>3</sup> PFU.

La compétence vectorielle des tiques *I. ricinus* et *I. persulcatus* pour KEMV a donc été testée. Deux populations d'*I. ricinus* ont été utilisées, l'une provient de France et la seconde de Slovaquie. Les

taux d'infection des larves gorgées pour ces deux populations sont similaires (respectivement 88% et 83%). La transmission trans-stadiale est, quant à elle, plus basse chez les tiques françaises (10%) par rapport à celle retrouvée chez les tiques slovaques (40%). Cependant, quatre et cinq mois post mue pour, respectivement les tiques slovaques et françaises, le virus n'était plus détectable au sein des arthropodes et a vraisemblablement été éliminé par ces dernières. Le dernier critère de la compétence vectorielle a été éprouvé par gorgement sur souris de ces nymphes. Aucune transmission du virus aux souris via les tiques n'a été observée. Les souris n'ont pas développé de symptômes ou de virémie et les organes à la fin de l'expérience ont été retrouvés négatifs pour KEMV par RT-PCR en temps réel. Seuls les deux premiers critères de la compétence vectorielle, incluant l'acquisition du virus et la transmission trans-stadiale, ont pu être montrés. Afin de compléter l'étude de la compétence vectorielle des tiques *I. ricinus* pour KEMV, un essai a été réalisé en infectant cette fois-ci des nymphes pour mettre en évidence ou non un potentiel « effet stade d'infection ». Les taux d'infection en nymphes gorgées et en adultes après la mue, ont été estimés à 100%. Le virus était encore détectable au sein de ces adultes quatre mois post-mue mais la transmission aux souris n'a pu être montrée, les tiques gorgées obtenues à l'issue de cette expérimentation sont ressorties négatives. L'effet stade d'infection n'a pu être complètement montré, les tiques semblent être toutefois plus longtemps infectées mais cela n'a pas l'air d'être valable pour toutes les tiques d'une même colonie. Pour les tiques *I. persulcatus*, 100% des larves gorgées et nymphes testées ont été trouvées positives pour KEMV. Le virus a également été maintenu pendant les quatre mois après la mue et au sein des tiques utilisées pour le gorgement, le virus était toujours présent mais la transmission aux souris n'a pu être observée. Les souris n'ont pas développé de symptômes ou de virémie.

Suite à ces travaux, nous avons ainsi pu émettre plusieurs hypothèses pour expliquer les résultats obtenus. Des tiques *I. ricinus* slovaques et françaises ont été utilisées avec une souche virale russe isolée à partir du cerveau d'un patient décédé d'une encéphalite. Or en République Tchèque et Slovaquie, c'est principalement deux autres sérotypes de KEMV qui sont retrouvés : Lipovnik (LIPV) et Tribeč (TRBV) et qui ont été isolés à partir de tiques *I. ricinus* (Libikova, Rehacek, and Somogyiavo 1965). Au vu des résultats obtenus, une légère différence en termes d'efficacité d'infection est suggérée en comparant les taux d'infection en nymphes après la mue entre les tiques françaises et slovaques (taux de transmission trans-stadiale). La transmission trans-stadiale chez les tiques françaises est plus faible, ce qui pourrait expliquer l'absence du virus Kemerovo en France. Il serait intéressant de faire des essais avec des tiques collectées en Russie ou également de tester la compétence vectorielle des tiques slovaques pour TRBV et LIPV afin de confirmer ou non l'hypothèse que la compétence vectorielle est dépendante des souches/populations de tiques *Ixodes* et de KEMV. Cela a été démontré pour les tiques *Ornithodoros* et le virus de la peste porcine africaine (PPA) ou *Borrelia turicata* ou encore entre les moustiques *Aedes* et CHIKV. Par exemple, les tiques *Ornithodoros turicata* du Texas ou de Floride transmettent *Borrelia turicata* aux souris avec des efficacités variables. La population de tiques de Floride transmet de manière

significativement plus efficace la bactérie (Krishnavajhala, Armstrong, and Lopez 2018). Les populations africaines de tiques *O. erraticus* et *O. verrucosus* sont des vecteurs reconnus des souches africaines de la PPA. Des études menées avec la souche de PPA circulant en Europe et Asie suggèrent que *O. erraticus* et *O. verrucosus* sont des vecteurs peu probables des souches qui circulent actuellement en Eurasie (Pereira de Oliveira et al. 2019). En plus de l'influence de la diversité génétique des vecteurs, la variabilité génétique des arbovirus joue un rôle important dans le déterminisme de la compétence vectorielle (Migné, Moutailler, and Attoui 2020), affectant ainsi les niveaux d'infection chez l'arthropode vecteur. Par exemple, la compétence vectorielle d'*Ae. albopictus* et d'*Ae. aegypti* a été évaluée pour trois souches de CHIKV : la souche East-Central-South African (ECSA) CHIKV\_0621, ECSA CHIKV\_115 et la souche asiatique CHIKV. Il a été démontré que *Ae. albopictus* transmettait ECSA CHIKV\_0621 avec une plus grande efficacité, tandis que l'efficacité de transmission de ECSA CHIKV\_115 et de la souche asiatique CHIKV est plus élevée avec *Ae. aegypti* (Vega-Rua et al. 2014). Une étude comparative de la compétence vectorielle de différentes espèces d'*Ornithodoros* (*O. moubata*, *O. erraticus* et *O. verrucosus*) utilisant plusieurs souches de PPA a montré des taux d'infection variables selon les paires de virus de tiques évaluées (Pereira De Oliveira et al. 2020).

Concernant les résultats obtenus pour les tiques *I. persulcatus*, les résultats laissent à suggérer que les souris IFNAR<sup>-/-</sup> ne seraient pas un modèle vertébré adapté pour montrer la transmission via les tiques du virus Kemerovo. Il serait alors intéressant de faire de nouveaux essais avec un autre modèle vertébré tels que les ruminants pour lesquels des séroconversions à KEMV ont déjà été observées (Karabatsos 1985)(H. Attoui and Mohd Jaafar 2015).

Chapitre 2 :  
Études *in vitro*  
La biologie de KEMV et  
fitness/séquençage

# 1 Introduction

Les virus transmis par les tiques sont des arbovirus (virus transmis par des arthropodes) et au moins 500 arbovirus ont été identifiés. La moitié est transmise par les moustiques, un tiers par les tiques et le reste par les phlébotomes et les moucheron piqueurs (Labuda and Nuttall 2004). Les arbovirus ont un cycle de vie à deux hôtes : ils se répliquent dans un vecteur invertébré et un hôte vertébré. Les vecteurs et les hôtes vertébrés peuvent jouer un rôle d'amplificateur et/ou de réservoir (Kuno et al. 2017). Ces virus ont des impacts importants sur la santé humaine et animale. Ils sont soit épizootiques, soit zoonotiques. L'émergence et/ou la réémergence des arbovirus est un défi auquel l'humanité est confrontée au cours de ce siècle. Les incursions dans de nouvelles régions géographiques sont de plus en plus fréquentes (Gould et al. 2017).

## 1.1 Les arbovirus, une grande flexibilité génétique et une plasticité phénotypique

Les arbovirus animaux sont des virus à ARN, à l'exception du virus de la peste porcine africaine (virus à ADN). Ils utilisent plusieurs stratégies pour assurer leur réplication et leur transmission. Les taux de mutations chez les arbovirus à ARN sont 300 fois plus élevés que chez les virus à ADN. Au cours de la réplication, les substitutions nucléiques ont été estimées dans un intervalle de  $10^{-3}$  et  $10^{-5}$  substitution par nucléotide par cycle de réplication (Drake 2006). La variabilité génétique des arbovirus à ARN doit être considérée selon trois niveaux : unité répliquative unique (événements précoces où des mutants sont générés), rassemblement de plusieurs unités (recombinaison, duplication de gènes, réassortiment de segments de génome, transferts de gènes, etc) et l'infection de l'hôte sensible (Esteban Domingo and Perales 2018). Les temps de génération des arbovirus à ARN sont courts et la taille des populations générées (quasi-espèces) est importante (Esteban Domingo and Perales 2018). Dans une quasi-espèce, la descendance virale d'une seule cellule est hétérogène et non identique, mais elle possède des génomes étroitement liés (E. Domingo, Sheldon, and Perales 2012). Les mutants peuvent être compartimentés dans différents organes d'un même organisme. Il existe deux modèles mathématiques qui sont pertinents pour étudier et interpréter le comportement des quasi-espèces de virus : le calcul de la concentration de copies sans changement et donc de mutants et les formulations du seuil d'erreur pour le maintien de l'information génétique (Esteban Domingo and Perales 2018).

Les virus sont soumis à des sélections compétitives et des événements aléatoires. Certaines mutations délétères conduisent à l'extinction de certains variants lorsque leur fitness ou aptitude à infecter diminue. La sélection naturelle est bien plus efficace pour éliminer les mutations ayant un impact plus important que celles ayant un impact plus faible. De plus, les virus sont confrontés à des goulots d'étranglement. Les goulots d'étranglement génétiques sont les événements pouvant provoquer

une réduction importante de la taille d'une population et réduire ainsi la diversité génétique. Par exemple, les génomes de basse fréquence sont éliminés lorsqu'ils sont soumis à un goulot d'étranglement (Manrubia et al. 2005) (Esteban Domingo and Perales 2018). Les goulots d'étranglement répétés entraînent des changements dans les génomes des virus à ARN, certaines mutations sont alors fixées et permettent l'émergence de nouveaux variants (H. Li and Roossinck 2004). Si un seul variant d'une quasi-espèce virale peut générer une nouvelle population virale, ce mutant présente alors une mutation avantageuse. Cette mutation sera maintenue et transmise à la génération suivante. Par conséquent, les goulots d'étranglement sont responsables de l'accumulation de mutations dans la séquence consensus d'une quasi-espèce (Manrubia et al. 2005). Les virus à ARN peuvent provoquer des infections aiguës et/ou chroniques. Les quasi-espèces virales jouent un rôle dans l'échappement à la réponse immunitaire de l'hôte, aux traitements thérapeutiques et aux vaccins. Par conséquent, elles jouent un rôle dans la progression de la pathogénèse et de la maladie comme cela a été démontré pour certains virus comme le virus de la Dengue (DENV) (Kurosu 2011).

## 1.2 Le rôle du vecteur arthropode et de l'hôte dans la « flexibilité » des arbovirus

Les arbovirus et leurs vecteurs doivent être considérés comme des systèmes complexes où plusieurs paramètres affectent leur dynamique. La variabilité génétique des arbovirus influence fortement ce système. Certaines mutations ont permis à certains arbovirus de changer de vecteurs. Par exemple, le vecteur principal du CHIKV est *Aedes aegypti*. Au cours de l'épidémie dans l'océan Indien en 2004, une substitution d'acide aminé en position 226 (A226V) dans la glycoprotéine d'enveloppe E1 a permis au virus de changer de vecteur et ainsi être transmis par *Aedes albopictus*. Cette mutation a diminué le titre viral nécessaire pour infecter *Ae. albopictus* à partir d'un hôte vertébré infecté. Or le moustique *Ae. albopictus* a une plus grande distribution géographique qu'*Ae. aegypti*, qui est presque absent des îles de l'océan Indien (Tsetsarkin et al. 2007)(Tsetsarkin and Weaver 2011), ce qui a favorisé la propagation du virus et induit une épidémie de grande ampleur.

Il a été plusieurs fois démontré pour plusieurs virus transmis par des insectes que ces derniers étaient sources de variabilité génétique au sein des arbovirus. En conditions *in vitro*, dans des cellules d'arthropodes telles que les cellules de *Culicoides sonorensis* pour différents sérotypes du BTV ou encore dans des cellules de moustique pour WNV, CHIKV, la diversité génétique de ces virus est accrue lors d'un ou plusieurs passages en série dans ces cellules (Lean et al. 2019)(Kopanke et al. 2020)(Ciota, Ngo, et al. 2007)(Coffey and Vignuzzi 2011). À l'inverse, un à plusieurs passages dans des cellules de mammifère réduit drastiquement la diversité génétique de ces arbovirus (Migné, Moutailler, and Attoui 2020). Lors de passages en série *in vitro*, il a été mis en évidence une spécialisation du virus à l'hôte. La cinétique de croissance virale est plus rapide dans le type cellulaire dans lequel les passages en série ont

été faits. La production virale est plus efficace par rapport à la souche initiale. Pour certains, la virulence est diminuée et atténuée (Franchi et al. 2008). Par exemple, pour le virus de la fièvre de la vallée du Rift (RVFV), le gène codant la phosphoprotéine responsable de la virulence, est délété. Lors de son étude en modèle *in vivo*, cette souche n'était plus responsable de mortalité en souris contrairement à la souche d'origine et aux souches adaptées aux cellules d'arthropode et issues des passages en alternance (Sara Moutailler et al. 2011). Lors de passages en alternance en modèles *in vitro* ou *in vivo*, la souche adaptée présente un comportement similaire à celui de la souche parentale. La virulence et la production virale sont quasiment les mêmes pour le CHIKV par exemple (Arias-Goeta et al. 2014). Contrairement aux souches adaptées en passages en série, la souche alternée garde sa capacité à infecter les deux types cellulaires et/ou hôtes et vecteurs (Migné, Moutailler, and Attoui 2020).

Pour certains virus transmis par les tiques, il a été montré également que la tique pouvait être une source de diversité. Par exemple, leurs cellules intestinales sont des sites de réassortiments de segments génomiques pour le virus Thogoto (famille *Orthomyxoviridae*, genre *Thogotovirus*) (Davies et al. 1987). De plus, une étude sur la variabilité génétique de CCFHV a montré que seul le virus isolé à partir de tiques présentait des mutations (Xia et al. 2016).

### 1.3 Objectifs de chapitre 2

Plusieurs études ont été menées avec des virus transmis par des insectes appartenant à différents genres viraux tels que *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Phlebovirus*, *Orbivirus* et *Rhabdovirus*. Le schéma de ces études était très similaire et avait pour but d'étudier la variabilité génétique et/ou la fitness de ces virus après plusieurs passages en série et/ou en alternance dans des cellules d'arthropodes ou de mammifère. Une hypothèse a pu être dégagée à partir de ces études : « l'alternance d'hôtes des arbovirus pourrait restreindre l'évolution de ces virus ». Cependant, cette hypothèse a été générée à partir d'études réalisées sur les virus transmis par les insectes et a été élargie à tous les arbovirus, incluant ainsi les virus transmis par les tiques. Peu d'études ont été réalisées sur ces derniers, ne permettant pas de valider ou de réfuter cette hypothèse pour ces virus, car les insectes et les tiques présentent de grandes différences phénotypiques et génétiques. La variabilité génétique des arbovirus transmis par les insectes a été évaluée pour une série de virus. Il en convient de mettre davantage l'accent sur les virus transmis par les tiques afin de faire progresser ces études et de mieux comprendre et anticiper l'émergence et/ou ré-émergence de ces virus.

L'objectif de ce chapitre est d'étudier l'effet de l'alternance d'hôte sur la variabilité génétique et la fitness du virus Kemerovo après 30 passages en série et/ou en alternance dans des cellules de mammifère ou cellules de tique. Au cours de ce chapitre, nous avons, dans un premier temps, obtenu des informations sur la biologie du KEMV car peu sont disponibles actuellement. Dans la littérature,

pour certains arbovirus comme le BTV, un seul passage en cellules d'arthropode suffit à augmenter la diversité génétique au sein des virus générés. Afin de voir si cela est également le cas avec KEMV, dans un deuxième temps, la génétique du KEMV a été étudiée par séquençage Sanger après un passage en cellules de tique. Enfin, au vu des informations biologiques et physico-chimiques sur KEMV, des mises au point de méthodes ont été nécessaires pour réaliser les 30 passages en série et en alternance dans les deux types cellulaires. Puis la fitness des souches adaptées en culture cellulaire a été étudiée en conditions *in vitro* mais également en *in vivo*. Dans ces travaux de thèse, l'étude de la fitness comprend l'étude de la capacité répliquative dans les différents types cellulaires (cinétique de répliquaison en cellules de mammifère et de tiques), de la virulence (pourcentage de survie cellulaire en conditions *in vitro* et suivi de mortalité en souris), du potentiel tropisme dans un modèle animal (compartimentalisation/tropisme des populations virales dans des organes). Enfin, en vue d'un séquençage NGS de passages d'intérêt de ces souches adaptées en culture cellulaire, la purification des ARNdb a été mise au point.

## 2 Matériels et méthodes

### 2.1 Etude *in vitro* du virus Kemerovo

#### 2.1.1 Le virus Kemerovo

La souche de KEMV utilisée pour cette thèse a été isolée en 1962 à partir du cerveau d'un patient décédé à la suite d'une encéphalite aigüe en Russie (Chumakov 1963). Le virus a ensuite été une première fois amplifié en cerveau de souris puis passé deux fois dans des cellules Vero (cellules de rein de singe vert). Un stock conséquent de virus a été préparé pour ces travaux, une faible quantité de virus était disponible, c'est pourquoi le virus a été passé 3 fois dans des cellules BSR. Tout au long de ce manuscrit, la souche utilisée se nomme KEMV P3.

#### 2.1.2 Les lignées cellulaires utilisées

##### 2.1.2.1 Les cellules de mammifère : BSR

Le clone BSR est dérivé de la lignée BHK-21 (baby hamster kidney) et a été cloné dans de l'agar mou lors d'une étude visant à identifier un clone cellulaire présentant une haute susceptibilité/sensibilité au virus de la rubéole (Sato et al. 1977), (BSR : **B**HK **S**ensitive to **R**ubella). Les cellules BSR sont cultivées au laboratoire à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub> dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) complété avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et des antibiotiques tels que de la pénicilline (100 IU, concentration finale) et de la streptomycine (100 µg, concentration finale)

### 2.1.2.2 Trois lignées de cellules de tique *Ixodes ricinus* : IRE11, IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20

Trois lignées cellulaires de tique *Ixodes ricinus* étaient disponibles pour ces travaux et ont été obtenues de la "Tick cell biobank" dirigée par Lesley Bell-Sakyi (Université de Liverpool, UK) sous un "Material Transfer Agreement". Il s'agit des lignées IRE11 (*Ixodes ricinus* Embryo 11), IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20 (*Ixodes ricinus* Embryo/Centre for Tropical Veterinary Medicine 19 et 20). Ces trois lignées ont été produites à partir d'embryons d'*Ixodes ricinus* (Bell-Sakyi et al. 2007).

Les cellules IRE/CTVM19 sont maintenues dans du milieu L-15 (Leibovitz, Gibco) supplémenté avec 20% de SVF, 10% d'une solution de tryptose phosphate (TPB, Gibco), 2 mM de L-glutamine (Gibco), de la pénicilline (100 IU, concentration finale, Gibco) et de la streptomycine (100 µg, concentration finale, Gibco). Pour cultiver les cellules IRE/CTVM20, un mélange volume à volume de L-15 et L-15B est nécessaire. Le L-15B est préparé selon les recommandations décrites dans (Munderloh et al. 1994). Les cellules IRE/CTVM20 sont ainsi maintenues dans du L15/L15-B contenant 12.5% de SVF, 10% TPB (Gibco), 0.05% lipoprotéine bovine (MP Biomedicals), 2 mM de L-glutamine (Gibco), de la pénicilline (100 IU, concentration finale) et de la streptomycine (100 µg, concentration finale). Enfin, les cellules IRE11 sont cultivées dans du L-15B300 (Bell-Sakyi et al. 2007), c'est-à-dire du L-15B dilué au ¾ (Munderloh et al. 1994).

## 2.2 Infections *in vitro*

Comme décrit dans notre revue (Strategies for Assessing Arbovirus Genetic Variability in Vectors and/or Mammals) (Migné, Moutailler, and Attoui 2020), l'étude de la variabilité génétique et de la fitness des arbovirus se fait au cours de plusieurs passages en série dans les cellules correspondant aux hôtes vertébrés ou vecteurs arthropodes et en alternant les deux types de cellules (arthropodes et vertébrés) pour évaluer l'effet de cette alternance. Au cours de cette thèse, 30 passages en série et en alternance ont été réalisés en suivant le schéma expérimental décrit dans la figure 35. Pour se faire, des mises au point ont d'abord été faites pour la réalisation de ces passages telles que le choix de la lignée cellulaire de tique, la purification du virus à partir des cultures de cellules de mammifère et d'arthropode et donc la mise au point des passages puisque peu d'informations sont disponibles sur la biologie de KEMV et de sa culture en laboratoire. Les passages en série dans les cellules de tique seront nommés : Ps.IRE 1 à 30. Ps.BSR 1 à 30 correspondent aux passages en série dans les cellules de mammifère et P.alt 1 à 30 aux passages en alternance dans les cellules de tique et cellules de mammifère. Le P.alt 1 a été fait dans les cellules de tique.

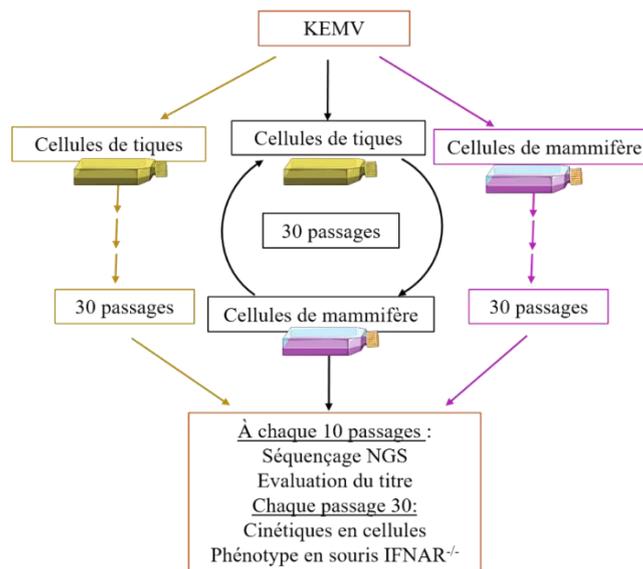


Figure 35: Schéma expérimental de la partie *in vitro*

### 2.2.1 Titrage du virus par la technique de plages de lyse

Le titre de KEMV a été déterminé par la technique de plages de lyse comme décrit dans (Mohd Jaafar, Belhouchet, Vitour, et al. 2014) (Buckley et al. 2003), en plaque 24 puits. La veille du titrage,  $1 \times 10^5$  cellules BSR sontensemencées par puits et incubées à 37°C, 5% CO<sub>2</sub> et avec du DMEM avec 10% SVF, de la pénicilline et streptomycine (à, respectivement, 100 IU et 100 µg en concentrations finales) et de la ciprofloxacine (1 µg/mL, concentration finale). Lorsque les cellules ont atteint 80% de confluence, ces dernières sont rincées avec du DMEM sans sérum. Le virus est dilué en cascade, de 10 en 10, jusqu'à atteindre la dilution 10<sup>-7</sup>. Le DMEM sans sérum est retiré des cellules et 250 µL de chaque dilution sont ajoutés (trois puits/dilution et trois puits contrôle sans virus). Le virus et les cellules sont incubés pendant 2h à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>. Le virus est ensuite retiré et les cellules sont recouvertes avec 1 mL de milieu semi-solide (DMEM contenant 1% de SVF et de l'agarose à 0,8% en concentration finale). L'agarose est préalablement préparée à une concentration de 4% (Seaplaque<sup>TM</sup> agarose, Lonza). Après 5 jours d'incubation à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>, 1 mL de formaldéhyde à 10% est ajouté dans chaque puits et laissé incubé pendant 3h afin d'inactiver le virus et de fixer les cellules. Le formaldéhyde est ensuite aspiré et la gélose est enlevée à l'aide d'une spatule, sans toucher au tapis cellulaire. Les plages de lyse sont révélées par coloration des cellules non infectées avec du naphtol blue-black pendant 30 min. Les cellules sont ensuite rincées deux fois avec de l'eau distillée et laissées sécher à l'air libre. Enfin, les plages de lyse sont comptées pour déterminer le titre viral en PFU/mL.

## 2.2.2 Infections des différentes lignées cellulaires

### 2.2.2.1 Choix de la lignée cellulaire de tique *Ixodes ricinus*

Deux flasques de 12,5cm<sup>2</sup> de chaque lignée (IRE11, IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20) ont été infectées avec KEMV. La procédure suivie est décrite dans la figure 36. Au total, 6 flasques ont été utilisées. Le volume de virus mis était de 500µL par flasque. Pour chaque lignée, un échantillonnage au temps T0 a été réalisé en récupérant les cellules infectées. Les autres flasques ont été mises à incuber pendant 6 jours à 30°C sans CO<sub>2</sub>. À la fin de l'expérience, les cellules des diverses flasques ont été grattées et centrifugées à 2000 g pendant 5 min pour culotter les cellules. L'ARN des cellules et du surnageant de chaque flasque a été extrait comme indiqué dans le paragraphe 2.4.1.1. Les ARN ont ensuite été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% à 110V pendant 30 min.

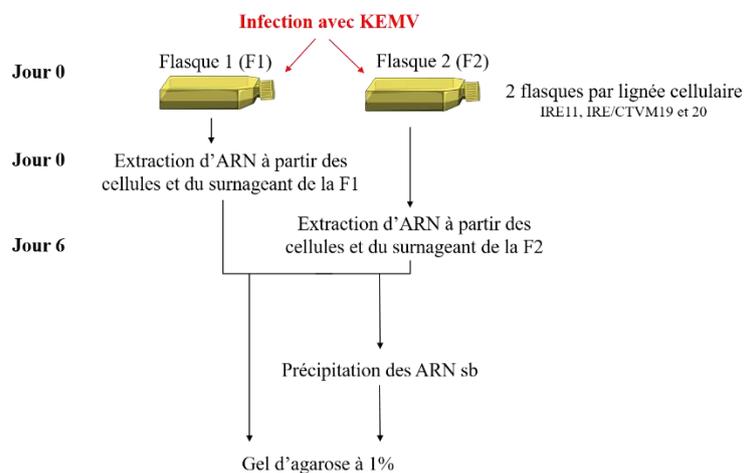


Figure 36: Procédure suivie pour le choix de la lignée cellulaire de tique *Ixodes ricinus* pour les infections à KEMV

### 2.2.2.2 Biologie de KEMV dans les cellules de tique *Ixodes ricinus*

La lignée sélectionnée de cellules de tique (IRE/CTVM20) a été utilisée pour déterminer le temps optimal d'infection. Pour se faire, 5 flasques de 12,5cm<sup>2</sup> de IRE/CTVM20 ont été infectées de la même manière que précédemment avec KEMV et laissées incuber jusqu'à 10 jours post-infection à 30°C. Les infections ont été arrêtées à différents temps post-infection : J0, J3, J6, J8 et J10. Les ARN ont été extraits à partir des cellules et du surnageant comme décrit dans le paragraphe précédent et analysés par électrophorèse en gel d'agarose à 1% pendant 30 min à 110V. La flasque J8 a été utilisée pour faire également un premier passage en série en cellules de tique. Pour cela, avant l'extraction de l'ARN, ¼ de cette flasque a servi à infecter une nouvelle flasque 12,5 cm<sup>2</sup> de cellules IRE/CTVM20. Cette dernière a incubé 6 jours à 30°C avant l'extraction d'ARN.

Les orbivirus transmis par les *Culicoides* infectent de manière persistante une lignée dérivée de *Culicoides sonorensis* (la lignée KC, qui jusqu'à récemment était la seule lignée utilisée pour étudier les orbivirus *Culicoides*-borne). Le suivi sur une période de 6-9 mois de cellules KC infectées par le BTV indique que l'infection peut persister jusqu'à la fin de la période de suivi. Néanmoins certaines cultures se négativent au bout de 9 mois suggérant un shut-off du virus (Fu 1995). Afin de comprendre si le KEMV peut infecter de manière persistante les cellules IRE/CTVM20, une flasque de 12,5cm<sup>2</sup> de cellules a été infectée et maintenue à 30°C, sans CO<sub>2</sub> pendant 16 semaines. Le milieu a été renouvelé toutes les semaines avec du milieu frais et 1x10<sup>6</sup> cellules ont été prélevées 1, 2, 3 et 16 semaines post-infection afin d'extraire l'ARN et de l'analyser par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

### 2.2.3 Mise au point des passages en série et en alternance

Au cours des passages en série, la MOI (multiplicity of infection – Multiplicité d'infection) a été de 0,05. Le choix d'une MOI basse a été fait à partir de la littérature. De manière générale, pour éviter la formation de particules ayant des segments défectifs interférants au cours d'infections virales cellulaires, les MOI choisies sont très faibles (K. A. S. Thompson and Yin 2010). Les infections cellulaires avec des orbivirus se font à des MOI comprises entre 0,1 et 0,01 (Belhouchet et al. 2011) (Shaw et al. 2013).

Des mises au point ont été nécessaires pour purifier le virus entre chaque passage, afin de s'assurer de la récolte de virus produit lors de chaque infection, et non de virus résiduel des infections précédentes. Les infections dans les cellules BSR ou IRE/CTVM20 ont duré 6 jours à, respectivement, 37°C et 30°C. Pour chaque passage, deux flasques de 75cm<sup>2</sup> de BSR et deux flasques de 12,5cm<sup>2</sup> de IRE/CTVM ont été infectées. Pour les passages 10, 20 et 30, le nombre de flasques a été multiplié par 2. La procédure d'infection varie selon le type cellulaire. Les IRE/CTVM20 n'étant pas des cellules adhérentes, il n'est pas possible de rincer l'inoculum. De ce fait, lors de l'infection, le virus est ajouté dans du milieu frais et la flasque est directement placée à l'incubateur à 30°C sans CO<sub>2</sub>. Pour les BSR, cellules adhérentes, l'inoculation des flasques 75cm<sup>2</sup> se fait dans 3 mL de DMEM supplémenté avec les antibiotiques, la ciprofloxacine et 1% de SVF pendant 2h à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. L'inoculum est ensuite retiré, et les cellules sont recouvertes avec 20 mL de DMEM contenant 1% de SVF.

#### 2.2.3.1 Purification du virus avec un solvant organique

Les études réalisées en culture cellulaire indiquent que les virus de la famille des *Reoviridae* en général (*Orthoreovirus*, *Rotavirus*, *Seadornavirus*, *Coltivirus* et *Orbivirus*) restent associées à 95-99% aux débris cellulaires, une fois que la lyse des cellules de mammifères a eu lieu. Dans les cellules d'arthropodes, les seadornavirus, coltivirus ou orbivirus bourgeonnent, acquérant ainsi une enveloppe temporaire (qui se perd rapidement). Entre 40-50% des particules virales restent associées à ces cellules.

Il est donc difficile de préparer un inoculum dilué et homogène à partir d'un lysat de cellules de mammifères. Les travaux des virologues pionniers sur la famille des *Reoviridae* ont abouti à la conclusion que l'utilisation de solvants organiques inertes comme le Freon 113 permet de libérer les particules virales de leurs interactions avec les débris cellulaires (Joklik 1983). Ce solvant a permis de développer des protocoles de purification pour des virus comme les orthoreovirus et les rotavirus. Depuis quelques années, l'utilisation du Freon 113 a été interdite pour des raisons en lien avec l'environnement. Un autre Freon, le Vertel XF a été utilisé en remplacement dans la purification de virus tel que les seadornavirus et les rotavirus (Mendez et al. 2000). Pour le KEMV, et afin d'obtenir des inocula de particules virales homogènes, les lysats des cellules BSR infectées ou les cellules IRE/CTVM20 intactes ont subi un traitement avec du Vertrel XF (Sigma-Aldrich) comme décrit dans (Mohd Jaafar et al. 2005). Pour cela, la suspension virale est mélangée volume à volume avec du Vertrel XF et est secouée énergiquement à la main pendant 5 minutes. Le mélange est ensuite centrifugé pendant 5 min à 2000g. La phase aqueuse est ensuite récupérée et est directement utilisée pour les infections.

### 2.2.3.2 Infection des cellules avec le KEMV issu de cellules de tique

#### 2.2.3.2.1 *Premier passage en alternance de KEMV à partir de cellules de tique*

Les premiers essais de passage en alternance avec du KEMV issu de cellules de tique ont consisté à infecter une flasque 12,5cm<sup>2</sup> de IRE/CTVM20 et à laisser incuber 10 jours à 30°C. Une flasque de 25cm<sup>2</sup> contenant des BSR à 90% confluentes a été infectée et incubée à 37°C. Pour cela, les cellules IRE/CTVM20 infectées ont été suspendues et ¼ de la suspension (environ 5 millions de cellules) a servi à infecter les BSR maintenues dans du DMEM avec 1% de SVF. Les BSR ont ensuite incubé pendant 6 jours jusqu'à lyse totale des cellules. Une extraction d'ARN à partir des cellules et du surnageant a été réalisée comme décrit dans le paragraphe 2.4.1.1. Les extraits ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% afin d'évaluer les quantités d'ARNdb.

#### 2.2.3.2.2 *Purification de KEMV produit à partir de cellules de tique*

D'après les études menées au cours de cette thèse, les particules de KEMV restent associées aux cellules IRE/CTVM20. Ces dernières demeurent intactes. Afin de libérer les particules virales issues de ces cellules, une procédure a été suivie tout au long des passages en série dans les IRE/CTVM20 et en alternance IRE/CTVM20 – BSR. Six jours post-infection des cellules de tique avec KEMV, les cellules sont grattées pour être re-suspendues dans le milieu. Ces dernières sont ensuite centrifugées pendant 5 min à 200 g. Le surnageant est éliminé et les cellules sont remises en suspension dans 2 mL de milieu propre dans le but de les laver et re-centrifugées à 200 g pendant 5 min. Cette étape de lavage de cellules est réalisée au total trois fois. Les cellules sont ensuite re-suspendues dans 1 mL d'une solution

hypotonique (10mM HEPES, 1,5mM MgCl<sub>2</sub> et 10 mM KCl) et centrifugées à nouveau à 200 g pendant 5 min. Le surnageant est ensuite retiré, 1,5 mL de cette solution hypotonique est ajouté et laissé incubé pendant 10 min à température ambiante. L'aspect des cellules est observé au microscope. Une fois les cellules turgescentes, la suspension est transférée dans un homogénéiseur de Dounce. Dix allers-retours sont effectués afin de lyser les cellules complètement. Un mL de Vertrel XF est ensuite ajouté à la suspension et dix nouveaux allers-retours sont de nouveau effectués. Le mélange est ensuite transféré dans un tube pour être centrifugées à 2000 g pendant 5 min. La phase aqueuse est récupérée et un volume équivalent de L15/L15B est ajouté pour tamponner la solution. Cette suspension virale est ensuite utilisée pour infecter les cellules BSR ou IRE/CTVM20 selon s'il s'agit d'un passage en alternance ou en série dans les IRE/CTVM20.

#### 2.2.4 Cinétiques dans les cellules de tique et mammifère après 30 passages

Pour des raisons de contraintes de temps et de disponibilité de virus, les cinétiques dans les cellules BSR et IRE/CTVM20 sont des études préliminaires qui nécessiteront à être reproduites. Les résultats qui en découlent sont présentés en annexe.

Afin d'évaluer la fitness et la capacité de réplication de chaque passage 30 des trois séries (Ps.IRE 30, Ps.BSR 30 et P.alt 30) et de les comparer à la souche virale initiale (KEMV P3), des cinétiques de réplication ont été réalisées dans les deux types cellulaires (IRE/CTVM20 et BSR). Pour cela, les cellules IRE/CTVM20 (en flasques 12,5 cm<sup>2</sup>) et BSR (en flasques 25 cm<sup>2</sup>), ont été infectées avec une MOI, très faible, de 10<sup>-5</sup>. Les cinétiques ont été conduites sur 4 et 6 jours et une flasque de chaque série a été arrêtée pour ensuite extraire l'ARN à partir de la totalité des cellules et de 200 µL de surnageant. Des RT-PCR en temps réel ont ensuite été effectuées (cf. paragraphe 2.4.3).

### 2.3 Infections *in vivo*

Toutes les expérimentations animales faites au cours de cette thèse ont été validées par le ministère de la recherche française après approbation par le comité d'éthique pour l'expérimentation animale ANSES-ENVA-UPEC (Autorisation n°13-021, 19-004, 19-005 et 19-028).

#### 2.3.1 Les souris

- Les souris IFNAR<sup>-/-</sup>

Les souris IFNAR<sup>-/-</sup> utilisées au cours de cette thèse avaient des âges (moins d'1 an ou supérieur à 1 an) et des sexes différents (mâle ou femelle) selon l'expérimentation. Ces souris ont été utilisées pour la partie « Compétence vectorielle » (cf. Chapitre 1) et pour l'étude de KEMV. La susceptibilité

des souris IFNAR<sup>-/-</sup> pour les infections avec des orbivirus est connue et documentée (Mohd Jaafar, Belhouchet, Vitour, et al. 2014)(Calvo-Pinilla et al. 2009)(Calvo-Pinilla et al. 2014).

Deux types d'injection de virus ont été testées : injection intrapéritonéale (IP) et injection sous-cutanée (SC). L'IP est le mode d'injection le plus pratiqué en infectiologie. L'injection SC a été testée dans le but de simuler la route naturelle d'entrée du virus via une piqûre de tique.

### 2.3.2 Détermination de la dose minimale infectieuse en fonction de la voie d'injection

Dans le but de déterminer la dose minimale infectieuse de KEMV en souris IFNAR<sup>-/-</sup>, différentes doses en PFU de KEMV P3 ont été injectées en IP ou en SC. Avant d'être injecté, le virus a été purifié comme indiqué au paragraphe 2.2.3.1. et dilué en cascade de 10 en 10 dans du DMEM sans SVF.

Pour les injections en IP, sur la base de ce qui est décrit pour d'autres orbivirus, seules les doses 10<sup>2</sup> et 10<sup>3</sup> PFU ont été injectées. Deux souris par dose ont été utilisées. L'âge des souris était inférieur à 1 an et de sexes différents. Les symptômes ont été recueillis et à la fin de l'expérience, lorsqu'il était possible les organes : rate, foie, reins, poumons, cœur et cerveau ; ont été collectés pour une extraction d'ARN et une RT-PCR en temps réel. La dissection n'était pas possible quand la mort de la souris survenait pendant la nuit et les organes n'étaient donc plus exploitables (dégradation de l'ARN, cannibalisme).

Pour les injections en SC, les doses injectées étaient 10<sup>4</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>2</sup>, 10, 1 et 0,1 PFU. Deux souris par dose ont été utilisées et l'âge des souris était inférieur à 1 an. La constitution des groupes est décrite dans le tableau 4. Un suivi de la virémie a été effectué à J0, J2, J3, et J5 par RT-PCR en temps réel. Aucune dissection d'organes n'a été faite pour cette expérimentation.

Tableau 4: Constitution des groupes de souris IFNAR<sup>-/-</sup> en fonction du sexe des souris et des doses KEMV en PFU injectées en IC pour déterminer la dose minimale infectieuse

| Doses (PFU)     | Nombre de souris par dose | Femelle | Mâle |
|-----------------|---------------------------|---------|------|
| 10 <sup>4</sup> | 2                         | 2       | 0    |
| 10 <sup>3</sup> |                           | 1       | 1    |
| 10 <sup>2</sup> |                           | 1       | 1    |
| 10              |                           | 1       | 1    |
| 1               |                           | 0       | 2    |
| 0,1             |                           | 0       | 2    |

### 2.3.3 Evaluation du phénotype des passages 30 en souris IFNAR<sup>-/-</sup>

Afin d'évaluer le phénotype, en souris IFNAR<sup>-/-</sup>, de chaque passage 30 des trois séries (Ps.IRE 30, Ps.BSR 30 et P.alt 30) et de les comparer à la souche virale initiale (KEMV P3), des injections en

SC à une dose de  $10^3$  PFU ont été réalisées en suivant le tableau 5. La mortalité a été suivie pendant 10 jours. Pour les souris inoculées avec Ps. BSR30, des prélèvements sanguins ont été réalisés à J4 et J10 post-infection. Les souris ont été euthanasiées lorsque le point limite était atteint (prostration, inactivité, larmolement) et les organes ont été récupérés pour ces souris (foie, rate, reins, poumons, cœur et cerveau) ainsi que du sang (lorsque cela était possible). Les ARN des sangs et des organes ont été extraits (cf. paragraphe 2.4.2.) et testés en RT-PCR en temps réel (cf. paragraphe 2.4.3).

Tableau 5: Constitution des groupes de souris en fonction de l'âge et le sexe des souris IFNAR<sup>-/-</sup> et de la souche virale pour l'évaluation du phénotype des passages 30

| Souris         |                 | Nombre de souris par souche virale de KEMV injectées à une dose de $10^3$ PFU en SC |          |          |         |
|----------------|-----------------|---|----------|----------|---------|
| Age des souris | Sexe des souris | KEMV P3   | Ps.IRE30 | Ps.BSR30 | P.alt30 |
| <1 an          | Mâle            | 3   | 3        | 3        | 3       |
| >1 an          | Mâle            | 3   | 3        | 3        | 3       |
| >1 an          | Femelle         | 3   | 3        | 3        | 3       |

## 2.4 Biologie moléculaire

### 2.4.1 Extraction et une première purification des ARNdb

#### 2.4.1.1 Extraction des ARN à partir des cultures cellulaires

Les extractions d'ARN issus de cultures cellulaires ont été réalisées à partir d'un culot de cellules infectées obtenu après centrifugation à 2000 g pendant 10 min ou 200  $\mu$ L de surnageant. Un millilitre de RNA NOW™ (Ozyme) est ajouté et le mélange (culot-RNA NOW™ ou surnageant-RNA NOW™) est agité vigoureusement à la main jusqu'à dissolution du culot cellulaire. Ensuite, 200  $\mu$ L de chloroforme sont ajoutés et le mélange est agité pendant une minute, laissé incuber sur glace pendant 5 min et centrifugé pendant 10 min à 12 000g et 8°C. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube et un volume équivalent d'isopropanol est ajouté. Ce tube est placé sur glace pendant 5 min et centrifugé à 12 000 g et 4°C pendant 10 min. Le surnageant est retiré et le culot est lavé, deux fois, avec 1 mL d'éthanol à 75%. Après centrifugation à 12 000 g, 8°C pendant 10 min, l'éthanol est retiré et le culot est repris dans 50  $\mu$ L d'eau RNase free.

#### 2.4.1.2 Précipitation des ARNsb pour une première purification des ARNdb

Afin de purifier les ARNdb des ARNsb, une précipitation au chlorure de lithium à 2M est réalisée comme décrit dans (Houssam Attoui et al. 2000). Les ARN sont incubés toute une nuit à 4°C avec du chlorure de lithium à 2 M (concentration finale). Une centrifugation est ensuite faite à 12 000 g, 8°C

pendant 10 min afin de culotter les ARNsb. Le surnageant contenant les ARNdb est transféré dans un nouveau tube. Les ARNdb sont précipités à -20°C pendant 2h dans 2,5 volumes d'isopropanol et 0,5 volume d'acétate d'ammonium à 7,5 M. Le lavage du culot se fait comme décrit précédemment avec de l'éthanol à 75%. Les ARN ont été repris dans 50µL d'eau RNase free.

#### 2.4.2 Extraction des ARN viraux à partir du sang et d'organes de souris

L'extraction d'ARN à partir des sangs et des organes de souris a été réalisée sur colonnes en utilisant le kit NucleoSpin® RNA extract II (Macherey Nagel). Pour chaque extraction à partir du sang, un volume de 20µL de sang a été utilisé. Une portion de chaque organe (¼ foie, ½ rate, ½ rein, ½ poumon, ½ cœur et ½ cerveau) a d'abord été broyée dans 500 µL de DMEM avec 10% de SVF et 250µL de ce broyat ont été utilisés pour la suite de l'extraction. Le lysat broyé est chargé, dans un premier temps, sur une colonne permettant de filtrer le lysat pour assurer une meilleure extraction par la suite. L'extraction d'ARN a ensuite été effectuée en suivant les recommandations du fournisseur. Les ARN ont ensuite été élués dans 40 µL d'eau RNase free puis conservés à -80°C jusqu'à une prochaine utilisation.

#### 2.4.3 RT-PCR en temps réel pour la détection de KEMV

Le génome de KEMV se compose d'ARN double brin, il est donc nécessaire de le dénaturer avant la RT-PCR en temps réel. Pour cela les ARN sont chauffés à 99°C pendant 5 min et placés directement dans de la glace humectée. La RT-PCR en temps réel est réalisée en sonde Taqman® marquée en FAM-BHQ1 en suivant les recommandations du kit LightCycler® 480 RNA Master Hydrolysis (Roche Diagnostics) avec 2µl d'ARN dans un volume final de 20µL. L'appareil utilisé est le thermocycleur LightCycler 480®. La séquence ciblée est celle du segment 2 codant la VP2 (KEMV\_F 5'-GTCAGACGGATTTTCGACCTC-3', KEMV\_R 5' GCGAGCCAGATCCCGATGT-3' et KEMV\_Sonde 5'ACGGGCCAACACTCGTTCATCACAG-3') (Gondard et al. 2018). Tous les échantillons ont été testés en double. Le programme du thermocycleur est le suivant : 63°C pendant 3 min, 95°C pendant 30 s, 45 cycles à 95°C pendant 10 s, 60°C pendant 30 s et 72°C pendant 1 s, et une dernière étape à 40°C pendant 10s.

#### 2.4.4 Détermination de la séquence de base de KEMV et étude de la variabilité après un passage dans les cellules de tique par séquençage Sanger

- Préparation des différents plasmides en vue d'un clonage en bactérie

Afin de déterminer la séquence du KEMV P3 et celle du virus après un passage dans les cellules IRE/CTVM20, chaque segment du génome a été cloné pour ensuite être séquencé avec la méthode

Sanger. La procédure suivie est celle réalisée dans (Houssam Attoui et al. 2000) (S. Maan et al. 2007) et illustrée dans la figure 37.

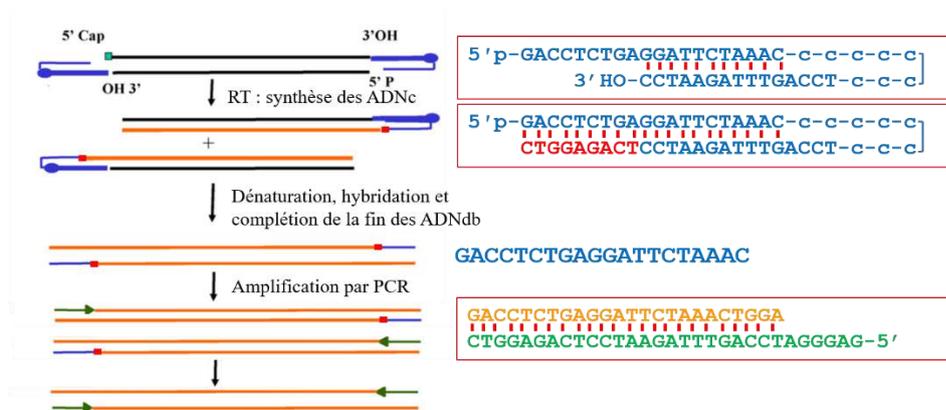


Figure 37: Stratégie de clonage de l'ARN génomique du KEMV (Houssam Attoui et al. 2000) (S. Maan et al. 2007)

A six jours post-infection, les cellules BSR et IRE/CTVM20 infectées sont culottées. Le culot cellulaire est dissout dans du RNA NOW™ pour en extraire les ARN comme décrit précédemment. Les ARNdb ont été purifiés après un traitement au chlorure de lithium à 2 M. Une amorce coudée (anchor primer) a été liguée en 3' des ARNdb (5'p-GACCTCTGAGGATTCTAAAC/iSp9/TCCAGTTTAGAATCC-OH3'). Cette amorce contient 9 carbones lui permettant de former un coude permettant une hybridation de la partie 3' sur la partie 5' (en bleu sur la figure 37), facilitant, pour la suite, l'amplification par PCR. La ligation s'est faite à 10°C toute une nuit avec la T4 RNA ligase (New England Biolabs) et 14µL d'ARNdb.

La totalité de la réaction de ligation a été déposée sur un gel d'agarose à 1% à 110 V pendant 45 min pour séparer les différents segments génomiques du KEMV. Les segments ont ensuite été découpés sur une table à UV à l'aide d'un scalpel. Le kit RNaid (MP Biomedicals) a été utilisé comme décrit précédemment (Houssam Attoui et al. 2000) pour récupérer les ARN à partir de l'agarose. Les ARN sont dénaturés dans de l'eau bouillante pendant 3 minutes pour séparer le brin positif du négatif, puis placés directement dans de la glace humectée pour empêcher la re-hybridation des brins. Les ARN dénaturés ont été rétro-transcrits en ADNc à 37°C pendant 1h à l'aide de la transcriptase inverse AMV RT (Roche). Les ADNc obtenus sont ensuite amplifiés par PCR avec la polymérase KOD Hot Start DNA (Novagen®) suivant les instructions du fournisseur, dans un volume final de 50 µL et en utilisant une amorce complémentaire de la partie 3' de l'amorce coudée (en vert sur la figure 37) (amorce 5-15-1: 3'-CTGGAGACTCCTAAGATTTGACCTAGGGAG-5'). L'amplification a été réalisée en utilisant le programme suivant : 95°C pendant 5 min (1 cycle) suivi de 40 cycles à 95°C pendant 30 s, 55°C pendant 45 s et 70°C pendant 3 min, et un cycle d'extension finale à 70°C pendant 10 min. Chaque

produit de PCR a été purifié avec le kit QIAquick PCR purification de QIAGEN® selon le protocole du fournisseur.

Deux plasmides différents ont été utilisés : pCI-neo et pGEz (élaboré par Dr Baptiste Monsion) et présentent respectivement un site de restriction unique pour NOT1 (GC<sup>^</sup>GGCCGC) et EagI (C<sup>^</sup>GGCCG). Les enzymes de restriction correspondantes ont été utilisées pour linéariser les deux plasmides. L'enzyme NotI a été utilisée pour digérer les produits de PCR issue de l'amplification des segments génomiques. Les digestions ont été réalisées à 37°C pendant 1h. Les plasmides ont ensuite été déphosphorylés avec le kit rAPid Alkaline phosphatase (Roche) pendant 15 min à 37°C et l'enzyme ensuite inactivée 75°C pendant 2 min. Les plasmides R ont ensuite été purifiés avec le kit QIAquick PCR purification de QIAGEN®. Les produits de PCR digérés ont ensuite été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% contenant du bromure d'éthidium (concentration finale 0,5 µg/mL) pendant 30 min à 110V. Les amplicons correspondant aux segments ont été découpés sur une table à UV à l'aide d'un scalpel et l'ADN purifié en suivant le protocole du Kit GeneClean® III (MP Biomedicals). Les ADN ont été élués dans 10µL d'eau RNase-free.

Les quantités de plasmides linéarisés et déphosphorylés et les amplicons d'ADN ont été estimés sur gel d'agarose avant de procéder à la ligation. Le ratio de l'amplicon au plasmide est défini par la taille du plasmide et de l'amplicon (intensité égale ou équivalente des deux produits sur gel d'agarose). La T4 DNA ligase (10 U/réaction : New England Biolabs) a été utilisée pour la réaction de ligation (volume total 10 µl) des plasmides et amplicons digérés et les tubes ont été incubés à 16°C pendant 16 heures.

- Transformation des bactéries et amplification des plasmides d'intérêt

Le plasmide pGEz a été préparé par le Dr. Baptiste Monsion (équipe ARMOR, UMR1161 virologie). Ce plasmide contient le gène *ccdB* qui permet de contre sélectionner les clones non-recombinants. Le clonage dans le site EagI aboutit à l'inactivation de *ccdB* (<https://blog.addgene.org/plasmids-101-ccdb-the-toxic-key-to-efficient-cloning>). Le variant de *ccdB* utilisé permet la contre sélection dans les bactéries DH5alpha. Dans le cas du plasmide pCI-neo les bactéries, XL1-Blue ont été utilisées. L'antibiotique utilisé pour la sélection des clones recombinants est l'ampicilline (100µg/mL, concentration finale) avec le plasmide pCI-neo et la zéocine (50µg/mL, concentration finale) avec le plasmide pGEz. Des bactéries chimiquement compétentes ont été utilisées. Les bactéries sont incubées sur glace pendant 30 min en présence du plasmide. Elles subissent ensuite un choc thermique à 42°C pendant 45 secondes avant d'être de nouveau remises sur glace pendant 2 min. Du milieu SOC (Invitrogen™) préchauffé est ajouté pour permettre aux cellules de récupérer qui sont incubées pendant 1h sous agitation avant d'être étalées sur boîte de pétri (LB agar) avec l'antibiotique correspondant et incubées à 37°C toute une nuit.

- Confirmation des clones recombinants

Le lendemain de la transformation, les clones obtenus sont testés en faisant des PCR sur colonies en suivant les recommandations du kit GoTaq® G2 Green Master Mix (Promega) dans un volume final de 25µL. Les amorces utilisées selon le plasmide sont pCI-neo F 3' AAGGCTAGAGTACTTAATACG 5', pCI-neo R 3' GTCTGCTCGAAGCATTAAACC 5', pGEz F 3' AACAGGGGCTGGTGAAATG 5' et pGEz R 3' GGCCATATCGGTGGTCATC 5'. Les produits de PCR sont ensuite analysés par électrophorèse sur gel d'agarose 1% à 110V pendant 30 min. Les colonies confirmées par PCR sont repiquées en milieu LB liquide avec de l'ampicilline ou zéocine et incubées toute une nuit. Les plasmides sont purifiés à l'aide du kit de Macherey Nagel Nucleospin® Plasmid. Les plasmides sont ensuite séquencés par la méthode de Sanger en utilisant le kit Bigdye terminator. L'assemblage et l'analyse des séquences ont été réalisés en utilisant des programmes de bio-informatique incluant : Serial Cloner (serialbasics), Chromas, WinGene et WinPep (Dy诺jet Research Inc.).

- Analyses des séquences

Les séquences des génomes du KEMV P3 et KEMV IRE20 ont été comparés avec des séquences disponibles d'orbivirus représentatifs d'espèces dont les isolats sont transmis par des moustiques, des moucheron piqueurs du genre *Culicoides* ou des tiques. Les séquences protéiques ont été déduites des cadres de lectures ouverts en utilisant les programmes WinGene et WinPep (Dy诺jet Research Inc.) (Mohd Jaafar, Belhouchet, Belaganahalli, et al. 2014). Les séquences protéiques ont été alignées en utilisant le programme Clustal X version 1.8 (J. D. Thompson et al. 1997). Les séquences nucléotidiques des cadres de lectures ouverts ont été alignés (codon par codon) sur le profil d'alignement des séquences protéiques correspondantes. Les arbres phylogénétiques ont été réalisées avec le programme MEGA X (Kumar et al. 2008). Les arbres de maximum likelihood (nearest neighbour interchange) ont été construits en utilisant le modèle Tamura-nei pour les acides nucléiques et le modèle Dayhoff pour les protéines.

#### 2.4.5 Mise au point de la purification des ARNdb en vue d'un séquençage NGS

Afin de purifier au maximum les ARNdb de KEMV des ARNsb cellulaires et messagers, deux techniques différentes ont été testées. La première est une méthode enzymatique par l'intermédiaire d'une RNase et la seconde est une méthode physique.

#### 2.4.5.1 Purification des ARN db par méthode enzymatique

La purification enzymatique des ARNdb a été faite à l'aide de la RNase A de Roche. Le but de cette étape était de déterminer la concentration optimale de RNase A pour éliminer un maximum d'ARNsb sans perdre d'ARNdb. Plusieurs concentrations ont été testées : 0,5 ; 2 ; 5 et 50 µg/mL avec différents temps d'incubation allant de 30 min à 1h30. La procédure suivie est la suivante : les ARN extraits avec le RNA NOW™ à partir d'une culture cellulaire sont d'abord précipités au chlorure de lithium 2M et repris dans 50µL d'eau RNase free. Les ARN sont ensuite dilués dans une solution concentrée de SSC (saline-sodium citrate : 20X composition). Les ARNs sont incubés pendant 30 min à température ambiante (concentration finale de SSC : 2X) pour promouvoir une hybridation complète des brins complémentaires de l'ARNdb. L'hybridation complète des ARNdb est nécessaire pour empêcher la dégradation des ARNdb par la RNase A. La RNase A est ensuite ajoutée et les réactions incubées à 37°C pendant le temps testé choisi. Du phénol/chloroforme/isoamyl alcohol (25/24/1) (PCA) est ensuite ajouté à volume égal. Les tubes sont ensuite centrifugés à 12 000 g pendant 5 min à température ambiante. La phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube (environ 100 µL). Un volume équivalent de SSC 2X est ajouté ainsi que 50 µL de PCA à nouveau. Après agitation, le mélange est centrifugé à 12 000 g pendant 5 min à température ambiante et la phase aqueuse est transférée dans un nouveau tube. Les ARNdb sont précipités dans 2,5 volumes d'isopropanol et 0,5 volume d'acétate d'ammonium à 7,5 M à -20°C pendant 2h. Une centrifugation à 15 000 g pendant 10 min à 8°C est ensuite effectuée et le surnageant est éliminé. Le culot d'ARNdb est ensuite lavé deux fois avec 1mL d'éthanol à 75% et centrifugé à 15 000 g pendant 10 min à 8°C. Les ARN sont repris dans 15 µL d'eau RNase free.

#### 2.4.5.2 Purification des ARNdb par méthode physique

La seconde méthode testée est la purification physique. Pour cela, après extraction et précipitation des ARN, ces derniers sont d'abord séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% à 110V pendant 30 min. La partie basse du gel contenant les ARNs de petite taille est découpée. Les pôles du générateur sont inversés et une migration à 110V est effectuée à nouveau pendant 20 min afin de regrouper dans un faible volume d'agarose tous les segments d'ARNdb. Ces segments sont ensuite découpés à l'aide d'un scalpel. L'ARN est récupéré de l'agarose éliminée en utilisant le kit RNaid (MP Biomedicals) comme décrit précédemment (Attoui et al., 2000). Les ARN subissent une seconde purification sur colonne avec le kit RNeasy (Qiagen) et sont élués dans 40µL d'eau RNase free. Le niveau de pureté est ensuite évalué sur gel d'acrylamide à 7,5%. Pour se faire, les ARN sont d'abord chauffés dans un volume égal avec du tampon Laemmli (Biorad) à 70°C pendant 5 min. Les ARNdb sont séparés par électrophorèse pendant 1h30 à 25 mA dans un mini gel (10x8 cm). A la fin de l'électrophorèse, le gel d'acrylamide est coloré dans une solution de bromure d'éthidium (concentration finale 0,5µg/mL) dans du tampon TAE (Tris acétate EDTA).

### 3 Résultats

#### 3.1 Infections cellulaires

##### 3.1.1 KEMV est associé aux cellules de mammifère et de tique

Après 6 jours d'infection dans les cellules de mammifère BSR et de tique IRE11, IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20, les ARN ont été extraits à partir du surnageant et des cellules et analysés sur gel d'agarose à 1% (Figure 38). L'aspect des cellules en fin d'infection diffère selon le type cellulaire. Les cellules BSR étaient toutes lysées tandis que les cellules de tique (les trois lignées) étaient intactes et ne montraient pas d'effets cytopathiques ou changements morphologiques. Comme pour les autres virus de la famille des *Reoviridae*, le virus Kemerovo demeure majoritairement associé aux débris cellulaires de BSR ou cellules de tique intactes. Les extractions d'ARN réalisées à partir des débris de cellules BSR ou de cellules de tiques intactes, culotées par centrifugation, montre que le génome viral est associé à ces fractions (figure 38). Le génome viral n'est pas visible sur gel lorsqu'il est extrait à partir des surnageants des cultures cellulaires (figure 38).

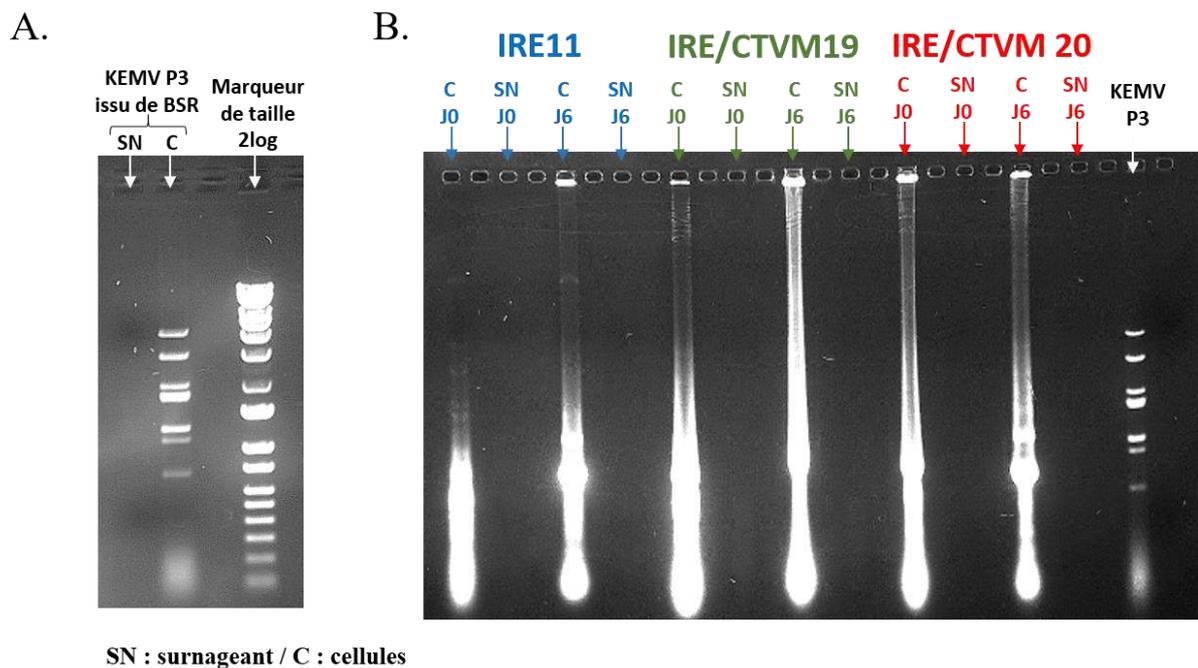


Figure 38: Electrophérotypes du génome de KEMV sur gel d'agarose à 1%. Les ARN viraux sont extraits de cellules BSR (A) et de cellules de tique (B)

### 3.1.2 KEMV dans les cellules de tique

#### 3.1.2.1 Choix de la lignée cellulaire de tique

Les trois lignées de cellules de tique (IRE11, IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20) ont été infectées avec du KEMV P3 de la même manière dans le but d'identifier la ou les lignée(s) cellulaire(s) susceptible(s) et permissive(s) pour l'infection par le virus Kemerovo. Les infections ont duré 6 jours et les ARN ont été extraits à partir des cellules culotées. Les ARN ont été ensuite précipités au chlorure de lithium à 2M et analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1% (Figure 39). Comme KEMV est associé aux débris cellulaires, les infections ont été réalisées en double avec du KEMV issu de BSR. Une flasque de chaque lignée a été arrêtée le jour même de l'infection pour servir de contrôle (J0). Six jours post-infection, selon la lignée de cellule, les résultats sont différents. La comparaison des extraits d'ARN obtenus à J0 et J6 à partir des cellules IRE11 et IRE/CTVM19 suggère qu'il y a une diminution plutôt qu'une augmentation de la quantité d'ARNdb par rapport à celles observées à J0. Dans les cellules IRE/CTVM20, la quantité d'ARN génomique est, quant à elle, significativement plus importante que celle observée à J0, ce qui suggère que ces cellules sont susceptibles à l'infection et permissive à la réplication du virus Kemerovo. De ce fait, les cellules IRE/CTVM20 ont été retenues pour la suite des travaux.

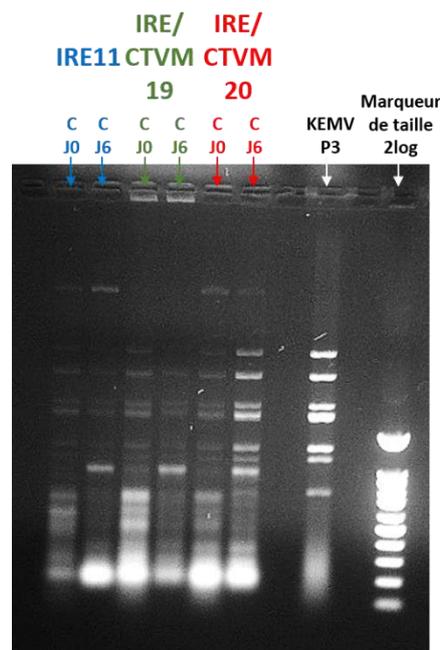


Figure 39: Comparaison des quantités d'ARN génomique du KEMV sur gel d'agarose à 1% à J0 et J6 post-infection dans les trois lignées de cellules de tique

#### 3.1.2.2 Détermination du temps d'infection des cellules de tique et premier passage en série dans ces cellules

Dans le but de déterminer le temps d'infection optimal dans les cellules de tique, cinq flasques de IRE/CTVM20 de 12,5 cm<sup>2</sup> ont été infectées et arrêtées à différents temps post-infection : J0, J3, J6, J8 et J10. Les ARN ont été séparés et analysés sur gel d'agarose à 1%. Ils sont présentés dans la figure 40. Jusqu'à J3 post-infection, la quantité d'ARN demeure inchangée. Par la suite, la quantité d'ARN a augmenté et reste inchangée entre J6 et J10. Le temps de récolte du virus/ARNdb dans les cellules IRE/CTVM20 avec du KEMV a donc été fixé à 6 jours. Ce temps est similaire à celui connu pour le BTV qui, en se répliquant dans les cellules KC, atteint un titre maximal à 6-7 jours post-infection (Fu 1995). L'expérience a été répétée en faisant un premier essai de passage en série. Les quantités d'ARNdb trouvées à J6 post-infection (P2) sont similaires à celles trouvées à J6 lors de la première infection (P1) (Figure 40).

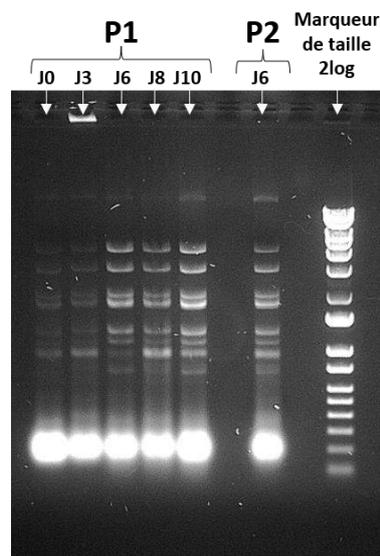


Figure 40: ARNdb extraits des cellules IRE/CTVM20 infectées avec du KEMV (P1) et comparaison avec un premier passage en série récolté à J6 (P2).

### 3.1.2.3 Infection persistante dans les cellules de tique

Les cellules KC s'infectent de manière persistante avec le BTV. Le suivi de ces cellules infectées montre que dans certains cas l'ARN génomique n'est plus observé à 9 mois post-infection. Afin de suivre une infection de KEMV sur une longue durée dans les cellules de tique et de comparer avec des données disponibles pour le BTV, des cellules IRE/CTVM20 ont été infectées par le virus Kemerovo et maintenues pendant 16 semaines, soit 112 jours. Un million de cellules ont été prélevées à J7, J14, J21 et J112 pour en extraire les ARN. Entre J21 et J112, aucune cellule n'a été prélevée. La figure 41 montre les profils électrophorétiques du KEMV à ces différents jours post-infection. Pendant les 3 premières semaines, soit jusqu'à J21, la quantité d'ARN est comparable. À J112 post-infection, KEMV semble toujours présent mais la quantité d'ARN a drastiquement diminué rendant les ARN très faiblement visibles sur gel d'agarose. Le titre du virus a diminué considérablement, au fil de l'infection persistante des cellules.

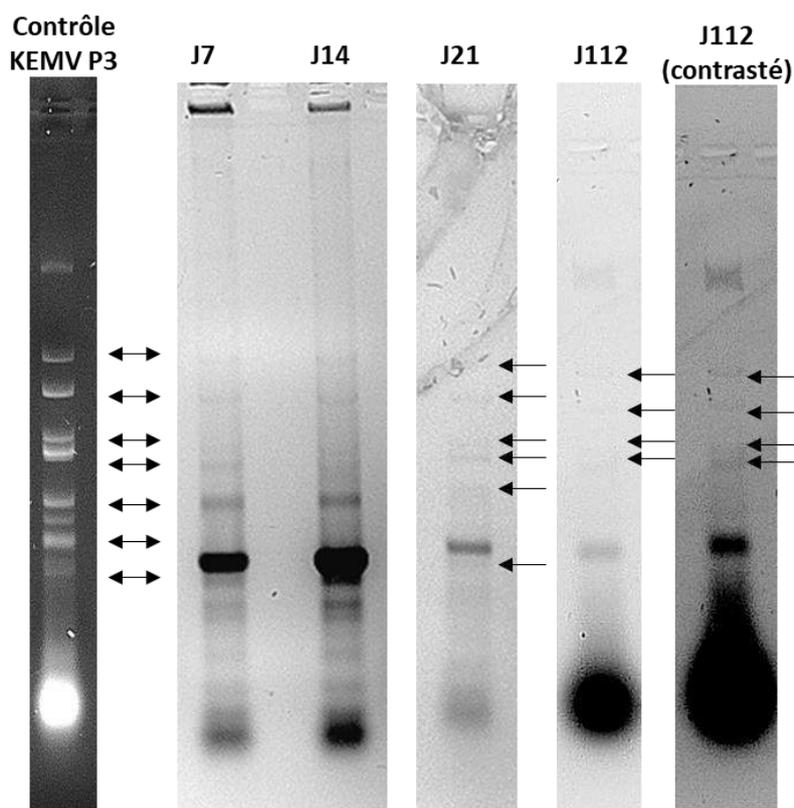


Figure 41: Persistance de KEMV dans les cellules IRE/CTVM20 infectées. L'image à J121 est contrastée davantage pour mieux voir les segments d'ARN génomiques.

### 3.1.3 Optimisation des infections avec le KEMV issu des cellules de tiques

Les travaux *in vitro* de cette thèse consistaient à produire des souches adaptées du KEMV en culture cellulaire en faisant 30 passages en série et en alternance dans les cellules de tique IRE/CTVM20 et de mammifère BSR. Dans un premier temps, un premier essai de passage en alternance a été réalisé en infectant des cellules BSR avec des cellules IRE/CTVM20 infectées avec le KEMV. Les cellules BSR ont bien été infectées et ces dernières étaient lysées. Le profil électrophorétique sur gel d'agarose à 1% présenté en figure 42 montre bien qu'il y a eu répllication de KEMV dans ces cellules. Cependant, au cours de l'infection des cellules de mammifère, nous avons observé que les cellules IRE/CTVM20 étaient toujours vivantes à 37°C pendant 4 jours. De plus, sur le profil électrophorétique, de l'ARN ribosomal de cellules de tique est visible (encadré en rouge sur la figure 42), ce qui suggère que les ARN présents sur ce profil sont non-seulement issus des cellules BSR mais également des cellules IRE/CTVM20.

Dans le cadre de l'étude de la variabilité génétique et de la fitness, nous cherchons à étudier l'information génétique qui est transmise au passage suivant. Il a donc été nécessaire d'optimiser la purification de KEMV produit dans les cellules de tique. Le nouveau protocole mis au point a permis de libérer les particules virales produites dans les cellules IRE/CTVM20 et d'infecter les cellules BSR, comme le montre la figure 42 (à droite). Les ARN ribosomiaux de cellules de tique sont absents sur le

profil électrophorétique et les cellules BSR étaient bien lysées. Ce protocole a donc été appliqué pour les passages en alternance et les passages en série dans les cellules de tique.

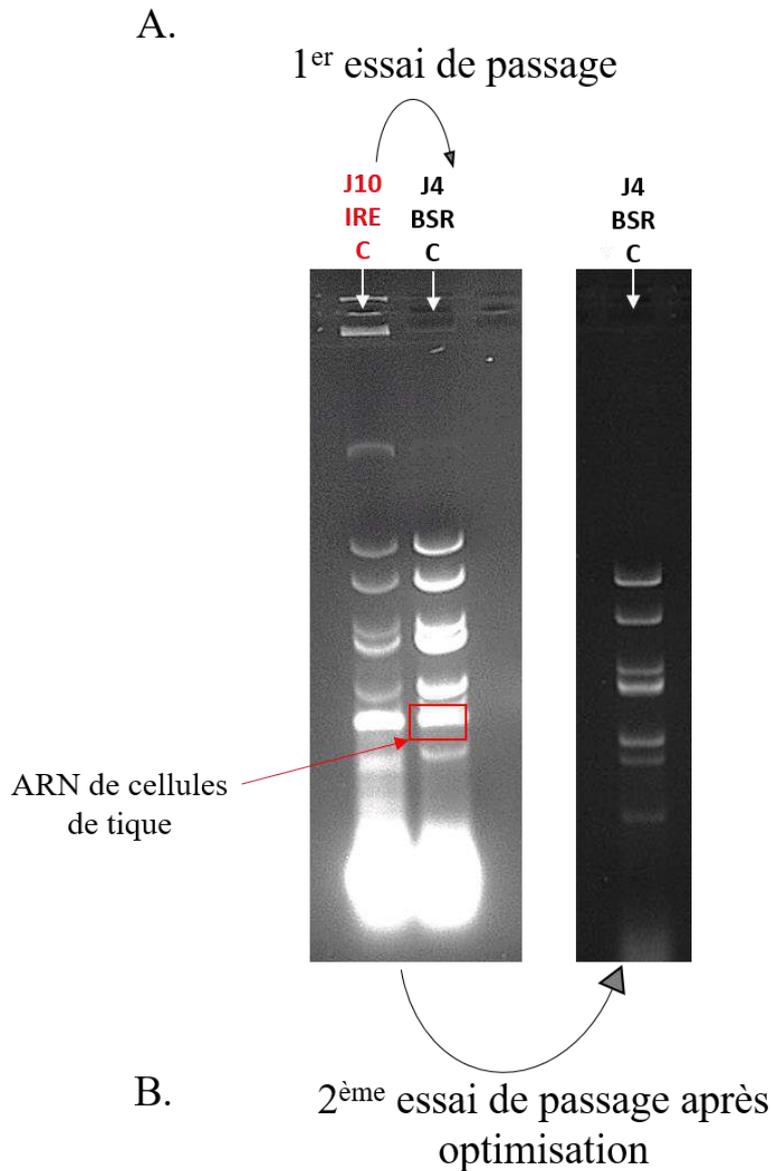


Figure 42: Profils électrophorétiques du génome de KEMV extrait à partir des cellules BSR et analysés sur gel d'agarose à 1% avant (A) et après (B) purification de l'inoculum issu des cellules IRE/CTVM20

### 3.2 Un orbivirus qui diffère des autres d'un point de vue physico-chimique

En général, les orbivirus transmis par les insectes comme les moustiques et les moucheron piqueurs peuvent être stockés à +4°C pendant plusieurs mois ou plusieurs années sans chute majeure du titre infectieux. Le virus Kemerovo contraste avec ces virus. Le titre viral en PFU/mL a été déterminé par la technique de plages de lyse, immédiatement après la production de KEMV P3 et était de  $1,32 \times 10^8$  PFU/mL. Après un stockage de 4 semaines à +4°C, KEMV P3 a de nouveau été titré par la technique de plages de lyse. Le nouveau titre était  $3,0 \times 10^6$  PFU/mL, soit une diminution de 2 log du titre exprimé

en PFU/mL. Le virus a été de nouveau retitré après un chauffage à 37°C pendant 15 min afin de voir si le virus s'était agrégé de manière réversible ou irréversible pendant le stockage à +4°C. Le titre après chauffage est de  $4,4 \times 10^6$  PFU/mL. Pour chaque titrage en plages de lyse, le génome viral a été quantifié en parallèle, par RT-PCR en temps réel et les valeurs de Ct étaient pour tous aux alentours de 10 (Figure 43). Les quantités d'ARN génomiques, et par conséquent le nombre de particules virales, ne semblent pas être affectées lors du stockage à +4°C. Au vu du titre reproductible après stockage à 4°C et réchauffement à 37°C, ainsi que des valeurs de Ct similaires lors des 3 titrages du virus, stocké à 4°C ou stocké puis réchauffé à 37°C, les particules virales de KEMV semblent s'agréger de manière irréversible lors d'un stockage à +4°C. Pour d'autres orbivirus comme le BTV, le stockage à +4°C de suspensions virales concentrées en présence de tensioactifs qui respectent l'intégrité de la particule virale, aboutit à une agrégation réversible lors du chauffage à 37°C. L'abstraction du tensioactif lors du stockage à +4°C aboutit à une agrégation irréversible (Mertens et al. 1996).

De ce fait, le virus Kemerovo a été aliquoté et conservé à -80°C tout au long de ces travaux de thèse, sachant qu'une congélation à -80°C et décongélation de ce virus comme pour d'autres virus de la famille *Reoviridae* provoque une perte d'environ un log du titre infectieux, ce qui a été attribué à une perte de la capside externe (Joklik 1983).

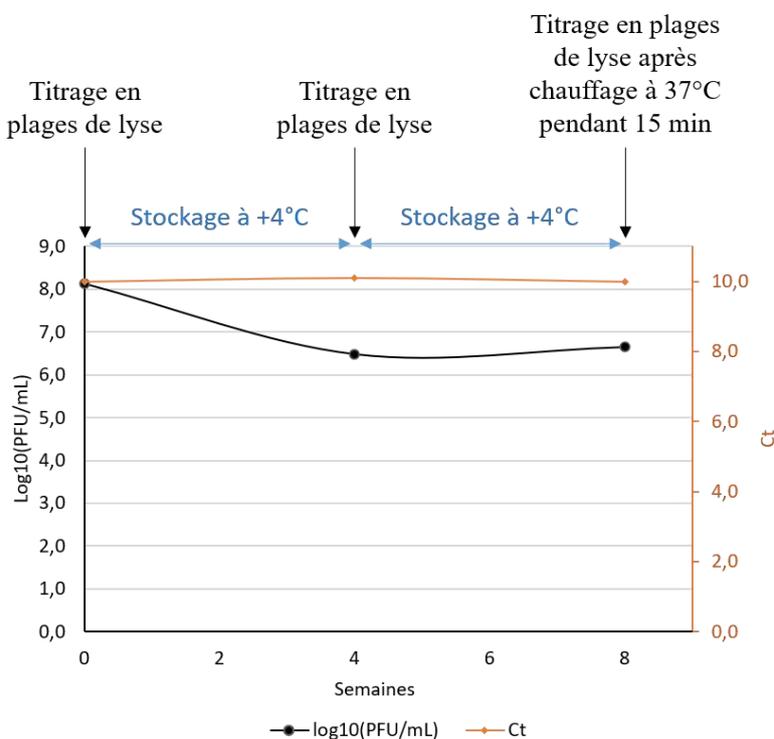


Figure 43: Évolution du titre viral en PFU/mL et par RT-PCR temps réel de KEMV au cours d'un stockage de 2 mois à +4°C

### 3.3 Titrage du KEMV

Le traitement au Vertrel XF des lysats issus de cellules de mammifères infectées, par des virus de la famille des *Reoviridae*, au fréon libère les particules virales de leur association avec les débris cellulaires. Afin de s'assurer que le titre infectieux de KEMV ne soit pas impacté par le traitement au solvant organique Vertrel XF, des titrages par la technique de plages de lyse ont été réalisés avec et sans solvant. De plus, nous nous sommes également intéressés au titre viral du KEMV après un passage en cellules de tiques IRE/CTVM20 et l'impact du protocole mis au point pour purifier les particules virales issues de ces cellules sur l'infectiosité de KEMV. La figure 44 résume tous les résultats obtenus. Les titres obtenus ici sont assez bas, puisque le KEMV P4 utilisé avait été stocké pendant plusieurs semaines à +4°C. Ce titre très bas qui n'est pas compatible avec les concentrations d'ARNdb extraits à partir de la même préparation. Nous avons donc investigué une potentielle dégradation des protéines de la capsid externe par des protéases issues d'une éventuelle contamination. Une coloration par le DAPI (diamidino-phenylindole) à confirmer l'existence d'un contaminant qui a été confirmé par PCR comme étant des mycoplasmes. Par conséquent, pour chaque infection, la ciprofloxacine a été utilisée à 1 µg/mL en concentration finale, ce qui a permis d'éliminer les mycoplasmes et de prévenir la diminution du titre infectieux lors du stockage à +4°C. Le titre demeure stable à environ  $4,4 \times 10^6$  PFU/mL et résulte de l'agrégation des particules virales puisque les quantités d'ARNdb (ARN génomique) ne sont pas diminuées.

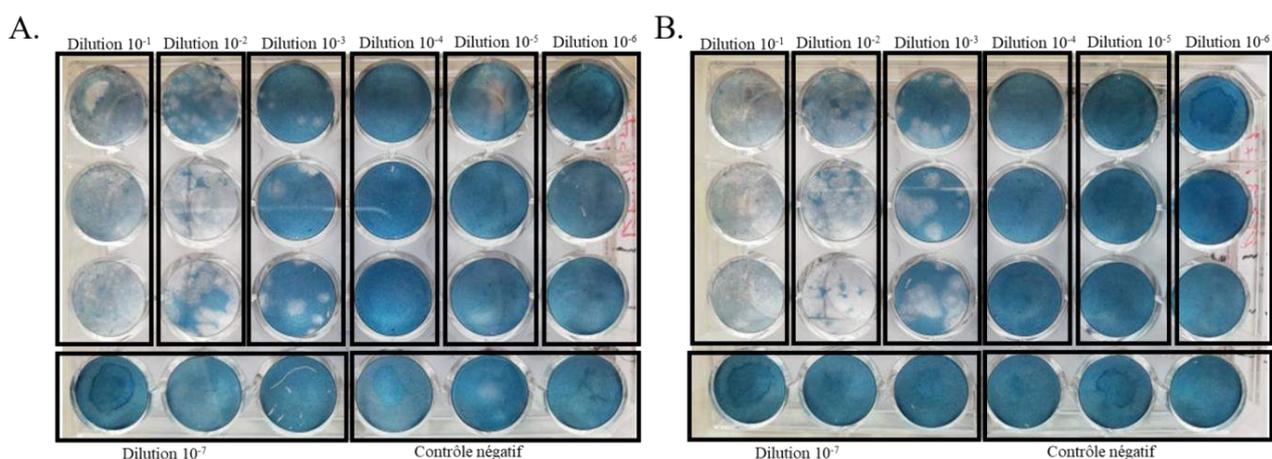


Figure 44: Titrage par plages de lyse dans les cellules BSR du KEMV P4 issu de BSR sans traitement (A), avec traitement au Vertrel XF (B)

#### 3.3.1 Le traitement au Vertrel XF n'impacte pas le titre viral

Le virus Kemerovo a été titré avec et sans purification des particules virales associées aux débris cellulaires BSR. Comme le montre les figures 44A et 44B, sans traitement, le titre a été estimé à  $2,0 \times 10^4$  PFU/mL et avec traitement, le titre est de  $4,8 \times 10^4$  PFU/mL. Le traitement au Vertrel XF n'impacte pas négativement le titre viral en PFU/mL. Les dilutions en cascade de suspensions virales issues des lysats

cellulaires aboutissent à une répartition non-homogène des particules virales. Le virus produit dans les BSR a été alors traité au Vertrel XF avant chaque infection, ce qui permet de travailler avec un titre homogène car les particules virales sont libérées des débris cellulaires. Le titrage du KEMV issu des cellules BSR traitées par la ciprofloxacine, est bien plus élevé ( $1,32 \times 10^8$  PFU/ml), confirmant l'effet délétère de la contamination par les mycoplasmes sur les protéines de la capsid externe et par conséquent sur le titre infectieux observé. Pour résumer, le titre du virus Kemerovo issu des cellules BSR traitées à la ciprofloxacine et fraîchement récolté est  $1,32 \times 10^8$  PFU/mL et il diminue par agrégation à  $+4^\circ\text{C}$  pour atteindre un titre stable à environ  $4,4 \times 10^6$  PFU/mL.

### 3.3.2 Validation du protocole de purification des particules virales produites en IRE/CTVM20

Des cellules IRE/CTVM20 ont été infectées avec le KEMV P4 utilisé précédemment. La production a été titré par la technique de plages de lyse dans les cellules BSR selon deux conditions afin de voir l'impact du protocole mis au point pour purifier les particules virales produites sur le titre infectieux. Les cellules IRE/CTVM20 infectées ont été re-suspendues à l'aide d'un grattoir à cellules. Une partie de la suspension a été utilisée en l'état pour le titrage et le reste a été traité avec le protocole de purification que nous avons mis au point. Brièvement, un état de turgescence a été induit aux cellules en les plaçant dans une solution hypotonique. La lyse a été permise par l'application de pression/dépression à l'aide d'un homogénéiseur de Dounce. Enfin les débris ont été traités au Vertrel XF. La solution, qui en résultait, a ensuite été titrée. Les titres obtenus pour KEMV issu de cellules de tiques sans et avec traitement sont, respectivement,  $4,9 \cdot 10^2$  et  $4,8 \cdot 10^2$  PFU/mL. Les titres obtenus à l'issue de cette expérimentation sont extrêmement bas. La raison pourrait être la présence de mycoplasme dans les cellules BSR qui ont servi pour le titrage. Au regard de ces résultats, nous pouvons toutefois valider le protocole de purification. L'infectiosité de KEMV n'est pas impactée par la procédure, qui de ce fait a été utilisée tout au long de cette thèse. Au fil des travaux, d'autres titrages de KEMV issu de cellules de tique IRE/CTVM20 ont été effectués et les titres étaient compris entre  $10^5$  et  $10^6$  PFU/mL.

## 3.4 Séquençage après un passage dans les cellules de tique

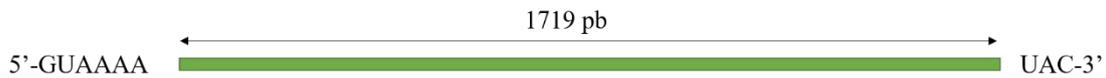
### 3.4.1 Détermination des séquences

Les segments d'ARNdb génomiques de KEMV ont été convertis en ADNc en ligant une amorce 'ancree' aux extrémités 3' de l'ARNdb suivi d'une transcription inverse. Les ADNc ont été amplifiées par PCR en utilisant une amorce unique complémentaire. Les amplicons clonés dans des plasmides ont été séquencés par la méthode de Sanger. Dans le temps imparti, des séquences quasi-complètes ont été déterminées sauf le segment 7 du KEMV P3 et les segments 4, 5 et 6 du KEMV produits dans les cellules de tique IRE/CTVM20. La liste des segments génomiques séquencés ainsi que leurs propriétés sont

présentées dans les tableaux 6 et 7. Comme chez tous les orbivirus, les séquences terminales en 5' et 3' sont relativement conservées entre les segments. Ces séquences terminales sont identiques, indépendamment de la provenance du virus (cellules BSR ou IRE/CTVM20). Les séquences conservées sont 5'-GUAAAA et UAC-3'. La comparaison des séquences de génomes issus des BSR et des cellules de tique montre que la longueur des segments en paires de base (pb) est la même, à l'exception du segment 1, et que la taille et la masse théorique des protéines qui sont codées, sont identiques (pas de substitutions identifiées) ou très similaires (substitutions identifiées au niveau des séquences en acides aminés). Une base d'adénine a été rajoutée en position 7 de la séquence nucléotidique du segment 1 de KEMV issu de cellules de tique.

Le séquençage du génome de KEMV P3 a permis d'identifier un segment 5 entier et une forme tronquée de ce même segment (segment défectif interférant (DI) qui a perdu 270 nucléotides à son extrémité 3'), bien qu'il ne soit pas visible sur gel dans l'électrophérotypage du génome (Figure 45). La comparaison de nos séquences à celles déposées dans les bases de données, montre que cette même forme de DI a été identifiée dans d'autres génomes de KEMV séquencés. Nous n'avons pas estimé le pourcentage de cette forme DI au sein du génome KEMV P3.

**Segment 5 complet :**



**Segment 5 tronqué :**

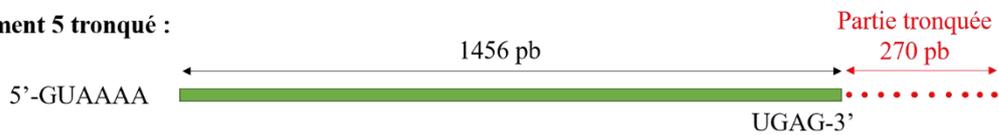


Figure 45: Segment 5 défectif interférant de KEMV P3

Tableau 6: Caractéristiques des segments génomiques du KEMV P3

| Segments  | Longueur (bp) | Protéines     |             | 5' NCR        |                      | 3' NCR                             |               |
|-----------|---------------|---------------|-------------|---------------|----------------------|------------------------------------|---------------|
|           |               | Longueur (bp) | Masse (kDa) | Longueur (bp) | Séquences terminales | Séquences terminales               | Longueur (bp) |
| 1         | 3896          | 1285          | 146.006     | 10            | 5'-GUAAAAU           | AAGGAUAC-3'                        | 31            |
| 2         | 2792          | 908           | 102.75      | 18            | 5'-GUAAAAC           | AAGGAUAC-3'                        | 50            |
| 3         | 1934          | 632           | 72.4        | 5             | 5'-GUAAAAU           | UAACUUAC-3'                        | 50            |
| 4         | 1730          | 554           | 62.56       | 17            | 5'-GUAAAAU           | CAAGAUAC-3'                        | 51            |
| 5         | 1719          | 529           | 60.03       | 39            | 5'-GUAAAAA           | UAAGAUAC-3'                        | 93            |
| 5*        | 1456          | 482           | 54.29       | 40            | 5'-GUAAAAA           | -                                  | 4             |
| 6         | 1668          | 537           | 59.44       | 22            | 5'-GUAAAAU           | UAGGUUAC-3'                        | 34            |
| 7         | -             | -             | -           | -             | -                    | -                                  | -             |
| 8         | 1183          | 357           | 39,5        | 18            | 5'-GUAAAAU           | UAAGUUAC-3'                        | 91            |
| 9         | 1049          | 317/151       | 34,2/17,6   | 58            | 5'-GUAAAAA           | AAAGAUAC-3'                        | 40            |
| 10        | 707           | 214/208       | 23.41       | 18            | 5'-GUAAAAU           | UAGGAUAC-3'                        | 47            |
| Consensus |               |               |             |               | 5'-GUAAAA            | <sup>A</sup> / <sub>U</sub> UAC-3' |               |

Tableau 7: Caractéristiques des segments génomiques du KEMV après un passage en cellules de tique IRE/CTVM20

| Segments  | Longueur (bp) | Protéines     |             | 5' NCR        |                      | 3' NCR                             |               |
|-----------|---------------|---------------|-------------|---------------|----------------------|------------------------------------|---------------|
|           |               | Longueur (bp) | Masse (kDa) | Longueur (bp) | Séquences terminales | Séquences terminales               | Longueur (bp) |
| 1         | 3897          | 1285          | 145,9       | 10            | 5'-GUAAAAA           | AGGAUAC-3'                         | 31            |
| 2         | 2792          | 908           | 102.75      | 18            | 5'-GUAAAAC           | AGGAUAC-3'                         | 50            |
| 3         | 1934          | 632           | 72.4        | 5             | 5'-GUAAAAU           | AACUUAC-3'                         | 33            |
| 4         | -             | -             | -           | -             | 5'-GUAAAAU           | -                                  | -             |
| 5         | -             | -             | -           | -             | 5'-GUAAAAA           | -                                  | -             |
| 6         | -             | -             | -           | -             | 5'-GUAAAAU           | -                                  | -             |
| 7         | 1197          | 368           | 40.93       | 45            | 5'-GUAAAAU           | AAGAUAC-3'                         | 48            |
| 8         | 1183          | 357           | 39,5        | 18            | 5'-GUAAAAU           | AUUUUAC-3'                         | 91            |
| 9         | 1049          | 317/151       | 34,2/17,6   | 58            | 5'-GUAAAAAU          | AAGAUAC-3'                         | 40            |
| 10        | 707           | 214/208       | 23.41       | 18            | 5'-GUAAAAU           | AGGAUAC-3'                         | 47            |
| Consensus |               |               |             |               | 5'-GUAAAA            | <sup>A</sup> / <sub>U</sub> UAC-3' |               |

### 3.4.2 Identification de substitutions synonymes et non synonymes dans le génome de KEMV après un passage unique dans les IRE/CTVM20

Des substitutions synonymes et non synonymes ont été mises en évidence en comparant les séquences de KEMV après un seul passage dans les cellules de tique (KEMV-IRE20) et les séquences de KEMV P3. Huit substitutions ont été identifiées dans la séquence nucléotidique du segment 1 de KEMV-IRE20, codant l'ARN polymérase ARN dépendante. Cependant, seulement une substitution (C2602T) a entraîné une modification au niveau de la séquence en acides aminés en position 864. Deux substitutions nucléotidiques non-synonymes ont été identifiées dans la séquence de la VP3 (enzyme de coiffage – complexe de transcription) et ont entraîné des modifications dans la séquence d'acides aminés en position 270 et 468. Au sein du segment 8, codant la VP7, une substitution nucléotidique en position 668 est à l'origine de la substitution en position 217 dans la séquence protéique (Tableau 8).

Tableau 8: Comparaison des séquences obtenues de KEMV issu des cellules IRE/CTVM20 avec la séquence du KEMV P3

| Segments | Protéines | Fonction de la protéine           | Substitutions nucléiques   | Substitutions amino-acides                 |
|----------|-----------|-----------------------------------|--|--|
| 1        | VP1       | ARN Polymérase ARN dépendante     | T673C, G863A, A1846G, T1995C, G2317A, <u>C2602T</u> , A2838G, G3521A | A864V(conservative)                        |
| 2        | VP2       | Protéine du core (T2)             | Non  | Non  |
| 3        | VP3       | Enzyme de coiffage                | T813A<br>G1408A  | S270T(conservative)<br>R468K(conservative) |
| 8        | VP7       | Protéine du core (T13)            | C668T  | A217V(conservative)                        |
| 9        | VP6       | Hélicase                          | Non  | Non  |
|          | NS4       | Interaction avec la cellule hôte  | Non  | Non  |
| 10       | NS3       | Libération des particules virales | Non  | Non  |

Le tableau 9 montre les pourcentages d'identité dans les séquences nucléotidiques et protéiques entre les segments des génomes de KEMV P3 et KEMV IRE20. Ce tableau indique un taux de conservation élevé entre les séquences nucléotidiques et protéiques.

Tableau 9 : Pourcentage d'identité dans les séquences nucléotidiques et protéiques de KEMV P3 et KEMV IRE20

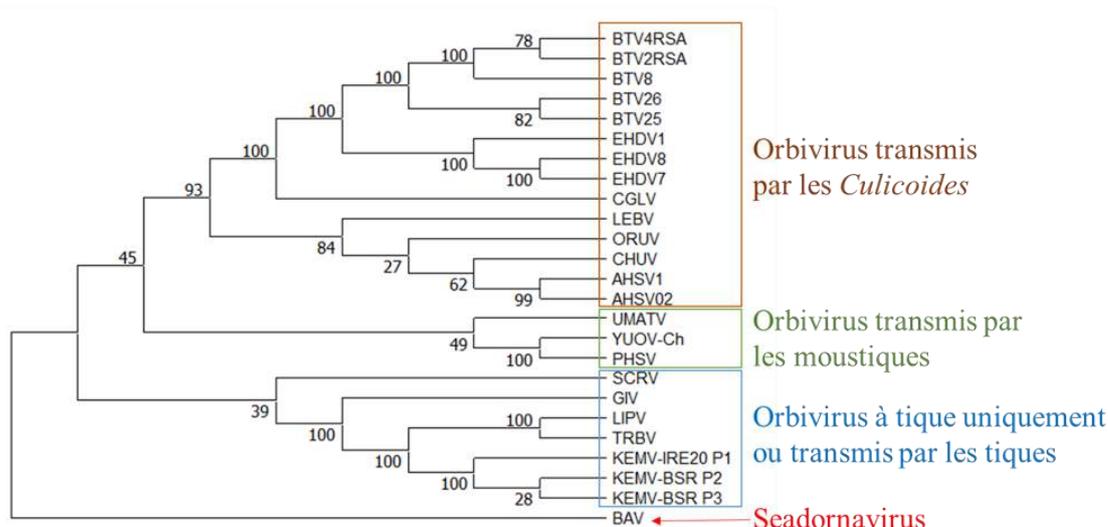
| Segments (séquences nucléotidiques) | % d'identité | Protéines (séquence en acides aminés déduits des ORF) | % identité |
|-------------------------------------|--------------|---|------------|
| 1                                   | 99           | VP1   | 99         |
| 2                                   | 100          | VP2   | 100        |
| 3                                   | 99           | VP3   | 99         |
| 8                                   | 99           | VP7   | 99         |
| 9                                   | 100          | VP6   | 100        |
|                                     |              | NS4   | 100        |
| 10                                  | 100          | NS3   | 100        |

### 3.4.3 D'un point de vue phylogénétique

La figure 46 montre les groupements ou 'clusters' phylogénétiques des orbivirus au sein d'arbres construits avec la méthode du Maximum Likelihood. Il s'agit de séquences (protéiques ou nucléotidiques) d'orbivirus représentatifs d'espèces dont les isolats sont transmis par des moustiques, des moucheron piqueurs du genre *Culicoides* ou des tiques, incluant le KEMV. L'arbre montré en 46A a été construit avec les séquences en acides aminés de la VP1 (ARN polymérase ARN-dépendante). La séquence de la polymérase du virus Banna a été utilisée comme 'outgroup'. L'arbre montré en 46B a été construit avec un alignement des séquences nucléotidiques des segments 7 (codant la VP7). Cet alignement des cadres de lectures ouverts (codon par codon) a été réalisé sur le profil d'alignement de la séquence protéique des VP7.

Ces arbres montrent que chacun des groupes (tiques-, moustiques- ou *Culicoides*-borne) est monophylétique, confirmant la relation étroite entre les orbivirus et leurs vecteurs. Les résultats obtenus pour KEMV montrent que les séquences de la VP1 du KEMV issu des cellules de tique ou des BSR forment un cluster, bien qu'il y ait des différences de séquences comme identifiées dans le tableau 8.

A.



B.

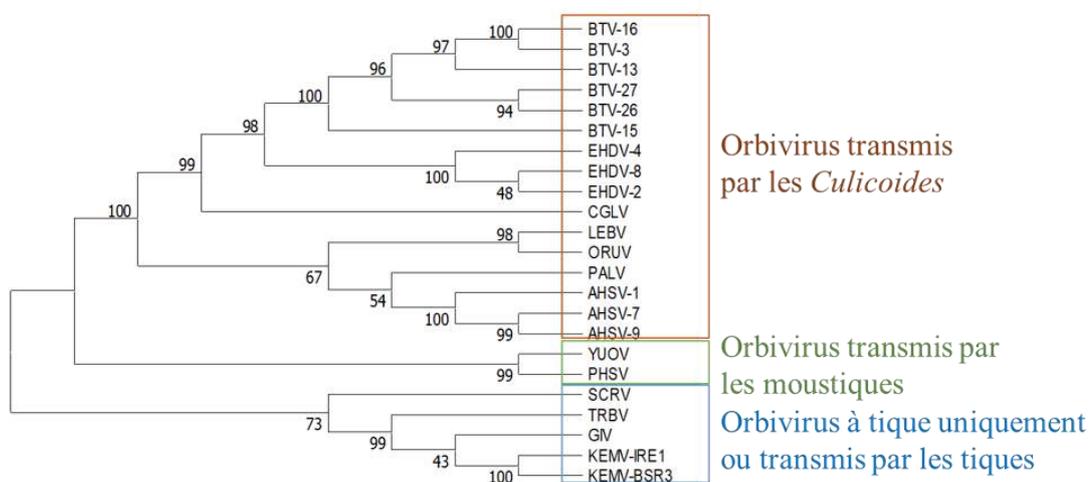


Figure 46 : Groupements phylogénétiques des orbivirus en utilisant la méthode du 'Maximum Likelihood'. Les séquences d'orbivirus sont regroupées au sein de 3 groupes ou 'clusters' monophylétiques, en fonction de leurs vecteurs respectifs. La figure 46A montre un arbre phylogénétique basé sur les séquences protéiques de la polymérase virale ARN-dépendante (VP1). La figure 46B est basée sur la séquence des acides nucléiques du segment 7 (codant la VP7). Dans cet arbre, les ORFs des segments 7 ont été alignés (codon par codon) sur le profil d'alignement des séquences protéiques de la VP7. Le modèle Dayhoff a été utilisé dans l'arbre de la VP1 et le modèle Tamura-Nei pour l'arbre du segment 7.

### 3.5 La production des 30 passages en série et en alternance

#### 3.5.1 Observations faites au cours des passages

La production des 30 passages en série et en alternance a duré 9 mois. Cette dernière a dû être arrêtée pendant 3 mois en raison de la pandémie du Covid-19 en 2020. Les temps d'infection entre chaque passage dans les cellules de tique ou mammifère étaient de 6 jours.

L'infection des cellules BSR, lors des passages en alternance ou en série, a nécessité un suivi quotidien au cours des 6 jours d'infection afin d'empêcher l'acidification du milieu de culture. Entre 2

et 3 jours post-infection, le milieu s'acidifiait au point d'entraîner la mort cellulaire mais aussi l'inactivation de l'infectiosité des particules néoformées. Les études antérieures réalisées avec le BTV montrent que la capsid externe se dissocie de la particule virale à pH 5 et que la particule virale se désintègre complètement quand le pH atteint 3 (Mertens et al. 1996). Afin de rétablir des valeurs de pH neutre, le surnageant de culture est tamponné avec une solution de bicarbonate de sodium à 7,5%. Toutes les cellules BSR étaient complètement lysées à la fin des 6 jours d'incubation, lors des passages en alternance. Au fil des passages en série dans les BSR, les cellules étaient de moins en moins lysées à 6 jours post-infection et formaient des chapelets de cellules. Cette association en chapelet dans les cellules BSR est induite par un nombre limité d'orbivirus, incluant le BTV. Quant aux cellules de tiques, elles n'ont subi aucun changement morphologique notable au cours des passages en série et en alternance.

### 3.5.2 Profils électrophorétiques du KEMV adapté en culture cellulaire

Les ARNdb de tous les passages ont été extraits à partir des cellules (de mammifère et de tique) et ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose à 1%.

#### 3.5.2.1 Passages en série dans les BSR

La figure 47 représente les profils électrophorétiques des différents passages de KEMV produits en série dans les cellules de mammifère BSR. La quantité d'ARN obtenue pour chaque passage est conséquente (comparable aux quantités d'ARN génomique des autres virus de la famille *Reoviridae* quand ils sont propagés dans les cellules de mammifères), la production du KEMV au cours de ces passages a été efficace. Les profils des 15 premiers passages sont homogènes. À partir du passage n°16, une bande supplémentaire d'ARNdb est visible juste en dessous du segment 2 et est observée dans les génomes issus des passages 16 à 30. La figure 48 montre clairement cette bande supplémentaire qui correspond vraisemblablement à un segment déficient interférent dont l'origine reste à déterminer. Il ne s'agit pas d'un 11<sup>ème</sup> segment empaqueté avec les 10 segments natifs du génome au sein d'une même particule virale. Comme connu pour d'autres virus de la famille des *Reoviridae*, il s'agit de populations mixtes où une particule contiendrait neuf segments natifs et un segment déficient interférent et d'autres particules contiennent les 10 segments natifs.

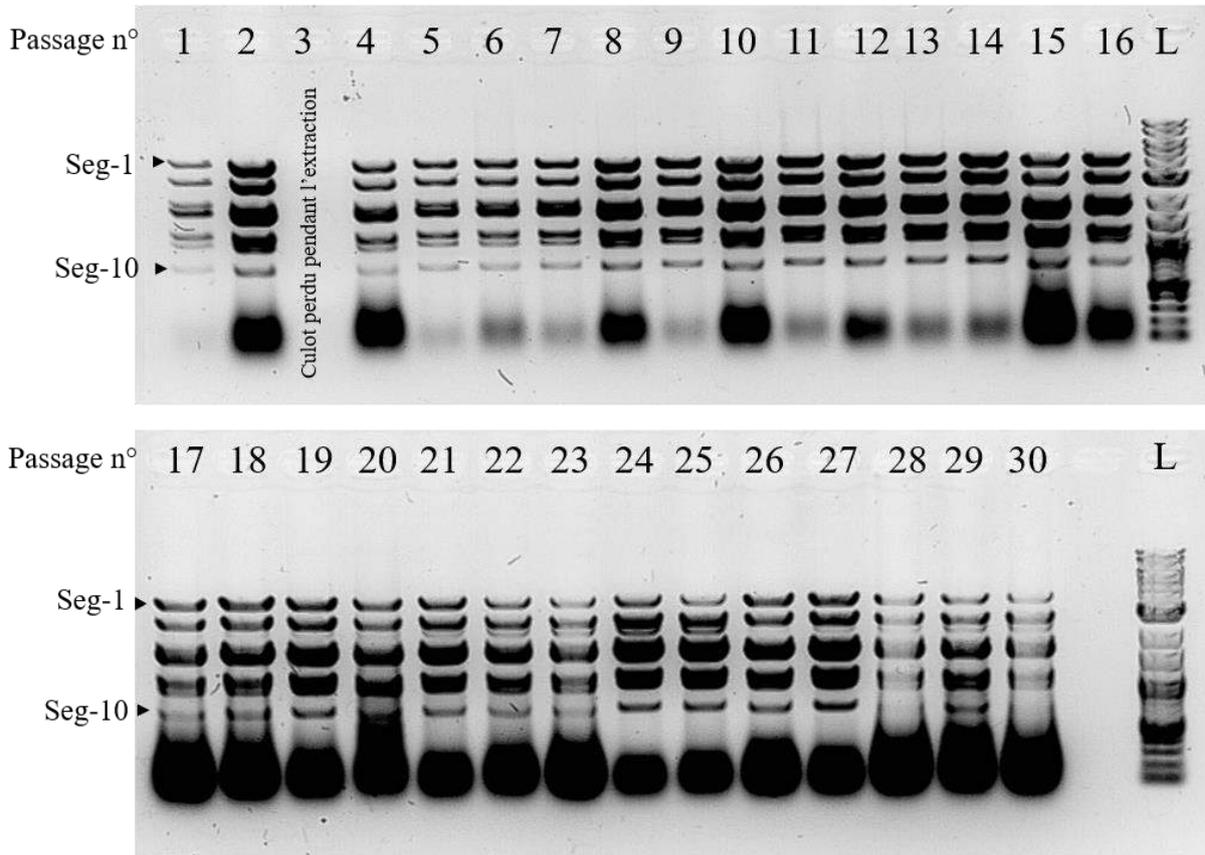


Figure 47: Electrophérotypes de KEMV au cours des 30 passages en série en cellules de mammifère BSR (L : Ladder, marqueur de taille 2log)

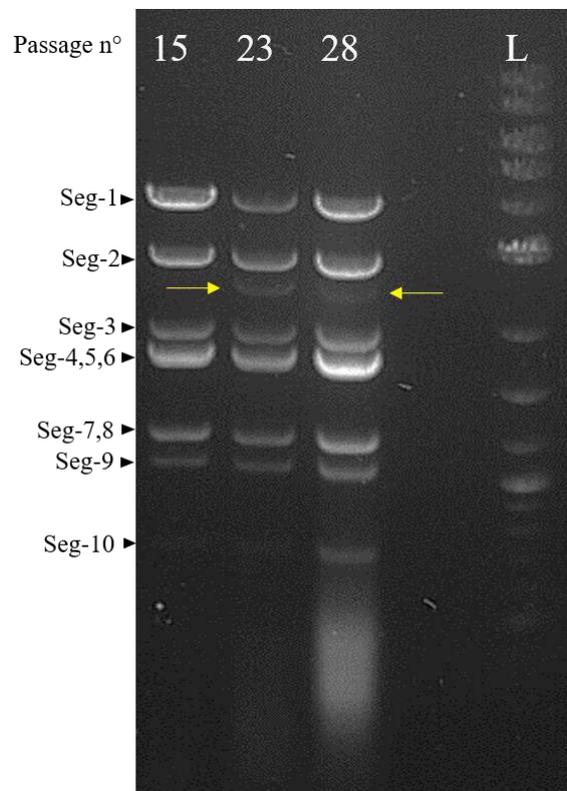


Figure 48: Électrophérotypes du génome de KEMV adapté aux cellules BSR avec mise en évidence du segment défectif interférent (L : Ladder, marqueur de taille 2log)

### 3.5.2.2 Passages en série dans les IRE/CTVM20

Pour des raisons d'économie d'échantillons, seuls les ARN des Ps.IRE 1, 5, 11, 15, 21, 25 et 29 ont été analysés sur gel d'agarose à 1% afin d'évaluer les électrophérotypes au cours des 30 passages du KEMV dans les IRE/CTVM20. La figure 49 représente les électrophérotypes de ces différents passages. Les quantités d'ARN sont plus faibles dans les passages 1, 21 et 25. Aucune bande supplémentaire correspondant à la bande DI identifiées dans les cellules BSR, n'est visible sur ces profils.

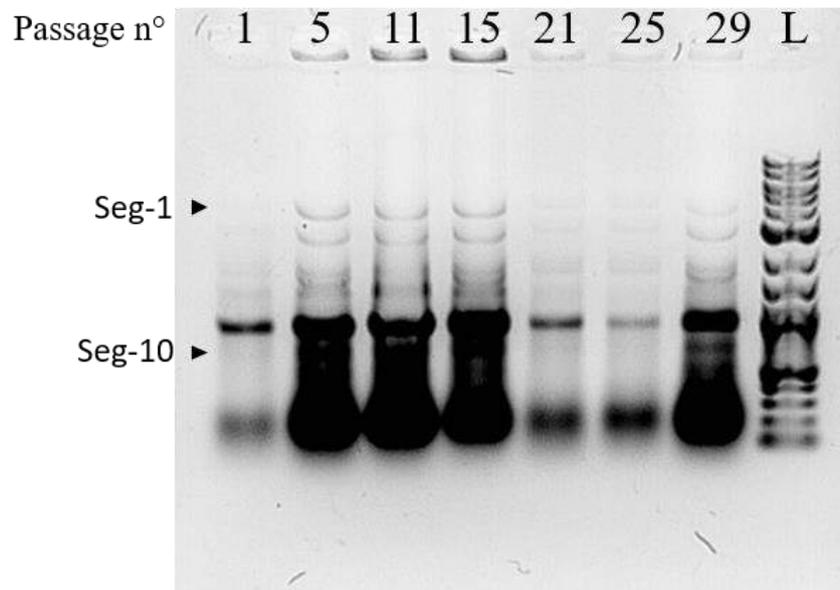


Figure 49: Electrophérotypes de KEMV au cours des passages en série dans les cellules de tique IRE/CTVM20 (L : Ladder, marqueur de taille 2log)

### 3.5.2.3 Passages en alternance dans les IRE/CTVM20 et BSR

La figure 50 représente les électrophérotypes du KEMV lors des passages en alternance dans les cellules de tique IRE/CTVM20 et de mammifère BSR. Les passages impairs correspondent aux passages effectués dans les IRE/CTVM20 et les pairs aux passages dans les BSR. Au vu de ces profils, la quantité d'ARN issus de cellules de mammifère est la même au fil des 15 premiers passages. De même, pour les ARN issus des IRE/CTVM20, les quantités retrouvées sont comparables entre elles. Pour les 15 derniers passages, la quantité d'ARN issus de IRE/CTVM20 et BSR semble avoir légèrement diminué pour ensuite augmenter au P.alt 30. Les ARN issus de BSR sont en quantité plus importante que ceux provenant des cellules IRE/CTVM20. Les profils des 30 passages sont homogènes, les 10 segments sont bien retrouvés et visibles. Leur taille correspond bien à ce qui est connu pour ce virus. Aucune bande supplémentaire n'est visible dans les 30 profils.

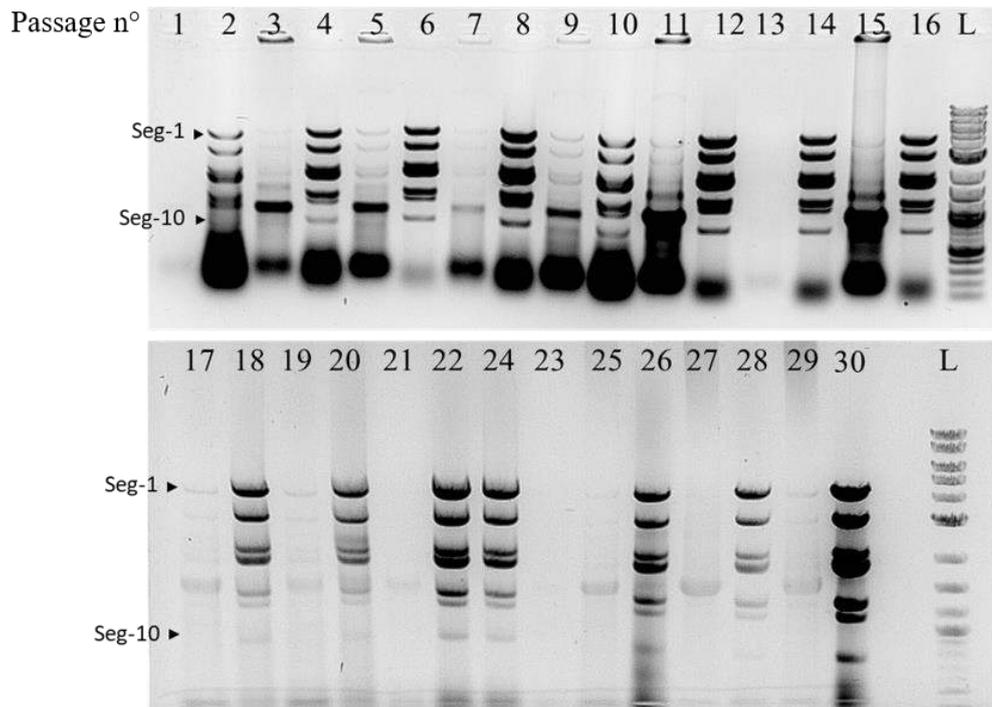


Figure 50: Electrophérotypes de KEMV au cours des passages en alternance dans les cellules de tique IRE/CTVM20 et de mammifère BSR (L : Ladder, marqueur de taille 2log)

### 3.5.3 Titre viral des différents passages

Il a été démontré pour les *Reoviridae* en général, et plus particulièrement les orbivirus qu'une congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  suivie d'une décongélation entraîne une perte de la capside externe (complète ou partielle), d'environ 80-90% des particules virales, entraînant ainsi une perte d'un log de titre infectieux (Joklik 1983).

Le titre infectieux en PFU/mL des différents passages en série et en alternance dans les cellules de tique et mammifère a été déterminé après les 30 passages. Pour les passages en série dans les IRE/CTVM20 et BSR, les passages 10, 20 et 30 ont été titrés. Pour les passages en alternance, seuls les passages où le contrôle de l'acidification du milieu a été le plus efficace malgré une légère baisse du pH, ont été titrés. Le tableau suivant indique le titre infectieux en fonction du type de passages (série ou alternance). Le titre infectieux de KEMV Ps.BSR, a été calculé à partir des différents titrages effectués. Au passages 10, 20 et 30 le titre infectieux observé était respectivement de  $6.1 \times 10^7$ ,  $2.0 \times 10^4$  et  $2.3 \cdot 10^3$  PFU/mL (tableau 10). Cette disparité entre le titre initial ( $4.4 \times 10^6$  PFU/mL) et celui du passage 30 est frappante et n'est pas cohérente avec l'analyse des profils électrophorétiques qui suggèrent au moins une stabilité des quantités d'ARNdb génomiques et par conséquent le nombre relatif des particules virales au fur et à mesure des passages. Nous avons remarqué au cours de ces passages un changement phénotypique du virus. En effet, à partir du 15<sup>ème</sup> passage, les cellules étaient de moins en moins lysées suggérant une potentielle perturbation du processus aboutissant à la lyse cellulaire. Ce changement phénotypique a coïncidé avec l'apparition du segment déficient interférant qui n'a pas été séquencé pour

déterminer de quel segment il est issu. Des cellules non-lysées et traitées avec le solvant organique Vertrel XF seront dénaturées tout en gardant le virus prisonnier de la masse cellulaire dénaturée. À partir du 20<sup>ème</sup> passage, les titres infectieux alors observés correspondraient seulement aux particules virales qui se trouvaient libres dans le surnageant. En effet, ce titre est similaire aux titres infectieux d'autres orbivirus déterminés à partir du titrage du surnageant des cultures infectées. Il ne s'agit donc pas d'une perte du titre viral mais plutôt d'un biais expérimental.

Les orbivirus propagés dans des cellules d'arthropodes, produisent en général des quantités de virus bien inférieures à celles produites dans des cellules de mammifères. Ceci est bien le cas du virus BTV produit dans les cellules KC (environ 1 log de différence). Le titre du KEMV produit dans les cellules IRE/CTVM20 est compris entre  $1.3 \times 10^5$  et  $3.7 \times 10^5$  PFU/mL (tableau 10). Cette différence de titre déterminé se reflète belle et bien dans la comparaison des quantités d'ARNdb observées lorsque les ARN extraits des cellules BSR et ceux des IRE/CTVM20 sont comparés (Figure 50).

Le titre du KEMV P.alt lors des passages 4, 10, 22, 24, 25 et 29, qui ont été stockés à  $-80^\circ\text{C}$  pendant plusieurs semaines à plusieurs mois ont des titres compris entre  $6.4 \times 10^5$  et  $7.0 \times 10^6$  PFU/mL (tableau 10). La comparaison de ces titres à celui calculé pour la souche utilisée initialement pour l'infection des cellules ainsi que la comparaison des quantités d'ARNdb issus de ces passages permet de conclure quant à l'effet combiné d'une agrégation, de l'acidification et de la congélation à  $-80^\circ\text{C}$  sur le titre infectieux observé. Ceci s'observe aussi avec le titre infectieux du P.alt 30, qui est de l'ordre de  $10^8$  PFU/mL, pour lequel le pH de ce passage est bien resté sous contrôle et son stockage a été fait immédiatement après la récolte, à  $-80^\circ\text{C}$  pendant une très courte durée.

Le tableau 11 montre les valeurs de titres infectieux de différents passages alternants où l'acidification n'a pu être contrôlée de manière optimale (acidification de la culture pendant la nuit). Ces résultats laissent suggérer que le titre infectieux de KEMV est très dépendant du pH des cultures et que même les petites variations influent de manière significative sur le titre infectieux de KEMV.

Tableau 10: Titres infectieux en PFU/mL de différents passages en série et alternance

| <b>Passages</b> | <b>4</b>          | <b>10</b>         | <b>20</b>         | <b>22</b>         | <b>24</b>         | <b>25</b>          | <b>29</b>         | <b>30</b>          |
|-----------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|--------------------|
| Souches         |                   |                   |                   |                   |                   |                    |                   |                    |
| P.alt           | $7.0 \times 10^6$ | $2.9 \times 10^6$ | -                 | $1.2 \times 10^6$ | $1.3 \times 10^6$ | $1.04 \times 10^6$ | $6.4 \times 10^5$ | $2.0 \times 10^8$  |
| Ps.IRE          | -                 | $1.3 \times 10^5$ | $3.7 \times 10^5$ | -                 | -                 | -                  | -                 | $2.23 \times 10^5$ |
| Ps.BSR          | -                 | $6.1 \times 10^7$ | $2.0 \times 10^4$ | -                 | -                 | -                  | -                 | $2.3 \times 10^3$  |

Tableau 11: Titres des passages intermédiaires de P.alt

| Passages P.alt | 4   | 5   | 9   | 10  | 14  | 15  | 16  | 17  | 18  | 19  | 20  | 21  | 22  | 23  | 24  | 25  | 29  | 30  |
|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Log10 (PFU/mL) | 6,8 | 4,8 | 4,8 | 6,5 | 4,8 | 4,7 | 3,7 | 5,3 | 4,4 | 3,7 | 4,4 | 3,2 | 6,1 | 5,7 | 6,0 | 6,0 | 5,8 | 8,3 |

### 3.6 Phénotype en souris IFNAR<sup>-/-</sup> après injection par voie sous-cutanée des passages 30

#### 3.6.1 Détermination de la dose minimale infectieuse de KEMV en souris IFNAR<sup>-/-</sup> selon la voie d'injection

La dose minimale infectieuse de KEMV en souris IFNAR<sup>-/-</sup> après inoculation par voie sous-cutanée, a été déterminée à 10<sup>3</sup> PFU. Ces résultats sont montrés dans l'article du chapitre 1b, soumis chez Viruses (C.V Migné *et al.*, Evaluation of vector competence of *Ixodes* ticks for KEMV, 2021). Les souris inoculées par la voie IP avec deux doses différentes 10<sup>2</sup> et 10<sup>3</sup> PFU sont toutes mortes à 2 jours post-infection et le virus a été détecté par RT-PCR en temps réel dans tous les organes prélevés (foie, rate, reins, cœur, poumons et cerveau). Selon la voie d'injection, la dose minimale infectieuse de KEMV en souris IFNAR<sup>-/-</sup> est différente. Pour la suite des travaux, toutes les souris ont été inoculées par la voie sous-cutanée à une dose 10<sup>3</sup> PFU.

#### 3.6.2 Suivi de mortalité

##### 3.6.2.1 Selon la souche virale injectée

Afin d'observer le phénotype de chaque souche, adaptée en culture cellulaire après 30 passages, en souris IFNAR<sup>-/-</sup>, ces dernières ont été inoculées par voie sous-cutanée à une dose de 10<sup>3</sup> PFU. Trois groupes de souris par souche inoculée ont été formés : 3 mâles IFNAR<sup>-/-</sup> de moins d'1 an, 3 mâles IFNAR<sup>-/-</sup> de plus d'1 an et 3 femelles IFNAR<sup>-/-</sup> de plus d'1 an. L'expérimentation a duré 10 jours. Le premier paramètre qui a été étudié est la mortalité induite en souris car 10<sup>3</sup> PFU est la dose minimale infectieuse du KEMV en souris IFNAR<sup>-/-</sup> déterminée dans le chapitre précédent. La figure 51 représente le suivi de mortalité des souris IFNAR<sup>-/-</sup> inoculées avec KEMV P3, Ps.BSR 30, Ps.IRE 30 et P.alt 30. Au cours de cette expérimentation, les signes cliniques observés communs aux différentes souches sont, dans l'ordre d'apparition : poils hérissés, dos voûté, larmolement et la prostration.

Les souris inoculées avec la souche d'origine KEMV P3 sont toutes mortes entre J3 et J4 post-inoculation (pi). Le premier signe clinique apparu (poil hérissé) a été observé chez un mâle de plus d'1 an à 24h pi. A J2 pi, un jeune mâle et une femelle, en plus de la souris précédente présentaient un pelage

hérissé. Le lendemain matin (J3), une femelle a été retrouvée morte, les 2 autres femelles avaient les poils non entretenus, le dos voûté, du larmolement mais étaient encore actives dans la cage. Parmi les jeunes mâles, tous avaient les mêmes symptômes décrits précédemment. Chez les mâles de plus d'un an, les signes cliniques étaient les mêmes mais d'intensité plus légère et les souris étaient très actives dans la cage. Au cours de l'après-midi, soit 5h après la visite du matin, une femelle a été retrouvée morte, la dernière était encore active. Les 3 jeunes mâles et un mâle âgé ont été euthanasiés, le point limite a été atteint (prostration, inactivité). Les 3 dernières souris restantes (2 mâles âgés et 1 femelle) sont mortes à J4 post-inoculation.

Selon la souche adaptée inoculée (Ps.BSR 30, Ps.IRE 30 et P.alt 30), le suivi de mortalité diffère. Avec la souche Ps.IRE 30, toutes les souris sont mortes et la mortalité a débuté à partir de J3 pi jusqu'à J6. Les femelles ont été les premières à montrer des signes cliniques à J2 pi. L'enregistrement de mortalité pour les souris inoculées avec le P.alt 30 est compris entre J3 et J7 pi, les 9 neufs souris sont toutes mortes. Chez certaines souris inoculées avec Ps.IRE 30 ou P.alt 30, des signes neurologiques et de la diarrhée ont également été observés. Seuls les jeunes mâles et les femelles du groupe Ps.BSR 30 sont morts à J6 pi.

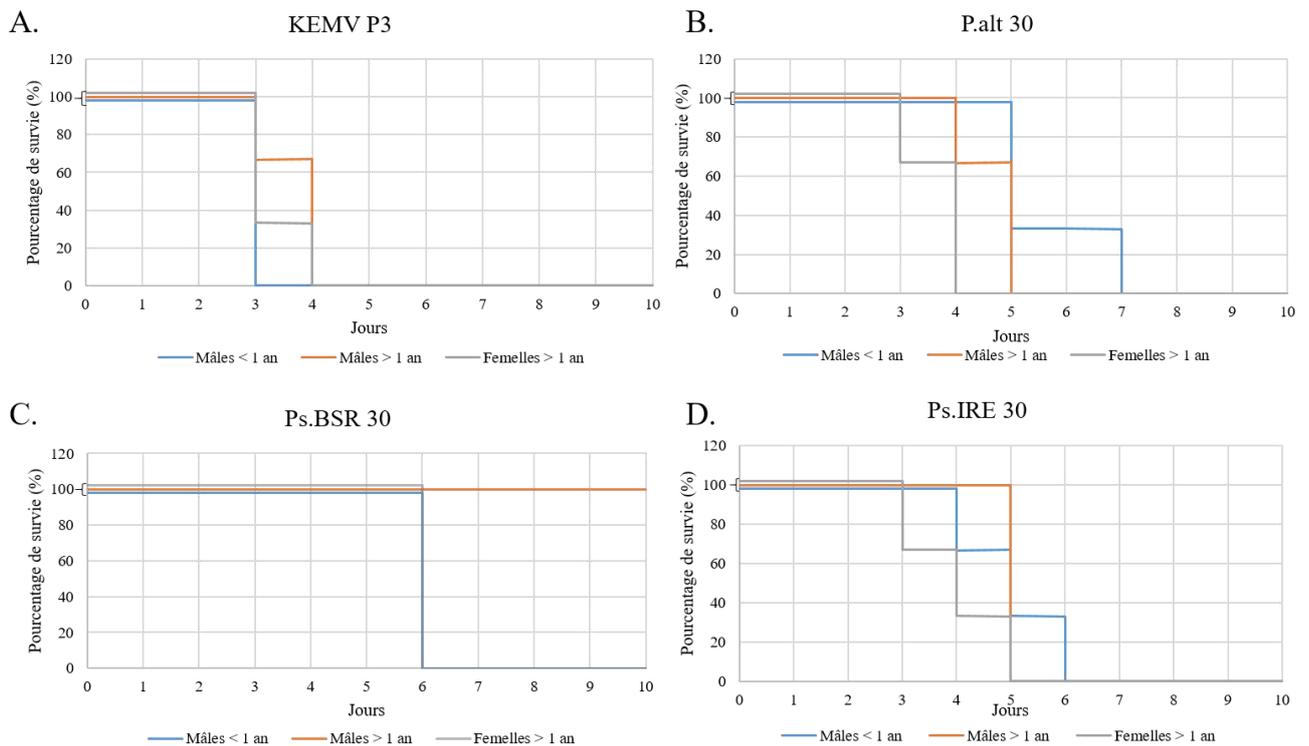


Figure 51: Suivi de mortalité en souris  $IFNAR^{-/-}$  selon la souche inoculée par voie SC à une dose de  $10^3$  PFU, (A) souche initiale KEMV P3, (B) souche adaptée après 30 passages en alternance dans les BSR et IRE/CTVM20, (C) souche adaptée après 30 passages dans les BSR et (D) souche adaptée après 30 passages dans les IRE/CTVM20

### 3.6.2.2 Selon l'âge et le sexe des souris IFNAR<sup>-/-</sup>

Selon l'âge et le sexe des souris IFNAR<sup>-/-</sup>, la sensibilité des souris aux différentes souches inoculées était différente (figure 52). Pour les 3 groupes de souris (âges et sexes confondus), la souche d'origine KEMV P3 a été la plus virulente, comparée aux autres souches inoculées. Avec les souches Ps.IRE 30 et P.alt 30, les femelles ont présenté les premiers signes cliniques à J2 pi et de mortalité à J3 pi. La mortalité des femelles inoculées avec P.alt 30 est similaire à celle observée avec KEMV P3. La mortalité chez les mâles (jeunes et âgés) inoculés avec P.alt 30 et Ps.IRE 30 est similaire. Avec la souche Ps.BSR 30, les premiers signes cliniques ont été observés chez les femelles à J4pi suivi des mâles (jeunes et âgés) à J5pi. À J6, les femelles et les jeunes mâles sont morts. Les mâles âgés étaient malades (pelage hérissé, dos voûté et larmolement) pendant 2 jours mais ont toujours été actifs dans la cage. À J4 pi, ces trois mâles présentaient un début de virémie (valeur de Ct supérieur à 30) (tableau 12) et ont commencé à développer des signes cliniques à J5pi. À partir de J8, deux mâles présentaient encore un pelage hérissé et seulement un avait du larmolement. Au jour suivant, les 3 mâles se portaient bien jusqu'à J10, fin de l'expérimentation. Le tableau 12 montre les valeurs de Ct obtenus pour la détection de KEMV dans le sang des souris IFNAR<sup>-/-</sup> pour lesquelles le prélèvement de sang était possible.

Ces résultats montrent clairement que selon la souche, l'âge et le sexe, la sensibilité des souris est très différente. Avec la souche d'origine, KEMV P3, l'âge et/ou le sexe n'influe pas sur la mortalité. Cet aspect contraste avec les résultats obtenus avec les souches adaptées. En effet, avec les souches Ps.IRE 30 et P.alt 30, les femelles âgées de plus d'1 an sont mortes en premières, à des jours similaires post-infection avec la souche d'origine. Les mâles jeunes et âgés meurent un peu plus tard, avec une mort légèrement plus rapide pour les mâles âgés. Avec la souche Ps.BSR 30, les femelles et les jeunes mâles sont morts le même jour. Les mâles âgés ont, quant eux, survécu à l'infection, après avoir développé des signes cliniques et une virémie.

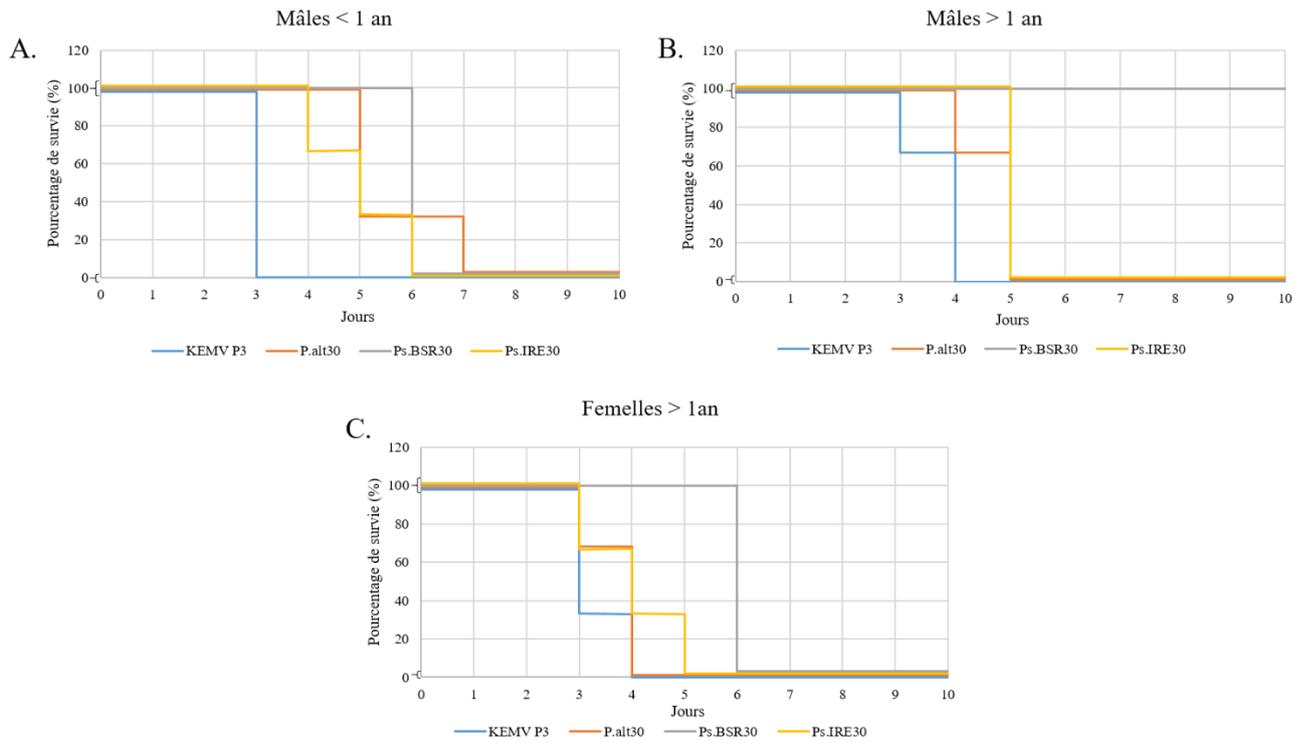


Figure 52: Suivi de mortalité en souris IFNAR<sup>-/-</sup> selon l'âge et le sexe des souris, (A) jeunes mâles de moins d'1 an (B) mâles de plus d'1 an et (C) femelles de plus d'1 an

Tableau 12: Détection de KEMV dans le sang des souris IFNAR<sup>-/-</sup> (- : non prélevé ou mort de l'animal avant, M : mort)

| Souches virales  | Groupes         | Souris | Ct Jour 0 | Ct Jour 3 | Ct Jour 4 | Ct Jour 5 | Ct Jour 6 | Ct Jour 7 | Ct Jour 10 |
|------------------|-----------------|--------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|
| <b>KEMV P3</b>   | Mâles < 1 an    | 1      | négatif   | 29.16     | M à J3    |           |           |           |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | 24.78     | M à J3    |           |           |           |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | 28.58     | M à J3    |           |           |           |            |
|                  | Mâles > 1 an    | 1      | négatif   | 28.76     | M à J3    |           |           |           |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | -         | M à J4    |           |           |           |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | M à J4    |           |           |           |            |
|                  | Femelles > 1 an | 1      | négatif   | -         | M à J3    |           |           |           |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | -         | M à J3    |           |           |           |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | M à J4    |           |           |           |            |
| <b>P.alt 30</b>  | Mâles < 1 an    | 1      | négatif   | -         | 31.62     | -         | M à J5    |           |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | -         | -         | 29.92     | M à J5    |           |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | -         | -         | -         | 28.61     | M à J7     |
|                  | Mâles > 1 an    | 1      | négatif   | -         | 29.21     | M à J4    |           |           |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | -         | 34.86     | -         | M à J5    |           |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | -         | 30.8      | M à J5    |           |            |
|                  | Femelles > 1 an | 1      | négatif   | 28.45     | M à J3    |           |           |           |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | 30.57     | -         | M à J4    |           |           |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | 28.76     | -         | M à J4    |           |           |            |
| <b>Ps.IRE 30</b> | Mâles < 1 an    | 1      | négatif   | -         | 31.62     | M à J4    |           |           |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | -         | 34.11     | -         | -         | M à J6    |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | 32.13     | -         | M à J5    |           |            |
|                  | Mâles > 1 an    | 1      | négatif   | -         | -         | M à J5    |           |           |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | -         | -         | M à J5    |           |           |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | -         | M à J5    |           |           |            |
|                  | Femelles > 1 an | 1      | négatif   | 33.93     | M à J3    |           |           |           |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | 36.23     | -         | M à J4    |           |           |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | -         | 29.33     | M à J5    |           |            |
| <b>Ps.BSR 30</b> | Mâles < 1 an    | 1      | négatif   | -         | 35.29     | -         | 31.57     | M à J6    |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | -         | 34.43     | -         | -         | M à J6    |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | 34.86     | -         | -         | M à J6    |            |
|                  | Mâles > 1 an    | 1      | négatif   | -         | 35.29     | -         | -         | -         | 36.77      |
|                  |                 | 2      | négatif   | -         | 34.39     | -         | -         | -         | négatif    |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | 35.05     | -         | -         | -         | 37.28      |
|                  | Femelles > 1 an | 1      | négatif   | -         | 36.6      | -         | 33.13     | M à J6    |            |
|                  |                 | 2      | négatif   | -         | 35.11     | -         | -         | M à J6    |            |
|                  |                 | 3      | négatif   | -         | 36.33     | -         | -         | M à J6    |            |

### 3.6.3 Evaluation du tropisme des souches adaptées par inoculation dans des souris IFNAR<sup>-/-</sup>

#### 3.6.3.1 Observations macroscopiques des organes

Lorsqu'il était possible, des dissections ont été réalisées sur les souris et différents organes ont été prélevés (foie, rate, reins, cœur, poumons et cerveau) pour des analyses par RT-PCR en temps réel. Les souris, qui sont mortes pendant la nuit ont été autopsiées dans le but d'observer l'état général des organes. Les organes n'ont, toutefois, pas été récupérés pour la RT-PCR en temps réel pour éviter d'introduire un biais au niveau des quantités d'ARN viral observées. En effet, pendant leur répllication, les virus de la famille des *Reoviridae* produisent des grandes quantités d'ARN, et selon diverses études,

seuls les ARNsb produits entre 2 et 12 heures sont encapsidés et constituent le génome des particules virales néoformées. Dans ces particules, une deuxième transcription s'effectue générant des quantités importantes d'ARNsb qui ne sont vraisemblablement pas encapsidés. Ces ARNsb contribuent à la détection par RT-PCR en temps réel et sont rapidement dégradés une fois que les cellules sont mortes. Pour toutes les souris, le cerveau, le cœur et les poumons avaient des aspects normaux. Les reins étaient également de couleur et de taille normales sauf pour un jeune mâle inoculé avec de KEMV P3 qui présentait un rein tuméfié (taille multipliée par 3 environ), rempli de liquide (figure 53A). La rate et le foie étaient les 2 organes qui présentaient des aspects très modifiés (Tableau 13) (figure 53B).

Tableau 13: Observations macroscopiques du foie et de la rate des souris IFNAR<sup>-/-</sup> inoculées avec des différentes souches virales

| Organes | Souches inoculées                            |   |   |   |
|---------|--|---|---|---|
|         | KEMV P3                                      | P.alt 30  | Ps.BSR 30   | Ps.IRE 30                                       |
| Rate    | Taille normale, foncée, tachetée jaune/blanc | Taille augmentée (x2), couleur foncée avec des taches blanches/jaunes ou entièrement de couleur jaune | Taille augmentée (x2), tachetée ou de couleur jaune                             | Taille augmentée (x2), tachetée blanc/jaune     |
| Foie    | Taille légèrement augmentée et décoloré      | Taille légèrement augmentée et décoloré   | Taille légèrement augmentée et décoloré (sauf pour les mâles âges, foie normal) | Taille augmentée voire très augmentée, décoloré |

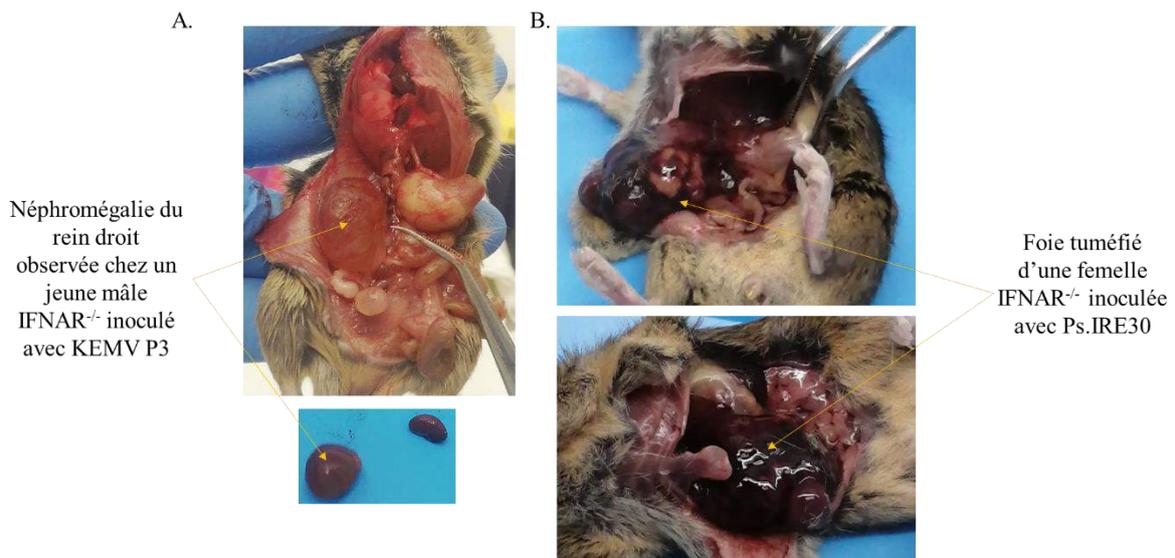


Figure 53: Néphromégalie du rein droit (A) et tuméfaction du foie (B)

### 3.6.3.2 Tropisme du KEMV P3 et des souches adaptées en culture cellulaire au sein d'un modèle animal

Les organes de souris IFNAR<sup>-/-</sup> (foie, rate, reins, poumons, cœur et cerveau), qui ont pu être prélevés, ont été analysés en RT-PCR en temps réel pour quantifier les ARN viraux dans chacun (figures 54 et 55). La souche KEMV P3 a été détectée dans tous les organes prélevés, majoritairement dans le foie, la rate, les poumons et les reins. Les souches adaptées sont également retrouvées dans tous les organes mais en plus faible quantité. La souche initiale du KEMV montre une plus grande capacité d'infection et de réplication au sein des organes par rapport aux souches adaptées en culture cellulaire. Le passage en culture cellulaire du KEMV a fortement atténué sa virulence. Des analyses statistiques n'étaient pas possibles au vu du très faible nombre d'échantillons disponibles et exploitables dans chaque groupe (parfois seulement un échantillon).

Les souris IFNAR<sup>-/-</sup> mâles, âgés et inoculés avec la souche Ps.BSR 30, ont été euthanasiés à la fin de l'expérience à 10 jours post-infection. Les organes ont été analysés par RT-PCR en temps réel. Pour ces 3 souris, tous les organes n'ont pas été trouvés positifs pour KEMV. Les valeurs de Ct obtenues en RT-PCR en temps réel étaient supérieures à 30. Pour une souris non-virémique, seule la rate contenait du virus. Les deux autres souris étaient virémiques et tous les organes, sauf le cœur et les reins pour une, avaient du virus détectable.

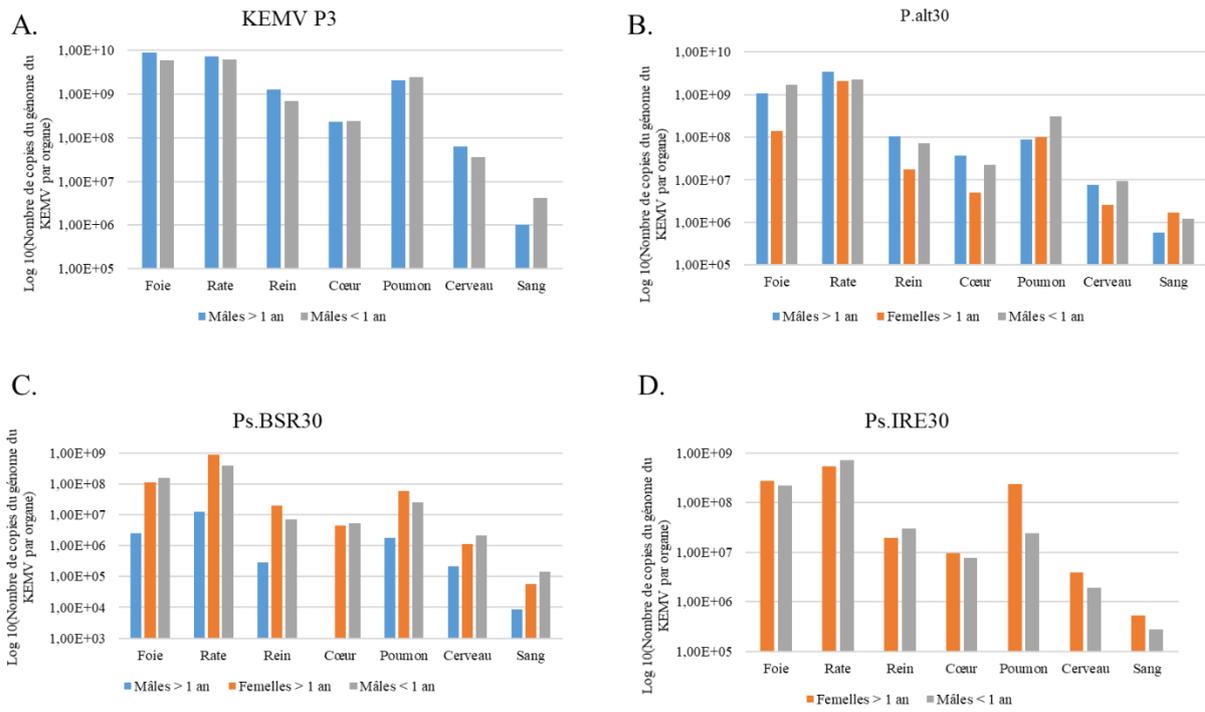
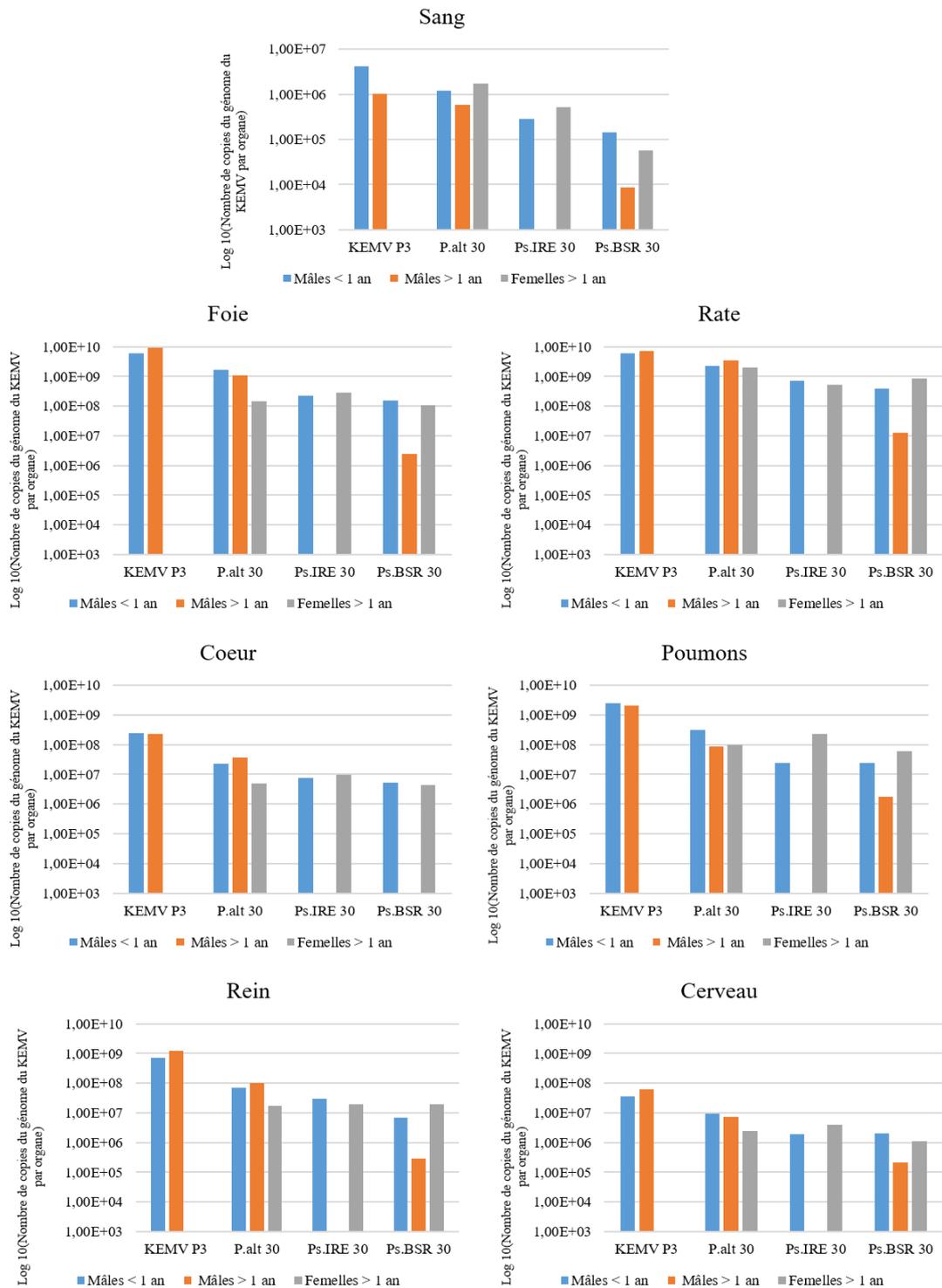


Figure 54: Répartition de KEMV dans le modèle animal, IFNAR<sup>-/-</sup>, selon la souche inoculée ainsi que l'âge et le sexe des souris, KEMV P3 (A), P.alt 30 (B), Ps.BSR 30 (C) et Ps.IRE 30 (D)



| Souches   | Nombre de souris dont les organes ont été prélevés |              |                 |
|-----------|--|--------------|-----------------|
|           | Mâles < 1 an                                       | Mâles > 1 an | Femelles > 1 an |
| KEMV P3   | 3  | 1            | 0               |
| P.alt 30  | 2  | 2            | 1               |
| Ps.IRE 30 | 1  | 0            | 2               |
| Ps.BSR 30 | 1  | 3            | 1               |

Figure 55: Quantification des ARN viraux dans les différents tissus selon la souche inoculée, l'âge et le sexe des souris IFNAR<sup>-/-</sup>

L'annexe 1 montre des résultats préliminaires sur un potentiel effet de la condition de culture des 3 souches adaptées (effet de l'alternance). Pour cela, les quantités d'ARN viraux issus des organes des différents groupes ont été regroupés par souches (sans distinction du sexe et d'âge bien que nous ayons mis en évidence un effet de l'âge et du sexe) dans le but d'augmenter le nombre d'échantillons par groupe et de mettre en évidence l'effet de l'alternance et du potentiel tropisme de KEMV au sein d'un modèle animal. D'autres expérimentations sont nécessaires avec des groupes d'animaux homogènes et de plus grand effectif.

L'annexe 2 montre des résultats préliminaires d'étude de la fitness des différentes souches adaptées dans les cellules de mammifère BSR et de tique IRE/CTVM20 (cinétiques de réplication). Les résultats actuels ne permettent pas de valider certaines conclusions. Pour des contraintes de temps et surtout de disponibilité de virus, les cellules ont été infecté à une MOI très faible ( $10^{-5}$ ). Les résultats obtenus sont surprenants et incohérents, nous avons préféré les mettre en annexe de ce manuscrit plutôt que de les incorporer dans le corps du texte. Des cinétiques supplémentaires sont nécessaires.

### 3.7 Méthodes de purification des ARNdb en vue d'un séquençage Illumina

Dans le cadre de l'étude de la variabilité génétique et, plus précisément de l'influence des passages en série et alternance dans les cellules de tique et mammifère sur la génétique du KEMV, un séquençage NGS (Séquençage de Nouvelle Génération) Illumina sera réalisé sur différents passages d'intérêt de chaque série. Ces études permettront par la suite d'évaluer l'évolution du génome du KEMV et l'étude des quasi-espèces générées. Afin de mener des telles études, il est nécessaire de purifier les ARNdb génomiques des ARNsb cellulaires et messagers afin de se focaliser sur la détermination des séquences des ARNdb transmis à la descendance. En effet, sur les différents électropherotypes observés tout au long de ces travaux, de faibles quantités d'ARNsb subsistent même après la précipitation de ces derniers au chlorure de lithium qui en élimine une proportion significative. Deux méthodes ont alors été testées pour purifier les ARNdb, une méthode enzymatique et une méthode physique.

#### 3.7.1 Par méthode enzymatique

Différentes concentrations de RNase A et différents temps d'incubation ont été testés : 0,5, 2, 5 et 50  $\mu\text{g/mL}$  et 30 min et 1h30 d'incubation. Comme le montre la figure 56, aucune de ces conditions n'est optimale pour la purification des ARNdb. Avec une concentration à 50  $\mu\text{g/mL}$  et un temps d'incubation de 30 min, tous les ARNdb ont été dégradés par l'enzyme et avec de la RNase A 10 fois moins concentrée, les ARNdb étaient intacts mais des ARNsb restaient (Figure 56A). Les concentrations 2 et 0,5  $\mu\text{g/mL}$  avec deux temps d'incubation différents ont été testés (Figure 56B). Après 30 min de traitement à la RNase A, les ARNdb ont complètement été dégradés tandis qu'avec 0,5  $\mu\text{g/mL}$ , les

ARNsb sont toujours présents en grande quantité. Après 1h30 de traitement, avec 0,5µg/mL les ARNdb ont commencé à être dégradés par l'enzyme. Au vu de ces résultats aléatoires et non reproductibles, la purification des ARNdb du KEMV par méthode enzymatique avec la RNase A n'a pas été retenue pour la suite.

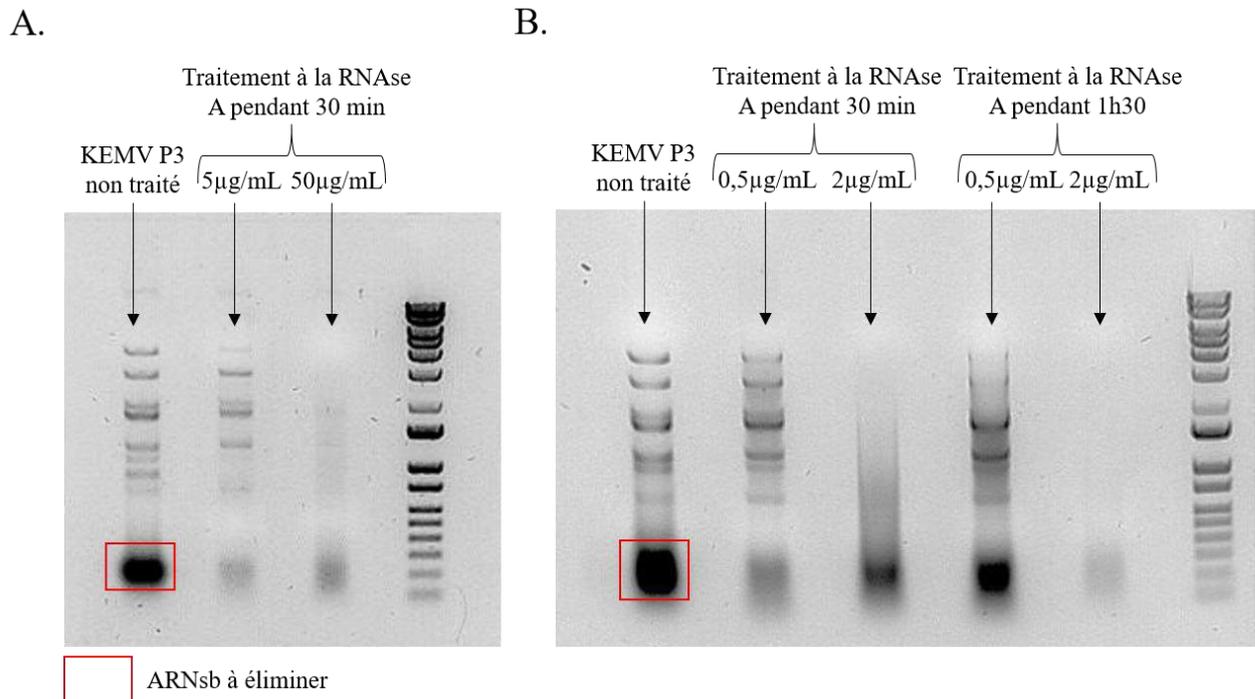


Figure 56: Profil électrophorétique du KEMV avec différentes conditions de traitement à la RNase A

### 3.7.2 Par méthode physique

La méthode physique a consisté à séparer sur gel d'agarose à 1% les différents segments du KEMV d'abord dans un premier sens de migration. Les ARNsb, étant plus petits que les ARNdb, migrent plus vite et plus loin. Ils sont retrouvés au niveau de la partie basse du gel d'agarose. La portion du gel, qui les contient, est alors éliminée en la coupant à l'aide d'un scalpel sur table UV. Les pôles négatif et positif du générateur ont été ensuite inversés afin de regrouper dans un faible volume d'agarose les 10 segments de KEMV. Les ARNdb ont ensuite été purifiés par adsorption sur billes de silice en suspension en utilisant le kit RNaid suivi d'une purification sur colonne RNeasy. Les ARNdb sont ensuite analysés sur gel d'acrylamide à 7,5% pour s'assurer de leur pureté et l'absence de dégradation potentielle. Cette méthode de purification a été validée et retenue pour la suite des travaux.

### 3.8 Discussion des résultats

Au cours de ces travaux, nous avons pu recueillir des informations sur la biologie de KEMV, qui à l'heure actuelle fait partie des « virus oubliés ». Très peu d'informations sont disponibles sur certains aspects biologiques et physico-chimiques de ce virus. Comme pour d'autres orbivirus, nous avons confirmé que le virus Kemerovo, en culture cellulaire, est associé aux cellules. Lors d'infection de cellules de mammifère, comme les BSR, ces dernières sont lysées et le virus reste associé aux débris cellulaires. Au cours des infections réalisées dans les cellules de tique, aucune lyse n'est induite par le virus et le virus est majoritairement contenu au sein de ces cellules. Il existe 3 lignées de cellules de tique *Ixodes ricinus* désignées IRE11, IRE/CTVM 19 et 20 (Bell-Sakyi et al. 2007) et nous les avons testées lors de nos travaux. Ces trois lignées ont été inoculées avec le KEMV et seules les cellules IRE/CTVM20 ont été susceptibles à l'infection et permissives à la réplication du virus Kemerovo. La suite des travaux s'est donc effectuée avec les cellules IRE/CTVM20. La permissivité de cette lignée cellulaire a déjà été décrite pour d'autres virus transmis par les tiques tels que TBEV, Louping ill (LIV) et Uukuniemi (UUKV) (Weisheit et al. 2015)(Lemasson et al. 2021)(Mazelier et al. 2016). KEMV peut infecter ces cellules de manière persistante. Au bout de 3 mois, le titre du virus a diminué considérablement au fil de l'infection persistante des cellules. Des travaux effectués avec le BTV et des cellules de *Culicoides sonorensis* (cellules KC) ont montré que le virus infectait de manière persistante ces cellules pendant 6 à 9 mois sans provoquer d'effet cytopathique (P.S. Mellor 1990) (P.S. Mellor, Boorman, and Baylis 2000) (Fu 1995). L'implication de la protéine NS3 dans l'exocytose par bourgeonnement a été fortement suggérée (Noad and Roy 2009) et validée (Ftaich et al. 2015). À la fin de cette période, les cellules se négativalent pour le virus suggérant ainsi un « silencing » potentiel de la réplication du virus (P.S. Mellor 1990) (P.S. Mellor, Boorman, and Baylis 2000). De la même manière que le BTV dans les cellules KC, les cellules IRE/CTVM20 sont infectées de manière persistante avec le KEMV et ne présentent pas d'effet cytopathique. Ces observations suggèrent que l'infection de manière persistante des cellules d'arthropodes est une propriété commune aux orbivirus. Il est notable que le BTV infecte les moucheron *Culicoides* pendant toute leur durée de vie (P.S. Mellor, Boorman, and Baylis 2000).

D'un point de vue physico-chimique, KEMV diffère dans certains aspects des orbivirus transmis par les insectes comme le BTV. En effet, les orbivirus transmis par les insectes peuvent être stockés pendant de très longues périodes (quelques mois voire des années) à +4°C sans perte majeure du titre infectieux. KEMV contraste avec ces virus et nous avons pu mettre en évidence qu'il s'agrégeait de manière irréversible lors d'un stockage à +4°C pendant quelques semaines. De plus, au cours de ces travaux, nous avons découvert une contamination des cellules BSR avec des mycoplasmes. Ces micro-organismes sont connus pour sécréter des protéases (Ganter et al. 2019). En cas d'exposition aux protéases, les protéines d'attachement cellulaire des orbivirus comme le BTV, l'EHDV et l'AHSV sont

clivées, générant ainsi des particules plus infectieuses désignées « infectious subviral particles » (ISVP). L'infectiosité de ces ISVP est augmentée dans les cellules de mammifère comme les BHK-21 et cellules d'arthropodes (Mertens et al. 1996)(A. J. Wilson et al. 2009)(Dinkins, Stallknecht, and Brackett 2001). L'augmentation de l'infectiosité est plus prononcée dans les cellules d'arthropodes (augmentation de 100 à 1000 fois) (Mertens et al. 1996). Afin de confirmer la sensibilité de KEMV à l'action des protéases et que le core est moins infectieux dans les cellules de mammifère, il serait important de réaliser des essais de traitement à la trypsine pour mettre en évidence l'effet de ce traitement sur la stabilité de la capside et la capacité de ces particules à infecter et à se répliquer dans les cellules de mammifère BSR et cellules de tique IRE/CTVM20. L'exposition des particules virales à un pH acide réduit l'infectiosité des particules virales comme c'est le cas pour d'autres orbivirus, notamment le BTV (Mertens et al. 1996).

L'objectif de cette partie d'étude *in vitro* était d'étudier l'impact de l'alternance d'hôtes sur la génétique de KEMV afin d'évaluer l'hypothèse du « trade-off ». Cette hypothèse a été émise au cours d'études sur la variabilité génétique de différents arbovirus transmis par les insectes, à savoir que « l'alternance d'hôte contraint l'évolution des arbovirus » (Migné, Moutailler, and Attoui 2020). Pour se faire, plusieurs passages en série et en alternance dans les cellules de mammifère et/ou cellules d'arthropode sont effectués pour les études génomiques. Au cours de ces travaux, le virus Kemerovo a été adapté en culture cellulaire en suivant le schéma expérimental suivant : 30 passages dans les cellules de mammifère BSR ou 30 passages dans les cellules de tique IRE/CTVM20 ou 30 passages alternant les cellules BSR et les IRE/CTVM20. Au vu des caractéristiques biologiques de KEMV mises en évidence lors de ce travail de thèse, des mises au point de technique ont été nécessaires pour la production de ces 3x30 passages. La purification de KEMV produit dans les cellules de tique était particulièrement nécessaire afin de libérer les particules virales des cellules IRE/CTVM20 qui demeuraient viables lors de leurs passages sur des cellules BSR à 37°C. La lyse mécanique des cellules de tique a été optimisée en combinant l'utilisation d'une solution hypotonique et d'un homogénéiseur de Dounce. En solution hypotonique, les cellules se retrouvent en état de turgescence, les rendant plus fragile à la lyse par action de l'homogénéiseur. Le solvant organique Vertrel XF a permis ensuite de libérer les particules virales de leur interaction avec les débris cellulaires. La purification de KEMV produit dans les BSR consiste simplement à traiter avec du Vertrel XF, les cellules étant déjà lysées en fin d'infection. Néanmoins, au cours des passages dans les cellules BSR, le virus induisait de moins en moins la lyse cellulaire. Cet aspect a bien été visible lors de l'inspection de la morphologie cellulaire au microscope ainsi que l'accumulation des ARNs observée lors de l'analyse des extraits d'ARN sur gel d'agarose.

La production des 30 passages en série et en alternance a duré 9 mois. Au cours des 30 passages en série dans les BSR, le profil de lyse cellulaire a évolué. Lors des premiers passages, toutes les cellules étaient lysées à la fin des 6 jours d'incubation. Plus les passages avançaient, plus les cellules étaient de

moins en moins lysées. Ces dernières formaient comme des « cheminées » ou « chapelets ». Ce phénotype est uniquement observé quand le virus est propagé dans les cellules de mammifère et de manière plus prononcée lors des passages en série dans les cellules BSR. Ces observations dans les cellules BSR sont comparables à celles faites avec d'autres orbivirus notamment le BTV. L'expression de la VP5 dans des cellules de mammifère aboutit en général à un effet « syncytialisant » qui pourrait expliciter ces formations de « cheminée » ou « chapelet » (Forzan, Wirblich, and Roy 2004). Les cellules de tique sont restées inchangées au cours des passages en série et en alternance, aucune lyse n'a été observée.

Une fois la production des 30 passages terminée, différents aspects de la fitness virale ont été évalués pour ces trois souches adaptées en culture cellulaire. Les souches ont été comparés entre elles pour voir l'impact du cycle d'alternance du type cellulaire en comparaison avec la souche parentale KEMV P3. Dans ces travaux de thèse, nous avons donc étudié le titre infectieux au cours des différents passages ainsi que la fitness ; c'est-à-dire la capacité répliquative dans les différents types cellulaires (cinétique de répliquaison en cellules de mammifère et de tiques), mais également la virulence (pourcentage de survie cellulaire en conditions *in vitro* et suivi de mortalité en souris), et le potentiel tropisme dans un modèle animal (compartimentalisation/tropisme des populations virales dans des organes).

Le titre infectieux de différents passages issus des 3 *scenarii* de culture a été déterminé par la technique de plages de lyse, une fois tous les passages générés. Les résultats obtenus pour les 3 séries reflètent certaines caractéristiques connues chez les virus appartenant à la famille des *Reoviridae*, telles que la perte d'un log du titre infectieux après congélation-décongélation (Joklik 1983). Mais ils apportent également des informations supplémentaires sur la biologie de KEMV. En effet, le titre infectieux de KEMV semble être très influencé par les variations de pH, même les plus minimes. Des études réalisées avec le BTV ont montré que la capsid externe se dissocie de la particule virale lorsque le pH est à 5. La particule virale se désintègre complètement quand le pH atteint 3 (Mertens et al. 1996). Il semblerait que le KEMV soit un peu plus sensible que le BTV vis-à-vis des variations de pH. Malgré, un contrôle régulier des cultures, il nous était impossible de rétablir un pH neutre des cultures dès les premières variations de pH au risque de perturber la répliquaison virale. En effet, parmi les étapes du cycle de répliquaison des orbivirus, l'acidification de l'endosome est nécessaire pour la libération du core dans le cytoplasme de la cellule infectée (H. Attoui et al. 2012). L'alcalinisation de l'endosome provoquerait alors l'arrêt de la répliquaison virale. Il s'agit, ici, de modèles artificiels assez éloignés de la réalité, puisque dans son vecteur arthropode ou hôte vertébré, le virus ne serait pas soumis à toutes ces variations physico-chimiques. Dans le cadre de l'étude de la variabilité génétique, nous ne pensons pas que ces variations de titres infectieux en raison des variations physico-chimiques impacteront de manière

négative l'étude, puisque toutes les populations virales générées auront été impactées de manière équivalente.

Malheureusement, les résultats obtenus au cours des cinétiques de réplication dans les deux types cellulaires BSR et IRE/CTVM20 ne nous permettent pas de conclure de manière sûre. D'autres cinétiques sont nécessaires. Nous pouvons toutefois dire que l'alternance des passages dans les cellules BSR et IRE/CTVM20 a permis au virus d'être capable d'infecter et de se répliquer aisément dans ces 2 types cellulaires. Les deux souches cultivées en série Ps.BSR et Ps.IRE semblent s'être spécialisées dans leur type de cellule respectif. La spécialisation à l'hôte, lors de passages en série, ou la capacité à infecter différents types cellulaires après des alternances, sont des aspects largement observés et décrits pour d'autres arbovirus tels que RVFV (Sara Moutailler et al. 2011), WNV (Ciota, Lovelace, et al. 2007)(Ciota, Ngo, et al. 2007), SLEV (Ciota, Lovelace, et al. 2007), CHIKV (Arias-Goeta et al. 2014),...

L'étude du phénotype de chaque souche adaptée en culture cellulaire dans un modèle animal a été menée dans des souris IFNAR<sup>-/-</sup> de sexes et d'âges différents. Au cours de cette étude, le suivi de mortalité ainsi que le potentiel tropisme et la capacité de réplication ont été des aspects abordés. Les souris IFNAR<sup>-/-</sup> ont été inoculées par voie sous-cutanée (SC) avec une dose de 10<sup>3</sup> PFU, correspondant à la dose minimale infectieuse de KEMV déterminée en souris IFNAR<sup>-/-</sup> inoculées par voie SC. Cette dose est bien supérieure à celle du BTV, en particulier des souches comme le BTV-8 qui tue les IFNAR<sup>-/-</sup> à une dose de 10 PFU/souris (Ortego, De la Poza, and Marín-López 2014a). Il serait important d'identifier un modèle animal qui nécessite des doses plus faibles et qui ne tue pas nécessairement l'animal, notamment pour l'étude de la compétence vectorielle où des essais de transmission d'une tique infectée à un animal sain ou d'un animal infecté à une tique saine sont nécessaires. Parmi les 4 souches inoculées, KEMV P3, Ps.IRE 30, Ps.BSR 30 et P.alt 30, des différences marquées ont été observées en termes de mortalité chez les souris. La souche d'origine, KEMV P3, a été la souche la plus virulente chez les IFNAR<sup>-/-</sup>, puisqu'en moins de 4 jours toutes les souris (9 souris sur 9) sont mortes sans distinction de sexes et/ou d'âges de ces dernières. Avec les souches Ps.IRE 30 et P.alt 30, les premières mortalités ont été observées chez les femelles âgées de plus d'1 an à J3 post-inoculation, suivi des mâles de moins d'1 an et de plus d'1 an à J4 ou J5 post-inoculation. La mortalité a été de 100% chez les souris avec ces deux souches adaptées. Pour les souris infectées avec la souche Ps.BSR 30, seuls les femelles et les jeunes mâles sont décédés à J6 post-inoculation. Les mâles âgés ont été malades en même temps que les autres souris mais ont tous récupéré de l'infection, influant ainsi le taux de mortalité global (66% - 6 souris sur 9). Ces différences de sensibilité des souris IFNAR<sup>-/-</sup> selon le sexe et l'âge n'ont jamais été décrites lors d'infection avec d'autres orbivirus. Les femelles âgées ont été les plus sensibles et ont développé très vite des signes cliniques, tandis que les jeunes mâles sont à l'intermédiaire. Pour d'autres arboviroses, telles que DENV, ZIKV et CHIKV, il a été démontré que les femmes manifestaient des

symptômes plus importants d'un point de vue intensité pour ces 3 arboviroses au Mexique (Ananth et al. 2020). De même, une étude menée avec SLEV (virus de l'encéphalite de de Saint Louis) a montré que selon la souche inoculée de SLEV à des souris d'âges différents, la mortalité était plus importante chez les souris plus âgées (Rivarola et al. 2014). Les résultats observés suggèrent la possibilité que les trois *scenarii* aient sélectionné des sous-populations de KEMV qui présentent une virulence dépendante de l'âge et du sexe des souris IFNAR<sup>-/-</sup>. Le séquençage NGS pourra ainsi mettre en évidence ces différentes sous-populations.

La virulence de KEMV a été atténuée lorsqu'il a été passé en cultures cellulaires. La comparaison des suivis de mortalités montre que les souris inoculées avec les souches adaptées aux cultures de mammifères, tiques ou l'alternance de passage mourraient de plus en plus tard par comparaison aux souris inoculées avec la souche KEMV P3. De plus faibles quantités de virus sont retrouvées dans les organes de souris inoculées par les souches adaptées en culture. La souche d'origine KEMV P3 utilisée dans notre étude est une souche isolée à partir du cerveau d'un patient décédé à la suite d'une encéphalite aigue. Elle a subi un faible nombre de passages depuis son isolement en 1962. Plusieurs études avec le BTV comparent la virulence des souches très peu passées contre des souches qui ont un historique de passages dans des cellules de mammifère ou œufs embryonnés. Tout d'abord, la propagation de BTV après plusieurs passages en série dans des cellules de mammifère ou œufs embryonnés rend le virus beaucoup moins virulent. L'atténuation du BTV par passages en série, dans des œufs embryonnés, a permis le développement des premiers vaccins atténués pour les ovins (Alexander, Haig, and Adelaar 1947)(Neitz 1948). Des études avec les BTV-4 et BTV-9, isolés à partir de sang de mouton, ont montré que les souches ayant un faible historique de passages en culture (1x œuf embryonné, 1x cellules Vero et 3x cellules BHK-21) sont beaucoup plus virulentes en souris IFNAR<sup>+/+</sup> que les souches ayant subi beaucoup de passages dans des cellules de mammifère (entre 35 et 72 passages dans les Vero ou BHK-21) (Caporale et al. 2011). Nous avons observé des effets similaires au cours de cette étude où la souche Ps.BSR 30 ayant été passée 30 fois dans les cellules de mammifère BSR, présente une virulence significativement diminuée au vu de la mortalité tardive (J6 post-inoculation, par comparaison à J3-4 avec KEMV P3), d'autant plus que de plus faibles quantités de génome de KEMV ont été détectées dans divers organes/sang.

Pour faire le lien entre la mortalité et une(des) défaillance(s) d'organes, il en convient d'analyser l'histopathologie de divers organes cibles de la réplication du KEMV (foie, rate, reins, poumons, cœur et cerveau). Au cours des autopsies réalisées, les souris inoculées avec les souches adaptées en culture cellulaire présentaient toutes une splénomégalie ainsi qu'une hépatomégalie. Les rates étaient pour certaines tachetée voire totalement jaune. Les foies étaient, quant à eux, décolorés pour la plupart. L'atteinte du foie et de la rate a également été décrite au cours d'études réalisant des infections en souris IFNAR<sup>+/+</sup> avec d'autres orbivirus tels que les BTV-1, BTV-4, BTV-8 (Ortego, De la Poza, and Marín-

López 2014a), AHSV (African horse sickness virus) et EHDV (Castillo-Olivares et al. 2011) (Philip Scott Mellor and Hamblin 2004). Contrairement à ce qui a été observé lors d'infections avec le BTV, les poumons des souris inoculées avec le KEMV, ne présentaient pas de pétéchies en surface (Ortego, De la Poza, and Marín-López 2014b). À la différence de toutes les souris mortes, chez les mâles âgés inoculés avec le KEMV Ps.BSR 30, le myocarde ne contenait pas de virus en fin d'expérimentation ce qui laisse suggérer que l'atteinte du cœur pourrait être une des raisons de mortalité à l'infection par KEMV. Pour confirmer cela ou trouver la cause principale de la mortalité due à KEMV, il serait important de réaliser des infections sur des groupes d'animaux homogènes (de même âge, de même sexe et d'effectif plus important, afin de tester statistiquement la signification des résultats) et de faire des analyses histopathologiques ainsi que des dosages enzymatiques (quand c'est possible) pour mettre en évidence les lésions dues au virus dans divers organes. Selon la souche, quelques différences ont été mises en évidence. Même si peu de différences statistiquement significatives ont été trouvées, à cause du faible nombre d'échantillons exploitables, la souche alternée semble mieux se répliquer au sein des organes par rapport aux souches adaptées en passage en série dans les BSR et IRE/CTVM20.

Au cours de ces travaux, nous avons pu montrer qu'un seul passage dans les cellules de tique pouvait sélectionner des variants ayant différentes mutations au sein de la quasi-espèce de départ de KEMV (11 mutations dans la séquence génomique : 8 dans le Seg-1 codant la VP1, 2 dans le Seg-3 codant la VP3 et 1 dans le Seg-8 codant la VP7). Sept mutations sur huit retrouvées dans le segment 1 se sont avérées synonymes. La huitième ainsi que celles identifiées dans les segments 3 et 8, ont entraîné des mutations conservatives dans la séquence protéique de la VP1, VP3 et VP7. Plusieurs études menées avec le BTV ont montré que les passages en série dans des cellules de mammifère diminuaient la diversité génétique du BTV, entraînant une diminution de sa virulence. La diversité est augmentée après seulement un passage dans les cellules de *Culicoides* (cellules KC) (Caporale et al. 2014). Une étude menée sur le BTV-3 isolé à partir du sang d'un mouton a montré, qu'après un passage dans des cellules KC, la diversité génétique était plus importante que celle retrouvée dans la souche d'origine. Les auteurs ont suggéré que les différents changements sont probablement impliqués dans l'atténuation du virus et/ou la spécialisation de l'hôte. De ce fait, la pathogénicité du BTV est à mettre en relation avec l'évolution des quasi-espèces (Lean et al. 2019). L'impact des substitutions identifiées est de plus en plus facilement évalué en utilisant la génétique inverse, une technique puissante dans l'étude des virus ARNdb segmentés. L'application de cette technique au BTV permet d'identifier des facteurs de virulence potentiels (Janowicz et al. 2015).

Notre analyse des électrophérotypes du KEMV Ps.BSR, a mis en évidence l'existence d'un segment déficient interférent, apparu après le 15<sup>ème</sup> passage en série. L'apparition des segments déficients interférants a très souvent pour origine une mise en culture du virus à une MOI trop haute. Ici, la MOI utilisée était de 0,05, une MOI habituellement utilisée pour les infections de cellules avec des orbivirus.

La MOI utilisée est en général comprise entre 0,1 et 0,01 (Belhouchet et al. 2011) (Shaw et al. 2013). Le séquençage de ce segment nous permettra d'identifier son origine et mettre en évidence ou non son implication dans la baisse de la virulence de la souche adaptée dans les cellules de mammifère. Il est notable qu'à partir du moment où ce DI est apparu, la lyse cellulaire lors des passages en série a considérablement diminué. Des observations similaires ont été faites avec le virus de la fièvre du Colorado, où l'apparition d'un segment 12 défectif interférant coïncidait avec une diminution de la lyse cellulaire sans impact sur la réplication et les quantités d'ARNdb synthétisées (Houssam Attoui 1998).

Enfin, un séquençage NGS des différents passages produits en culture cellulaire compléterait l'ensemble de cette étude. Le séquençage des KEMV Ps.BSR, Ps.IRE et P.alt à différents passages permettrait de comprendre l'effet de l'alternance entre les cellules de mammifère et cellules de tique sur la génétique de KEMV et d'inférer des liens quant à la différence de virulence et de pathogénicité dans les souris. Nous pourrions également étudier la dynamique de l'évolution de la composition des quasi-espèces de KEMV au cours de ces 30 passages et ainsi de comprendre l'impact du type cellulaire sur la diversité génétique. Pour aller plus loin, un séquençage NGS de KEMV issu de tous les organes de souris infectés, permettrait de mettre en évidence les différentes quasi-espèces virales et d'identifier les variants majoritaires dans les différents organes. La grande plasticité des virus à ARN, comme leur capacité à infecter différents tissus/cellules, de franchir différentes barrières d'espèces tel que l'adaptation à d'autres espèces d'arthropode ou de changer d'hôtes mammifères et enfin de surmonter des contraintes sélectives internes ou externes telles que les réponses immunitaires, leur est facilité par la diversité de la quasi-espèce. La capacité d'un virus à infecter une cellule ne dépend pas seulement de l'interaction virus-récepteur cellulaire, mais aussi des résultats des interactions subcellulaires qui rendent la cellule permissive ou réfractaire à la réplication virale. La spécificité de la cellule hôte est donc multifactorielle (E. Domingo, Sheldon, and Perales 2012). Pour ces travaux de thèse, le séquençage de divers passages cellulaires était prévu dans le but d'élucider les quasi-espèces de KEMV générées pendant ces 30 passages. Cet aspect est important pour évaluer l'hypothèse du « trade-off » pour le virus Kemerovo qui ajouterait aux données connues pour le TBEV et le CCHFV. Ce séquençage NGS permettra également de faire le lien entre la génétique des quasi-espèces générées au cours des passages avec les différences en termes de mortalité chez les souris d'âges et de sexes différents. Pour des raisons de contraintes de temps, en lien notamment avec la pandémie du Covid-19, cet aspect n'a pu être abordé.

# Discussion générale et perspectives

La tique représente un risque majeur pour la santé humaine et animale et a, par conséquent, une importance économique. Elle est le plus grand vecteur d'agents pathogènes en Europe et peut transmettre la plus grande variété de microorganismes (bactéries, parasites et virus). Parmi eux, environ 170 virus transmis par les tiques ont été identifiés à ce jour. Ces virus font partie des arbovirus (arthropod-borne viruses) transmis par des arthropodes vecteurs comme la tique, le moustique, le phlébotome et le moucheron piqueur. Tous ces arthropodes sont hématophages. Les arbovirus et leurs vecteurs sont à considérer comme des complexes qui interagissent fortement entre eux à différents niveaux. L'aptitude d'un arthropode à transmettre un virus se définit par la compétence vectorielle. L'arthropode doit ingérer le virus sur un hôte vertébré infecté et assurer la multiplication de ce dernier pour ensuite le retransmettre au cours d'un autre repas sanguin à un hôte sain. Les arbovirus ont un cycle de vie à deux hôtes, ils se répliquent au sein d'un vecteur arthropode et d'un hôte vertébré. Les arbovirus animaux sont principalement des virus à ARN, à l'exception du virus de la PPA, et présentent des taux de mutations élevés par rapport aux virus à ADN. Ces mutations sont notamment dues à un manque de propriété de relecture de leur ARN polymérase ARN dépendante. Cependant, la variabilité génétique des arbovirus transmis par les insectes a beaucoup été étudiée et l'alternance d'hôtes serait à l'origine de la stabilité génomique de ces virus observée au cours de plusieurs études. Cette hypothèse a ensuite été extrapolée à tous les arbovirus, y compris les virus transmis par les tiques. Or, les tiques et les insectes ont des cycles et des caractéristiques de vie différents et les virus ne sont pas soumis aux mêmes pressions dans un insecte que dans une tique.

Au cours de ce projet de thèse, les interactions du virus Kemerovo avec son vecteur arthropode, la tique, ont été étudiées à plusieurs niveaux, en menant des travaux sur deux axes : *in vivo* et *in vitro*.

Dans un premier temps, la compétence vectorielle des tiques du genre *Ixodes* pour KEMV a été testée *in vivo*. Dans cette partie, plusieurs aspects ont été explorés :

- Mise en place d'un modèle d'infection des tiques avec du virus en comparant deux techniques d'infection des tiques : un système de gorgement artificiel sur peau de gerbille versus une technique d'immersion
- Évaluation des différents critères qui définissent la compétence vectorielle d'une tique pour un agent pathogène (acquisition du virus, transmission trans-stadiale et transmission à un hôte vertébré au cours d'un repas sanguin) lors de l'étude de la compétence vectorielle des espèces *I. ricinus* et *I. persulcatus*.
- Impact de l'espèce de tique et de son origine sur l'aptitude à transmettre le virus Kemerovo

La seconde partie était l'étude, en conditions *in vitro*, des interactions plus fines de KEMV avec son vecteur arthropode et l'influence de l'alternance d'hôte sur sa fitness. Pour cela, le KEMV a été adapté en culture cellulaire selon 3 conditions de culture après 30 passages en série dans des cellules de

mammifère et cellules de tique et en alternance dans ces deux types de cellules. Au cours de ces travaux, plusieurs thématiques ont été abordés :

- Informations sur la biologie de KEMV
- Mise au point de la purification de KEMV produit dans les cellules de tique
- Génération des 3x30 passages en culture cellulaire
- Évaluation de la fitness des souches adaptées dans les cellules et en souris (capacité répliquative dans les différents types cellulaires (cinétique de réplication en cellules de mammifère et de tique), de la virulence (pourcentage de survie cellulaire en conditions *in vitro* et suivi de mortalité en souris), du potentiel tropisme dans un modèle animal (compartmentalisation/tropisme des populations virales dans des organes).
- Mise au point de la purification des ARNdb en vue d'un séquençage NGS des différentes souches adaptées.

Le virus Kemerovo a été isolé en 1962 dans la région de Kemerovo en Russie à partir de tiques *I. persulcatus* (Chumakov 1963). Il a ensuite été détecté ultérieurement dans des tiques *I. ricinus* (S. E. Tkachev et al. 2017). L'étude de la compétence vectorielle de ces espèces de tiques pour KEMV n'avait jamais été étudiée jusqu'à ce jour, c'est pourquoi, nous avons testé la compétence vectorielle de tiques *I. ricinus* provenant de France et de Slovaquie ainsi que d'*I. persulcatus* de Russie. Les deux premiers critères de la compétence sont l'acquisition du virus par les tiques et la transmission trans-stadiale du virus. Pour cela, nous avons comparé deux techniques d'infection : un système de gorgement artificiel déjà mis au point au laboratoire (S Bonnet et al. 2007) et une technique d'immersion (Mitzel et al. 2007), dans le but d'identifier la meilleure méthode pour infecter les tiques avec le KEMV. L'efficacité de ces techniques a été évaluée en utilisant un contrôle positif, le virus de l'encéphalite à tique, pour lequel la compétence vectorielle de tiques *I. ricinus* a déjà été démontrée en utilisant ces deux méthodes d'infection. Seul le système de gorgement artificiel a été validé pour infecter les larves d'*I. ricinus* avec KEMV, résultant à un taux d'infection en larves gorgées supérieur à 80% et une transmission trans-stadiale de 40%. Le taux d'infection des larves obtenu avec la méthode d'infection par immersion était seulement de 26% et la transmission trans-stadiale n'a pu être montrée. L'hypothèse la plus probable de cette différence d'efficacité d'infection avec la méthode d'immersion est à mettre en relation avec la famille et/ou le genre viral. En effet, TBEV et KEMV appartiennent, respectivement, aux genres *Flavivirus* et *Orbivirus* et diffèrent du point de vue de leur biologie, ce qui pourrait influencer sur l'efficacité de la technique d'immersion pour les orbivirus.

Dans un deuxième temps, la compétence vectorielle des tiques *I. ricinus* de Slovaquie et de France a été étudiée en utilisant le système de gorgement artificiel pour infecter les larves. Les différents critères de la compétence ont été évalués par RT-PCR en temps réel juste après le repas sanguin des larves

(acquisition du virus) et juste après la mue (transmission trans-stadiale). La transmission à un hôte vertébré a été testée en plaçant les tiques infectées sur des souris saines. La virémie et la présence du virus au sein des organes et des tiques gorgées ont été évaluées par RT-PCR en temps réel. Les travaux avec les tiques *I. ricinus* ont permis de valider les 2 premiers critères de la compétence vectorielle. La transmission trans-stadiale a semblé être plus efficace pour les tiques de Slovaquie (40%) comparée aux tiques de France (10%). Le dernier critère (transmission à un hôte sain) n'a pu être observé puisque les tiques ne présentaient plus de virus au bout de 4-5 mois après la mue et le virus n'a pas été retrouvé dans les souris. Ces travaux ont été menés avec une souche virale isolée en Russie, or en Slovaquie seuls 2 sérotypes de KEMV, LIPV et TRBV, sont retrouvés et ont été isolés à partir de tiques *I. ricinus* (Libikova, Rehacek, and Somogyiavo 1965). En France, les virus Kemerovo ou Lipovnik ou Tribeč n'ont jamais été détectés. La compétence vectorielle dépend de plusieurs facteurs, notamment de traits génétiques au sein du vecteur arthropode. Une grande diversité génétique a été observée au sein de tiques appartenant à une même espèce et provenant de régions géographiques distinctes (Paulauskas et al. 2016). Cette diversité peut par conséquent affecter l'aptitude d'une espèce de tique à transmettre un agent pathogène. Plusieurs travaux ont montré l'importance de l'origine des tiques lors de l'étude de leur compétence vectorielle pour un agent pathogène donné (Krishnavajhala, Armstrong, and Lopez 2018)(Pereira de Oliveira et al. 2019)(Pereira De Oliveira et al. 2020). Au vu des résultats obtenus et de ce qui est décrit dans la littérature, il semblerait que la compétence vectorielle des tiques *I. ricinus* pour KEMV dépendrait fortement de l'origine de la souche virale mais également de la provenance des tiques. Afin de confirmer cela, des travaux supplémentaires sont nécessaires. Il serait pertinent de tester la compétence vectorielle des tiques de Slovaquie pour TRBV et LIPV mais également celle des tiques *I. ricinus* de Russie pour KEMV, LIPV et TRBV. De plus, la disparition du virus dans les cultures d'IRE/CTVM20 dérivées de tiques *Ixodes ricinus* a également été observée. Le KEMV était toujours détecté dans des cellules IRE/CTVM20 au bout de 3 mois post-infection mais en plus faible quantité par rapport aux premières semaines post-infection. De même, il serait intéressant de réaliser de nouvelles infections à long terme dans ces cellules avec LIPV et TRBV afin d'observer si ces virus infectent ces cellules de manière persistante ou non et plus longtemps ou non que KEMV.

Comme KEMV a d'abord été isolé à partir de tiques *I. persulcatus* en 1962, nous avons également testé la compétence vectorielle de ces tiques. Les résultats obtenus contrastent avec les précédents, puisque les taux d'infection en larves gorgées (acquisition du virus) et en nymphes, après la mue (transmission trans-stadiale), ont été estimés à 100%. Au bout de 4 mois après la mue, le virus a toujours été détecté au sein des nymphes. Malheureusement, nous n'avons pas pu, au cours de nos expériences, montrer le dernier critère de la compétence vectorielle. Les souris IFNAR<sup>-/-</sup> utilisées pour le gorgement des nymphes n'ont pas été infectées. Ces résultats nous ont amenés à nous interroger quant à la viabilité du virus dans les tiques, la dissémination du virus au sein des tiques et au choix de la souris IFNAR<sup>-/-</sup> comme modèle vertébré dans le design de nos expérimentations. Pour tenter de répondre à la première

question, des cellules BSR ont été inoculées avec du broyat de nymphes et laissées incuber pendant 6 jours. Un second passage à l'aveugle a été également réalisé. L'extraction d'ARN à partir des cellules n'a pas permis de montrer une éventuelle réplication du virus au sein de ces cellules. De plus, aucun effet cytopathique n'a été observé. Ces résultats ne nous permettent pas de conclure sur la viabilité de KEMV au sein de tiques *I. persulcatus* infectées artificiellement. D'autre part, la dissémination du virus au sein de la tique est une des étapes cruciales dans la compétence vectorielle. Après ingestion, le virus doit être capable de traverser plusieurs barrières biologiques (intestinale et salivaire) pour ensuite pouvoir être retransmis au cours du repas sanguin suivant. Cette période correspond à la période d'incubation extrinsèque (Pérez-Eid 2007). Pour étudier la diffusion du virus dans l'arthropode, des dissections de tiques infectées, après mue, seraient pertinentes à réaliser dans le but de prélever les différents organes de la tique et de tester la présence du virus par RT-PCR en temps réel. Cette étude permettrait de connaître la localisation du virus après mue et de savoir s'il a disséminé au sein de la tique jusqu'à atteindre les glandes salivaires. Malheureusement, au vu du nombre très restreint de tiques obtenu au cours de cette expérimentation, ces dernières étaient devenues trop précieuses et non sacrificiables pour ce type d'étude annexe à celle de la compétence vectorielle. Enfin la dernière explication serait que les souris IFNAR<sup>-/-</sup> ne seraient pas un bon modèle vertébré dans le cadre de nos expérimentations avec KEMV. Même si nous avons montré que les souris IFNAR<sup>-/-</sup> développaient des symptômes à la suite d'inoculation de virus, une dose minimale infectieuse est nécessaire et a été déterminée à 10<sup>3</sup> PFU en injection sous-cutanée. Il se pourrait donc que les nymphes *I. persulcatus* aient injecté le virus mais en quantité trop faible pour permettre l'infection des souris par KEMV. En effet, les sérotypes de BTV diffèrent en termes de doses minimales infectieuses pour provoquer une infection chez les souris IFNAR<sup>-/-</sup> (Calvo-Pinilla et al. 2009). D'autres modèles vertébrés seraient alors à explorer. Il a été mis en évidence que certains ruminants comme la chèvre et le mouton, avaient fait des séroconversions au virus (H. Attoui and Mohd Jaafar 2015). Cependant, mener de telles études sur des grands mammifères nécessite des moyens et des infrastructures en adéquation avec le niveau de biosécurité requis pour la manipulation d'un virus zoonotique provoquant des encéphalites chez l'humain.

Les études de la compétence vectorielle montrent bien qu'il existe des interactions entre les tiques et le virus Kemerovo. Ces dernières peuvent dépendre du vecteur arthropode mais également du virus. Au cours des études *in vitro*, nous avons cherché à étudier ces interactions et plus particulièrement, l'impact de l'alternance d'hôte entre le vecteur arthropode et l'hôte vertébré sur la fitness de KEMV. Tout d'abord, nous avons pu recueillir des informations sur la biologie de KEMV (peu disponibles jusqu'à ce jour). Les informations obtenues sur KEMV ont permis de mettre au point une méthode de purification du virus produit dans les cellules de tique IRE/CTVM20 afin de réaliser les 3x30 passages en série dans les cellules de mammifère et cellules de tique et en alternance dans ces deux types cellulaires. La finalité de ces passages était double. Dans un premier temps, la fitness de ces souches

adaptées a été évaluée dans les cellules BSR et IRE/CTVM20 (résultats préliminaires) et ensuite en souris IFNAR<sup>-/-</sup> pour observer l'effet de l'alternance d'hôte sur la fitness de KEMV. Les résultats préliminaires de l'étude de la capacité de réplication dans les cellules, semblent indiquer que les souches adaptées dans les cellules de tiques et en alternance montraient des caractéristiques similaires en termes de vitesse de réplication bien que la souche alternée semblait plus adaptée dans les cellules de mammifère. La souche Ps.IRE 30 présentait une certaine plasticité lorsqu'elle est dans les cellules de mammifère, ce qui n'était pas le cas pour la souche Ps.BSR 30 qui montrait un retard de réplication dans les cellules de tiques IRE/CTVM20. Ces résultats suggèrent que le passage dans les cellules d'arthropode permet au virus de maintenir sa grande capacité/plasticité/diversité, lui permettant de se répliquer plus facilement, contrairement aux passages dans les cellules de mammifère où toute cette plasticité semble très réduite. Tous ces résultats restent à confirmer, pour cela, il est nécessaire de refaire des cinétiques dans ces deux types cellulaires avec des quantités de virus comparables entre chaque souche au moment de l'infection. Concernant les suivis de mortalité des souris IFNAR<sup>-/-</sup>, inoculées avec les souches P.alt 30 et Ps.IRE 30, ils sont comparables, puisque les premiers signes cliniques et de mortalité sont apparus pour les 2 souches en même temps, soit à J3 post-inoculation. Les 2 souches ont montré une virulence comparable, contrairement à la souche Ps.BSR 30. Les résultats obtenus dans les souris ne nous permettent pas de d'identifier clairement un tropisme dans le modèle animal utilisé. Tous les organes ont été infectés par les différentes souches (KEMV P3, Ps.IRE 30, Ps.BSR 30 et P.alt 30) et s'y sont répliqués. Des tendances sont quand même notables. Les quantités de virus issues du P.alt 30 et Ps.IRE 30 semblaient plus importantes que celles issues du Ps.BSR 30 dans les différents organes, ce qui laisse suggérer que les souches alternée et adaptée dans les cellules de tique se sont répliquées plus intensément. Afin de confirmer l'hypothèse que le passage dans les cellules de tique maintiendrait la virulence et permettrait d'accroître la diversité génétique de KEMV, il est nécessaire de refaire ces expérimentations avec des groupes d'animaux plus conséquent (au moins 6 souris par groupe) et homogène (de même âge et de même sexe). A l'inverse, le passage dans les cellules de mammifère semble atténuer le KEMV. L'alternance de types cellulaires jouerait un rôle dans le maintien de la capacité à infecter différents types cellulaires. Le passage dans les cellules de tique augmenterait la diversité du virus tandis que le passage en BSR réduirait cette diversité en sélectionnant des variants capables d'infecter les types cellulaires. Des observations similaires ont notamment été décrites pour le BTV (Caporale et al. 2014). Lors de ces études menées dans les souris IFNAR<sup>-/-</sup>, nous avons pu mettre en évidence la différence de sensibilité des souris selon la souche virale, le sexe et l'âge. Il semblerait que certaines sous-populations (quasi-espèces) aient été sélectionnées au cours des passages et leur virulence dépendrait du sexe et de l'âge des souris.

Afin de confirmer cela, un séquençage NGS des trois souches adaptées en culture cellulaire est nécessaire et permettrait d'observer et de comparer les différentes quasi-espèces générées au cours des 30 passages. Pour ces travaux de thèse, il était prévu de faire un séquençage NGS avec la technologie

Illumina des passages 10, 20 et 30 des différentes séries. Pour cela, un stage de 3 mois était programmé aux côtés du Professeur Peter Mertens (Université de Nottingham) et du Dr Kyriaki Nomikou (Université de Glasgow) pour apprendre la technique de séquençage des virus à ARNdb. Cependant, ce stage a été annulé en raison de la pandémie du Covid-19. En collaboration avec le Prof. Mertens et Dr Nomikou, nous avons essayé de mettre au point leur protocole dans nos laboratoires. L'une des premières étapes du protocole était de purifier les ARNdb des ARNsb, car nous cherchons, dans ses travaux, à étudier l'information génétique qui est transmise à la descendance. De ce fait, les ARNsb cellulaires et ceux issus de la répllication virale sont à éliminer. Deux techniques, enzymatique par un traitement à la RNase A et physique, ont été testées et seule la méthode physique a été validée.

En perspectives de ces travaux de thèse, il sera nécessaire de réaliser le séquençage NGS des trois souches adaptées en culture pour confirmer ou infirmer 1/ les hypothèses avancées avec les résultats obtenus au cours de l'étude de fitness comme le lien entre les quasi-espèces générées et le pouvoir pathogène observé chez la souris selon le sexe et l'âge et 2/ l'hypothèse de la contrainte d'évolution des arbovirus grâce à l'alternance d'hôte. Des travaux combinant le séquençage des virus issus des différents organes ainsi que de la génétique inverse permettrait d'identifier au sein du génome de KEMV les déterminants génétiques de la virulence. Des travaux sur le BTV ont permis de déterminer l'implication plus forte de certaines protéines dans la virulence du virus en souris *IFNAR<sup>-/-</sup>*, en comparant les séquences d'une souche atténuée (présentant un nombre de passages dans des cellules de mammifère assez conséquent) avec une souche non atténuée. Dans cette étude, les séquences des segments 1, 2 et 8, codant respectivement la VP1, VP2 et NS2, présentaient des mutations non synonymes dans la souche atténuée (Caporale et al. 2011). Il serait alors intéressant de faire des expérimentations similaires étant donné qu'une souche atténuée de KEMV est maintenant disponible (Ps.BSR 30) et ainsi confronter les résultats avec les données disponibles pour le BTV. D'autres études menées avec différentes souches du BTV et l'AHSV ont montré que les différences de virulence pouvaient être attribuées à la variabilité génétique des séquences des segments codant les VP2, VP5, VP7 et NS3/NS3A (Coetzee et al. 2012). Nous avons pu remarquer au cours de ces travaux de thèse que KEMV, un orbivirus transmis par les tiques, différait des orbivirus transmis par les insectes, d'un point de vue biologique et physico-chimique. Connaître les facteurs de virulence de KEMV ainsi que sa dynamique à générer des quasi-espèces, apporterait des informations complémentaires pour le genre *Orbivirus*.

A plus long terme, il serait intéressant d'infecter des tiques *I. ricinus* et/ou *I. persulcatus* avec ces trois souches adaptées et ainsi observer et comparer l'effet de l'alternance versus l'adaptation à un type cellulaire sur l'acquisition du virus par les tiques, la transmission trans-stadiale et, lorsque le modèle vertébré adéquat sera mis en place, la capacité à transmettre le virus au cours d'un repas sanguin. Certaines protéines citées plus haut jouent un rôle dans l'infection et la dissémination du virus au sein de l'arthropode, telles que la VP7 et la NS3/A. Il a été suggéré, pour le BTV, que la variabilité génétique

au sein de ces protéines pouvait être liée à la transmission du virus par différentes populations de moucheron piqueurs du genre *Culicoides* dans différentes zones géographiques (Bonneau et al. 2002)(S. Maan et al. 2008)(S. Maan et al. 2010)(W. C. Wilson et al. 2000). Enfin, lorsque les modèles *in vivo* seront bien établis (validation de la compétence vectorielle des tiques *I. ricinus* et/ou *I. persulcatus* pour le virus Kemerovo), effectuer des passages en série dans des tiques et souris, ainsi que des passages en alternance et comparer la génétique de KEMV issu de ces différents passages *in vivo* par rapport aux quasi-espèces obtenues *in vitro* seraient pertinents. Pour certains arbovirus transmis par des moustiques tels que le WNV, CHIKV et le virus de l'encéphalite équine du Venezuela (VEEV), le passage dans leur vecteur arthropode réduirait considérablement leur diversité génétique. En effet, le passage de la barrière intestinale et des glandes salivaires agirait comme des goulots d'étranglement (Forrester, Coffey, and Weaver 2014). Enfin, les études approfondies de la variabilité génétique des arbovirus permettront d'identifier les facteurs de virulence, les protéines nécessaires aux différents mécanismes viraux. A plus long terme, cela permettra d'apporter des informations sur les stratégies thérapeutiques et/ou de prophylaxie à mettre en place.

# Références

- Alexander, R. A., D. A. Haig, and T. F. Adelaar. 1947. "The Attenuation of Bluetongue Virus by Serial Passage through Fertile Eggs." *Onderstepoort Journal of Veterinary Science and Animal Industry* 21 (2): 231–41.
- Alzaharani, Abdullah G., Hassan M. Al Shaiban, Mohammad A. Al Mazroa, Osama Al-Hayani, Adam MacNeil, Pierre E. Rollin, and Ziad A. Memish. 2010. "Alkhurma Hemorrhagic Fever in Humans, Najran, Saudi Arabia." *Emerging Infectious Diseases* 16 (12): 1882–88. <https://doi.org/10.3201/eid1612.100417>.
- Ananth, Sushmitha, Nistha Shrestha, Jesús A. Treviño C., Uyen Sa Nguyen, Ubydul Haque, Aracely Angulo-Molina, Uriel A. Lopez-Lemus, et al. 2020. "Clinical Symptoms of Arboviruses in Mexico." *Pathogens* 9 (11): 1–16. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110964>.
- Arias-Goeta, Camilo, Sara Moutailler, Laurence Mousson, Karima Zouache, Jean Michel Thiberge, Valérie Caro, François Rougeon, and Anna Bella Failloux. 2014. "Chikungunya Virus Adaptation to a Mosquito Vector Correlates with Only Few Point Mutations in the Viral Envelope Glycoprotein." *Infection, Genetics and Evolution* 24: 116–26. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.03.015>.
- Attoui, H., PPC Mertens, J Becnel, M Belaganahalli, M Bergoin, CP Brussaard, JD Chappell, et al. 2012. "The Double Stranded RNA Viruses." In *Virus Taxonomy Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, edited by Andrew M.Q. King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, and Elliot J. Lefkowitz, 497–637. London: Elsevier/Academic Press.
- Attoui, H., and F. Mohd Jaafar. 2015. "Zoonotic and Emerging Orbivirus Infections." *Rev. Sci .Tech. Off. Int. Epiz.* 34 (2): 353–61. <https://doi.org/10.20506/rst.34.2.2362>.
- Attoui, Houssam. 1998. "Etude Biologique et Moleculaire Du Genre Coltivirus." Université de la Méditerranée.
- Attoui, Houssam, Frédérique Billoir, Jean François Cantaloube, Philippe Biagini, Philippe De Micco, and Xavier De Lamballerie. 2000. "Strategies for the Sequence Determination of Viral DsRNA Genomes." *Journal of Virological Methods* 89 (1–2): 147–58. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00212-3](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00212-3).
- Attoui, Houssam, Fauziah Mohd Jaafar, Mourad Belhouchet, Nicolas Aldrovandi, Sanju Tao, Boquan Chen, Guodong Liang, Robert B. Tesh, Philippe de Micco, and Xavier de Lamballerie. 2005. "Yunnan Orbivirus, a New Orbivirus Species Isolated from Culex Tritaeniorhynchus Mosquitoes in China." *Journal of General Virology* 86 (12): 3409–17. <https://doi.org/10.1099/vir.0.81258-0>.
- Attoui, Houssam, Fauziah Mohd Jaafar, Rennos Fragkoudis, and Peter P.C. Mertens. 2021. "Vector Transmission of Animal Viruses." In *Encyclopedia of Virology*, 4th Editio. Academic Press/Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-012-814515-9.00135-1>.
- Attoui, Houssam, Fauziah Mohd Jaafar, Philippe De Micco, and Xavier De Lamballerie. 2005. "Coltiviruses and Seadornaviruses in North America, Europe, and Asia." *Emerging Infectious Diseases* 11 (11): 1673–79. <https://doi.org/10.3201/eid1111.050868>.
- Attoui, Houssam, Baptiste Monsion, Bernard Klonjkowski, Stéphan Zientara, Peter P C Mertens, and Fauziah Mohd Jaafar. 2021. "Identification of the Genome Segments of Bluetongue Virus Type 26 / Type 1 Reassortants Influencing Horizontal Transmission in a Mouse Model" 2.
- Barker, Stephen C., and Alan R. Walker. 2014. *Ticks of Australia. The Species That Infest Domestic Animals and Humans. Zootaxa*. Vol. 3816. <https://doi.org/10.11646/zootaxa.3816.1.1>.
- Belaganahalli, Manjunatha N., Sushila Maan, Narender S. Maan, Joe Brownlie, Robert Tesh, Houssam Attoui, and Peter P.C. Mertens. 2015. "Genetic Characterization of the Tick-Borne Orbiviruses." *Viruses* 7 (5): 2185–2209. <https://doi.org/10.3390/v7052185>.
- Belhouchet, Mourad, Fauziah Mohd Jaafar, Andrew E. Firth, Jonathan M. Grimes, Peter P.C. Mertens, and Houssam Attoui. 2011. "Detection of a Fourth Orbivirus Non-Structural Protein." *PLoS ONE* 6 (10). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0025697>.
- Belhouchet, Mourad, Fauziah Mohd Jaafar, Robert Tesh, Jonathan Grimes, Sushila Maan, Peter P.C. Mertens, and Houssam Attoui. 2010. "Complete Sequence of Great Island Virus and Comparison with the T2 and Outer-Capsid Proteins of Kemerovo, Lipovnik and Tribec Viruses (Genus Orbivirus, Family Reoviridae)." *Journal of General Virology* 91 (12): 2985–93. <https://doi.org/10.1099/vir.0.024760-0>.
- Bell-Sakyi, Lesley, Erich Zwegarth, Edmour F. Blouin, Ernest A. Gould, and Frans Jongejan. 2007. "Tick Cell Lines: Tools for Tick and Tick-Borne Disease Research." *Trends in Parasitology* 23

- (9): 450–57. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.07.009>.
- Belova, Oxana A., Alexander G. Litov, Ivan S. Kholodilov, Liubov I. Kozlovskaya, Lesley Bell-Sakyi, Lidiya Iu Romanova, and Galina G. Karganova. 2017. “Properties of the Tick-Borne Encephalitis Virus Population during Persistent Infection of Ixodid Ticks and Tick Cell Lines.” *Ticks and Tick-Borne Diseases* 8 (6): 895–906. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2017.07.008>.
- Bhatt, Samir, W. Peter Gething, Oliver J. Brady, Jane P. Messina, Andrew W. Farlow, Catherine L. Moyes, John M. Drake, et al. 2013. “The Global Distribution and Burden of Dengue.” *Nature* 496 (7446): 504–7. <https://doi.org/10.1038/nature12060>.The.
- Binnington, K.C., and D.H. Kemp. 1980. “Role of Tick Salivary Glands in Feeding and Disease Transmission.” *Advances in Parasitology* 18: 315–39. [https://doi.org/10.1016/s0065-308x\(08\)60403-0](https://doi.org/10.1016/s0065-308x(08)60403-0).
- Bonneau, Kyle R., J. B. Topol, Alec C. Gerry, Bradley A. Mullens, Robert K. Velten, and N. James MacLachlan. 2002. “Variation in the NS3/NS3A Gene of Bluetongue Viruses Contained in *Culicoides* *Sonorensis* Collected from a Single Site in Southern California.” *Virus Research* 84 (1–2): 59–65. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(01\)00415-4](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(01)00415-4).
- Bonnet, S., J.-C. George, and N. Boulanger. 2015. “L’interface Tique-Hôte et La Transmission Des Pathogènes.” In *Tiques et Maladies à Tiques*, edited by IRD, 165–91. Marseille.
- Bonnet, S., K. Huber, G. Joncour, M. René-Martellet, F. Stachurski, and L. Zenner. 2015. “Biologie Des Tiques.” In *Tiques et Maladies à Tiques*, edited by Karen D McCoy and Nathalie Boulanger, IRD, 53–84. Marseille.
- Bonnet, S, M. Jouglin, L. Malandrin, C. Becker, A. Agoulon, M. L’Hostis, and A. Chauvin. 2007. “Transstadial and Transovarial Persistence of Babesia Divergens DNA in Ixodes Ricinus Ticks Fed on Infected Blood in a New Skin-Feeding Technique.” *Parasitology* 134 (2): 197–207. <https://doi.org/10.1017/S0031182006001545>.
- Bonnet, Sarah, Nadine Brisseau, Axelle Hermouet, Maggy Jouglin, and Alain Chauvin. 2009. “Experimental in Vitro Transmission of Babesia Sp. (EU1) by Ixodes Ricinus.” *Veterinary Research* 40 (3): 1–8. <https://doi.org/10.1051/vetres/2009004>.
- Boulanger, N., and K. D. McCoy. 2015. “Introduction, Les Tiques, Les Animaux et l’homme.” In *Tiques et Maladies à Tiques*, edited by IRD, 13–30. Marseille.
- Braut, Aaron C., Harry M. Savage, Nisha K. Duggal, Rebecca J. Eisen, and J. Erin Staples. 2018. “Heartland Virus Epidemiology, Vector Association, and Disease Potential.” *Viruses* 10 (9): 1–17. <https://doi.org/10.3390/v10090498>.
- Buckley, Alan, Alistair Dawson, Stephen R. Moss, Shelley A. Hinsley, Paul E. Bellamy, and Ernest A. Gould. 2003. “Serological Evidence of West Nile Virus, Usutu Virus and Sindbis Virus Infection of Birds in the UK.” *Journal of General Virology* 84 (10): 2807–17. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19341-0>.
- Cabezas-Cruz, Alejandro, Adnan Hodžić, Patricia Román-Carrasco, Lourdes Mateos-Hernández, Georg Gerhard Duscher, Deepak Kumar Sinha, Wolfgang Hemmer, Ines Swoboda, Agustín Estrada-Peña, and José De La Fuente. 2019. “Environmental and Molecular Drivers of the  $\alpha$ -Gal Syndrome.” *Frontiers in Immunology* 10 (MAY): 1–12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01210>.
- Calvo-Pinilla, Eva, Francisco de la Poza, Simon Gubbins, Peter Paul Clement Mertens, Javier Ortego, and Javier Castillo-Olivares. 2014. “Vaccination of Mice with a Modified Vaccinia Ankara (MVA) Virus Expressing the African Horse Sickness Virus (AHSV) Capsid Protein VP2 Induces Virus Neutralising Antibodies That Confer Protection against AHSV upon Passive Immunisation.” *Virus Research* 180: 23–30. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.12.002>.
- Calvo-Pinilla, Eva, Teresa Rodríguez-Calvo, Juan Anguita, Noemí Sevilla, and Javier Ortego. 2009. “Establishment of a Bluetongue Virus Infection Model in Mice That Are Deficient in the Alpha/Beta Interferon Receptor.” *PLoS ONE* 4 (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0005171>.
- Campbell-Lendrum, Diarmid, Lucien Manga, Magaran Bagayoko, and Johannes Sommerfeld. 2015. “Climate Change and Vector-Borne Diseases: What Are the Implications for Public Health Research and Policy?” *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 370 (1665): 1–8. <https://doi.org/10.1098/rstb.2013.0552>.
- Caporale, M., L. Di Gialleonardo, A. Janowicz, G. Wilkie, A. Shaw, G. Savini, P. A. Van Rijn, P. Mertens, M. Di Ventura, and M. Palmarini. 2014. “Virus and Host Factors Affecting the Clinical

- Outcome of Bluetongue Virus Infection.” *Journal of Virology* 88 (18): 10399–411. <https://doi.org/10.1128/jvi.01641-14>.
- Caporale, M., R. Wash, A. Pini, G. Savini, P. Franchi, M. Golder, J. Patterson-Kane, et al. 2011. “Determinants of Bluetongue Virus Virulence in Murine Models of Disease.” *Journal of Virology* 85 (21): 11479–89. <https://doi.org/10.1128/jvi.05226-11>.
- Caron, Mélanie, Christophe Paupy, Gilda Grard, Pierre Becquart, Illich Mombo, Branly Bikie Bi Nso, Fabrice Kassa Kassa, Dieudonné Nkoghe, and Eric Maurice Leroy. 2012. “Recent Introduction and Rapid Dissemination of Chikungunya Virus and Dengue Virus Serotype 2 Associated with Human and Mosquito Coinfections in Gabon, Central Africa.” *Clinical Infectious Diseases* 55 (6): 45–53. <https://doi.org/10.1093/cid/cis530>.
- Castillo-Olivares, Javier, Eva Calvo-Pinilla, Isabel Casanova, Katarzyna Bachanek-Bankowska, Rachael Chiam, Sushila Maan, Jose Maria Nieto, Javier Ortego, and Peter Paul Clement Mertens. 2011. “A Modified Vaccinia Ankara Virus (MVA) Vaccine Expressing African Horse Sickness Virus (AHSV) VP2 Protects against AHSV Challenge in an IFNAR 2/2 Mouse Model.” *PLoS ONE* 6 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0016503>.
- CDC. 2019. “Tickborne Diseases Abroad.” 2019. <https://www.cdc.gov/ticks/diseases/abroad.html>.
- Chen, B, and S Tao. 1996. “Arbovirus Survey in China in Recent Ten Years.” *Chinese Medical Journal* 109 (1): 13–15.
- Chumakov, MP. 1963. “Report on the Isolation from Ixodes Persulcatus Ticks and from Patients in Western Siberia of a Virus Differing from the Agent of Tick-Borne Encephalitis.” *Acta Virologica* 7: 82–83.
- Ciota, Alexander T., Amy O. Lovelace, Kiet A. Ngo, An N. Le, Joseph G. Maffei, Mary A. Franke, Anne F. Payne, Susan A. Jones, Elizabeth B. Kauffman, and Laura D. Kramer. 2007. “Cell-Specific Adaptation of Two Flaviviruses Following Serial Passage in Mosquito Cell Culture.” *Virology* 357 (2): 165–74. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2006.08.005>.
- Ciota, Alexander T., Kiet A. Ngo, Amy O. Lovelace, Anne F. Payne, Yangsheng Zhou, Pei-yong Shi, and Laura D. Kramer. 2007. “Role of the Mutant Spectrum in Adaptation and Replication of West Nile Virus.” *Journal of General Virology* 88 (Pt 3): 865–74. <https://doi.org/10.1099/vir.0.82606-0>.
- Coetzee, Peter, Moritz Van Vuuren, Maria Stokstad, Mette Myrmel, and Estelle H. Venter. 2012. “Bluetongue Virus Genetic and Phenotypic Diversity: Towards Identifying the Molecular Determinants That Influence Virulence and Transmission Potential.” *Veterinary Microbiology* 161 (1–2): 1–12. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2012.07.007>.
- Coffey, L. L., and M. Vignuzzi. 2011. “Host Alternation of Chikungunya Virus Increases Fitness While Restricting Population Diversity and Adaptability to Novel Selective Pressures.” *Journal of Virology* 85 (2): 1025–35. <https://doi.org/10.1128/jvi.01918-10>.
- Cotté, Violaine, Sarah Bonnet, Danielle Le Rhun, Evelyne Le Naour, Alain Chauvin, Henri Jean Boulouis, Benoit Lecuelle, Thomas Lilin, and Muriel Vayssier-Taussat. 2008. “Transmission of Bartonella Henselae by Ixodes Ricinus.” *Emerging Infectious Diseases* 14 (7): 1074–80. <https://doi.org/10.3201/eid1407.071110>.
- Cwynar, Przemyslaw, Jane Stojkov, and Klaudia Wlazlak. 2019. “African Swine Fever Status in Europe.” *Viruses* 11 (4): 1–17. <https://doi.org/10.3390/v11040310>.
- Davies, C. R., L. D. Jones, B. M. Green, and P. A. Nuttall. 1987. “In Vivo Reassortment of Thogoto Virus (a Tick-Borne Influenza-like Virus) Following Oral Infection of Rhipicephalus Appendiculatus Ticks.” *The Journal of General Virology* 68 ( Pt 9): 2331–38.
- Dedkov, V. G., M. L. Markelov, K. A. Gridneva, M. V. Bekova, A. P. Gmyl, L. I. Kozlovskaya, G. G. Karganova, et al. 2014. “Prevalence of Kemerovo Virus in Ixodid Ticks from the Russian Federation.” *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5 (6): 651–55. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.017>.
- Dermody, Terence S, John S. L. Parker, and Barbara Sherry. 2013. “Reoviridae.” In *Fields Virology - Volume 2*, edited by D. Knipe and P. Howley, 6th ed., 1304–46. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins.
- Dilcher, Meik, Lekbira Hasib, Marcus Lechner, Nicolas Wieseke, Martin Middendorf, Manja Marz, Andrea Koch, et al. 2012. “Genetic Characterization of Tribeč Virus and Kemerovo Virus, Two Tick-Transmitted Human-Pathogenic Orbiviruses.” *Virology* 423 (1): 68–76.

- <https://doi.org/10.1016/j.virol.2011.11.020>.
- Dinkins, Michael B., David E. Stallknecht, and Benjamin G. Brackett. 2001. "Reduction of Infectious Epizootic Hemorrhagic Disease Virus Associated with in Vitro Produced Bovine Embryos by Non-Specific Protease." *Animal Reproduction Science* 65 (3–4): 205–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-4320\(01\)00075-6](https://doi.org/10.1016/S0378-4320(01)00075-6).
- Domingo, E., J. Sheldon, and C. Perales. 2012. "Viral Quasispecies Evolution." *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76 (2): 159–216. <https://doi.org/10.1128/MMBR.05023-11>.
- Domingo, Esteban, and Celia Perales. 2018. "Quasispecies and Virus." *European Biophysics Journal* 47 (4): 443–57. <https://doi.org/10.1007/s00249-018-1282-6>.
- Drake, J. W. 2006. "Rates of Spontaneous Mutation among RNA Viruses." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90 (9): 4171–75. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.9.4171>.
- Durand, Benoit, Sylvie Lecollinet, Cécile Beck, Beatriz Martínez-López, Thomas Balenghien, and Véronique Chevalier. 2013. "Identification of Hotspots in the European Union for the Introduction of Four Zoonotic Arboviruses by Live Animal Trade." *PLoS ONE* 8 (7): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0070000>.
- ECDC. 2021a. "Ixodes Persulcatus - Current Known Distribution: March 2021." Tick Maps. 2021. <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps>.
- . 2021b. "Ixodes Ricinus - Current Known Distribution: March 2021." Tick Maps. 2021. <https://ecdc.europa.eu/en/disease-vectors/surveillance-and-disease-data/tick-maps>.
- Erasmus, B. J. 1975. "Bluetongue in Sheep and Goats." *Australian Veterinary Journal* 51 (4): 165–70. <https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1975.tb00048.x>.
- Florio, Lloyd, Mabel O Stewart, and Edward R Mugrage. 1946. "The Etiology of Colorado Tick Fever." *Annals of Internal Medicine* 25: 466–72. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20997003>.
- Forrester, Naomi L., Lark L. Coffey, and Scott C. Weaver. 2014. "Arboviral Bottlenecks and Challenges to Maintaining Diversity and Fitness during Mosquito Transmission." *Viruses* 6 (10): 3991–4004. <https://doi.org/10.3390/v6103991>.
- Forzan, Mario, Christoph Wirblich, and Polly Roy. 2004. "A Capsid Protein of Nonenveloped Bluetongue Virus Exhibits Membrane Fusion Activity." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (7): 2100–2105. <https://doi.org/10.1073/pnas.0306448101>.
- Franchi, P., M. T. Mercante, G. F. Ronchi, G. Armillotta, S. Ulisse, U. Molini, M. Di Ventura, R. Lelli, G. Savini, and A. Pini. 2008. "Laboratory Tests for Evaluating the Level of Attenuation of Bluetongue Virus." *Journal of Virological Methods* 153 (2): 263–65. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2008.07.007>.
- Ftaich, Najate, Claire Ciancia, Cyril Viarouge, Gerald Barry, Maxime Ratinier, Piet A. van Rijn, Emmanuel Breard, et al. 2015. "Turnover Rate of NS3 Proteins Modulates Bluetongue Virus Replication Kinetics in a Host-Specific Manner." *Journal of Virology* 89 (20): 10467–81. <https://doi.org/10.1128/jvi.01541-15>.
- Fu, H. 1995. "Mechanisms Controlling the Infection of Culicoides Biting Midges with Bluetongue Virus." University of Hertfordshire.
- Galindo, Inmaculada, and Covadonga Alonso. 2017. "African Swine Fever Virus: A Review." *Viruses* 9 (5). <https://doi.org/10.3390/v9050103>.
- Ganter, Sarah, Guylaine Miotello, Lucía Manso-Silván, Jean Armengaud, Florence Tardy, Patrice Gaurivaud, and François Thiaucourt. 2019. "Proteases as Secreted Exoproteins in Mycoplasmas from Ruminant Lungs and Their Impact on Surface-Exposed Proteins." *Applied and Environmental Microbiology* 85 (23). <https://doi.org/10.1128/AEM.01439-19>.
- Garcia, M, N. Lévêque, I. Leparç-Goffart, and Xavier De Lamballerie. 2016. "Référentiel de Virologie: Arbovirus." *Société Française de Microbiologie*, 15. [https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/VIRUS\\_ARBOVIRUS.pdf](https://www.sfm-microbiologie.org/wp-content/uploads/2019/02/VIRUS_ARBOVIRUS.pdf).
- Gilbert, Lucy, Jennifer Aungier, and Joseph L. Tomkins. 2014. "Climate of Origin Affects Tick (Ixodes Ricinus) Host-Seeking Behavior in Response to Temperature: Implications for Resilience to Climate Change?" *Ecology and Evolution* 4 (7): 1186–98. <https://doi.org/10.1002/ece3.1014>.
- Gondard, Mathilde, Lorraine Michelet, Athinna Nisavanh, Elodie Devillers, Sabine Delannoy, Patrick Fach, Anna Aspan, et al. 2018. "Prevalence of Tick-Borne Viruses in Ixodes Ricinus Assessed by High-Throughput Real-Time PCR." *Pathogens and Disease* 76 (8): 1–13.

- <https://doi.org/10.1093/femspd/fty083>.
- Gould, E.A., John Pettersson, Stephen Higgs, Remi Charrel, and Xavier de Lamballerie. 2017. “Emerging Arboviruses: Why Today?” *One Health* 4 (April): 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.onehlt.2017.06.001>.
- Gresíková, M., J. Rajcáni, and J. Hruzík. 1966. “Pathogenicity of Tribec Virus for Macaca Rhesus Monkeys and White Mice.” *Acta Virol.* 10: 420–424.
- Hawman, David W., and Heinz Feldmann. 2018. “Recent Advances in Understanding Crimean–Congo Hemorrhagic Fever Virus.” *F1000Research* 7 (0): 1715. <https://doi.org/10.12688/f1000research.16189.1>.
- Hermance, Meghan E., and Saravanan Thangamani. 2017. “Powassan Virus: An Emerging Arbovirus of Public Health Concern in North America.” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 17 (7): 453–62. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2110>.
- Hubálek, Zdenek, and Ivo Rudolf. 2012. “Tick-Borne Viruses in Europe.” *Parasitology Research* 111 (1): 9–36. <https://doi.org/10.1007/s00436-012-2910-1>.
- Hurlbut, HS, and JI Thomas. 1960. “The Experimental Host Range of the Arthropod-Borne Animal Viruses in Arthropods.” *Virology* 12: 391–407. [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(60\)90162-8](https://doi.org/10.1016/0042-6822(60)90162-8).
- ICTV. 2020. “International Committee on Taxonomy of Viruses.” 2020. <https://talk.ictvonline.org/>.
- Janowicz, Anna, Marco Caporale, Andrew Shaw, Salvatore Gulletta, Luigina Di Gialleonardo, Maxime Ratinier, and Massimo Palmarini. 2015. “Multiple Genome Segments Determine Virulence of Bluetongue Virus Serotype 8.” *Journal of Virology* 89 (10): 5238–49. <https://doi.org/10.1128/jvi.00395-15>.
- Joklik, Wolfgang K. 1983. *The Reoviridae*. Edited by Kluwer Academic. 1983 ed. New York: Plenum.
- Jongejan, F., and G. Uilenberg. 2004. “The Global Importance of Ticks.” *Parasitology* 129 (June): 3–14. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>.
- Kaiser, R. 2016. “Frühsommermeningoenzephalitis.” *Nervenarzt* 87 (6): 667–80. <https://doi.org/10.1007/s00115-016-0134-9>.
- Kamal, Mahmoud, Mohamed A. Kenawy, Magda Hassan Rady, Amany Soliman Khaled, and Abdallah M. Samy. 2018. “Mapping the Global Potential Distributions of Two Arboviral Vectors Aedes Aegypti and Ae. Albopictus under Changing Climate.” *PLoS ONE* 13 (12): 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210122>.
- Karabatsos, N. 1985. *International Catalogue of Arboviruses, Including Certain Other Viruses of Vertebrates*. 3rd ed. San Antonio, Texas: American Society of Tropical Medicine and Hygiene for The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses.
- Kerviel, Adeline, Peng Ge, Mason Lai, Jonathan Jih, Mark Boyce, Xing Zhang, Z. Hong Zhou, and Polly Roy. 2019. “Atomic Structure of the Translation Regulatory Protein NS1 of Bluetongue Virus.” *Nature Microbiology* 4 (5): 837–845. <https://doi.org/10.1038/s41564-019-0369-x>.
- Kopanke, Jennifer H., Justin S. Lee, Mark D. Stenglein, and Christie E. Mayo. 2020. “The Genetic Diversification of a Single Bluetongue Virus Strain Using an in Vitro Model of Alternating-Host Transmission.” *Viruses* 12 (9). <https://doi.org/10.3390/v12091038>.
- Krishnavajhala, Aparna, Brittany A. Armstrong, and Job E. Lopez. 2018. “Vector Competence of Geographical Populations of Ornithodoros Turicata for the Tick-Borne Relapsing Fever Spirochete Borrelia Turicatae.” *Applied and Environmental Microbiology* 84 (21): 1–9. <https://doi.org/10.1128/AEM.01505-18>.
- Krow-Lucal, Elisabeth R., Nicole P. Lindsey, Marc Fischer, and Susan L. Hills. 2018. “Powassan Virus Disease in the United States, 2006–2016.” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 18 (6): 286–90. <https://doi.org/10.1089/vbz.2017.2239>.
- Kuivanen, Suvi, Lev Levanov, Lauri Kareinen, Tarja Sironen, Anne J. Jääskeläinen, Ilya Plyusnin, Fathiah Zakhm, et al. 2019. “Detection of Novel Tick-Borne Pathogen, Alongshan Virus, in Ixodes Ricinus Ticks, South-Eastern Finland, 2019.” *Eurosurveillance* 24 (27): 1–8. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es.2019.24.27.1900394>.
- Kumar, Sudhir, Masatoshi Nei, Joel Dudley, and Koichiro Tamura. 2008. “MEGA: A Biologist-Centric Software for Evolutionary Analysis of DNA and Protein Sequences.” *Briefings in Bioinformatics* 9 (4): 299–306. <https://doi.org/10.1093/bib/bbn017>.
- Kurosu, Takeshi. 2011. “Quasispecies of Dengue Virus.” *Tropical Medicine and Health* 39 (4

- supplement): S29–36. <https://doi.org/10.2149/tmh.2011-s02>.
- la Fuente, José de, Sandra Antunes, Sarah Bonnet, Alejandro Cabezas-Cruz, Ana G. Domingos, Agustín Estrada-Peña, Nicholas Johnson, et al. 2017. “Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (April): 1–13. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00114>.
- Labuda, M., and P. A. Nuttall. 2004. “Tick-Borne Viruses.” *Parasitology*, no. 129: 221–45. <https://doi.org/10.1017/S0031182004005220>.
- Lean, Fabian Z.X., Matthew J. Neave, John R. White, Jean Payne, Teresa Eastwood, Jemma Bergfeld, Antonio Di Rubbo, et al. 2019. “Attenuation of Bluetongue Virus (BTV) in an in Ovo Model Is Related to the Changes of Viral Genetic Diversity of Cell-Culture Passaged BTV.” *Viruses* 11 (5). <https://doi.org/10.3390/v11050481>.
- Lei, Xiao Ying, Miao Miao Liu, and Xue Jie Yu. 2015. “Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome and Its Pathogen SFTSV.” *Microbes and Infection* 17 (2): 149–54. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2014.12.002>.
- Lemasson, Manon, Grégory Caignard, Yves Unterfinger, Houssam Attoui, Lesley Bell-Sakyi, Edouard Hirschaud, Sara Moutailler, et al. 2021. “Exploration of Binary Protein–Protein Interactions between Tick-Borne Flaviviruses and Ixodes Ricinus.” *Parasites and Vectors* 14 (1): 1–17. <https://doi.org/10.1186/s13071-021-04651-3>.
- Li, Hongye, and Marilyn J. Roossinck. 2004. “Genetic Bottlenecks Reduce Population Variation in an Experimental RNA Virus Population.” *Journal of Virology* 78 (19): 10582–87. <https://doi.org/10.1128/jvi.78.19.10582-10587.2004>.
- Li, Zhilin. 2018. “Characterizing the Physiological Role of Inward Rectifier Potassium ( Kir ) Channels in Tick Salivary Gland Function.” Louisiana State University.
- Libikova, H., J. Rehacek, E. Ernek, M. Gresikov, J. Somogyio, and O. Kozuch. 1964. “Cytopathic Viruses Isolated from Ixodes Ricinus Ticks in Czechoslovakia.” *Acta Virol.* 8 (1): 96–106.
- Libikova, H., J. Tesarova, and J. Rajcani. 1970. “Experimental Infection of Monkeys with Kemerovo Virus.” *Acta Virologica* 14 (1): 64–69.
- Libikova, H, J Rehacek, and J Somogyiavo. 1965. “VIRUSES RELATED TO THE KEMEROVO VIRUS IN IXODES RICINUS TICKS IN CZECHOSLOVAKIA.” *Acta Virologica* 9: 76–82.
- Liu, Xiang Ye, Martine Cote, Richard E.L. Paul, and Sarah I. Bonnet. 2014. “Impact of Feeding System and Infection Status of the Blood Meal on Ixodes Ricinus Feeding.” *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5 (3): 323–28. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.12.008>.
- Maan, Narender S., Sushila Maan, Manjunatha N. Belaganahalli, Eileen N. Ostlund, Donna J. Johnson, Kyriaki Nomikou, and Peter P.C. Mertens. 2012. “Identification and Differentiation of the Twenty Six Bluetongue Virus Serotypes by RT-PCR Amplification of the Serotype-Specific Genome Segment 2.” *PLoS ONE* 7 (2): 1–9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0032601>.
- Maan, Sushila, Narender S. Maan, Kyriaki Nomikou, Carrie Batten, Frank Antony, Manjunatha N. Belaganahalli, Attia Mohamed Samy, et al. 2011. “Novel Bluetongue Virus Serotype from Kuwait.” *Emerging Infectious Diseases* 17 (5): 886–89. <https://doi.org/10.3201/eid1705.101742>.
- Maan, Sushila, Narender S. Maan, Piet A. van Rijn, René G.P. van Gennip, Orgnameanna Sanders, Isabel M. Wright, Carrie Batten, et al. 2010. “Full Genome Characterisation of Bluetongue Virus Serotype 6 from the Netherlands 2008 and Comparison to Other Field and Vaccine Strains.” *PLoS ONE* 5 (4): 27–29. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010323>.
- Maan, Sushila, Narender S. Maan, Natalie Ross-smith, Carrie A. Batten, Andrew E. Shaw, Simon J. Anthony, Alan R. Samuel, et al. 2008. “Sequence Analysis of Bluetongue Virus Serotype 8 from the Netherlands 2006 and Comparison to Other European Strains.” *Virology* 377 (2): 308–18. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2008.04.028>.
- Maan, Sushila, Shujing Rao, Narender Singh Maan, Simon John Anthony, Houssam Attoui, Alan Richard Samuel, and Peter Paul Clement Mertens. 2007. “Rapid CDNA Synthesis and Sequencing Techniques for the Genetic Study of Bluetongue and Other DsRNA Viruses.” *Journal of Virological Methods* 143 (2): 132–39. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2007.02.016>.
- MacLachlan, N. James, and Alan J. Guthrie. 2010. “Re-Emergence of Bluetongue, African Horse Sickness, and Other Orbivirus Diseases.” *Veterinary Research* 41 (6). <https://doi.org/10.1051/vetres/2010007>.
- Mandl, Christian W. 2005. “Steps of the Tick-Borne Encephalitis Virus Replication Cycle That Affect

- Neuropathogenesis.” *Virus Research* 111 (2 SPEC. ISS.): 161–74. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2005.04.007>.
- Manrubia, Susanna C., Cristina Escarmís, Esteban Domingo, and Ester Lázaro. 2005. “High Mutation Rates, Bottlenecks, and Robustness of RNA Viral Quasispecies.” *Gene* 347 (2 SPEC. ISS.): 273–82. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.12.033>.
- Mans, Ben J., Daniel de Klerk, Ronel Pienaar, and Abdalla A. Latif. 2011. “Nuttalliella Namaqua: A Living Fossil and Closest Relative to the Ancestral Tick Lineage: Implications for the Evolution of Blood-Feeding in Ticks.” *PLoS ONE* 6 (8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023675>.
- Mansfield, Karen L., Lv Jizhou, L. Paul Phipps, and Nicholas Johnson. 2017. “Emerging Tick-Borne Viruses in the Twenty-First Century.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (July). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00298>.
- Marfin, Anthony A, J Erin Staples, Lorann Stallones, Monica M Brackney, Thomas Keefe, William C Black Iv, and Grant L Campbell. 2010. “Epidemiology of Colorado Tick Fever in Montana, Utah, and Wyoming, 1995-2003.” *Vector Borne and Zoonotic Diseases* 10 (4): 381–85. <https://doi.org/10.1089/vbz.2009.0065>.
- Mazelier, Magalie, Ronan Nicolas Rouxel, Michael Zumstein, Roberta Mancini, Lesley Bell-Sakyi, and Pierre-Yves Lozach. 2016. “Uukuniemi Virus as a Tick-Borne Virus Model.” *Journal of Virology* 90 (15): 6784–98. <https://doi.org/10.1128/jvi.00095-16>.
- Mellor, P.S. 1990. “The Replication of Bluetongue Virus in Culicoides Vectors.” In *Bluetongue Viruses. Current Topics in Microbiology and Immunology*, edited by P. Roy and B.M. Gorman. Berlin: Springer, Berlin, Heidelberg. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-75247-6\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-642-75247-6_6).
- Mellor, P.S., J Boorman, and M. Baylis. 2000. “Culicoides Biting Midges: Their Role as Arbovirus Vectors.” *Annual Review of Entomology* 45: 307–40. <https://doi.org/10.1146/annurev.ento.45.1.307>.
- Mellor, Philip Scott, and Christopher Hamblin. 2004. “African Horse Sickness.” *Veterinary Research* 35: 445–66.
- Mendez, Israel I., Laura L. Hermann, Paul R. Hazelton, and Kevin M. Coombs. 2000. “A Comparative Analysis of Freon Substitutes in the Purification of Reovirus and Calicivirus.” *Journal of Virological Methods* 90 (1): 59–67. [https://doi.org/10.1016/S0166-0934\(00\)00217-2](https://doi.org/10.1016/S0166-0934(00)00217-2).
- Mertens, P. P. C., H. Attoui, R Duncan, and T. S Dermody. 2005. “Reoviridae.” In *Virus Taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, edited by C. M. Fauquet, M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, and L. A. Ball, 447–54. London: Elsevier/Academic Press.
- Mertens, P. P.C., Houssam Attoui, and Dennis H. Bamford. 2009. “The RNAs and Proteins of DsRNA Viruses.” *Www.Reoviridae.Org*. 2009. [https://www.reoviridae.org/dsRNA\\_virus\\_proteins/](https://www.reoviridae.org/dsRNA_virus_proteins/).
- Mertens, P. P.C., J. N. Burroughs, A. Walton, M. P. Wellby, H. Fu, R. S. O’Hara, S. M. Brookes, and P. S. Mellor. 1996. “Enhanced Infectivity of Modified Bluetongue Virus Particles for Two Insect Cell Lines and for Two Culicoides Vector Species.” *Virology* 217 (2): 582–93. <https://doi.org/10.1006/viro.1996.0153>.
- Migné, Camille Victoire, Cécile Beck, Gaëlle Gonzalez, Sylvie Lecollinet, and Sara Moutailler. 2021. “Which Tools for Monitoring Emerging Arboviruses within Their Mammalian Hosts and Arthropod Vectors ?” *Virologie* 25 (1): 12–28. <https://doi.org/10.1684/vir.2021.0880>.
- Migné, Camille Victoire, Sara Moutailler, and Houssam Attoui. 2020. “Strategies for Assessing Arbovirus Genetic Variability in Vectors and/or Mammals.” *Pathogens* 9 (11): 1–18. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110915>.
- Mitzel, Dana N., James B. Wolfenbarger, Daniel R. Long, Max Masnick, Sonja M. Best, and Marshall E Bloom. 2007. “Tick-Borne Flavivirus Infection in Ixodes Scapularis Larvae: Development of a Novel Method for Synchronous Viral Infection of Ticks.” *Virology* 365 (2): 410–18.
- Mohd Jaafar, Fauziah, Houssam Attoui, Peter P C Mertens, Philippe De Micco, and Xavier De Lamballerie. 2005. “Structural Organization of an Encephalitic Human Isolate of Banna Virus ( Genus Seadornavirus , Family Reoviridae ) Printed in Great Britain.” *Journal of General Virology* 86: 1147–57. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80578-0>.
- Mohd Jaafar, Fauziah, Mourad Belhouchet, Manjunatha Belaganahalli, Robert B. Tesh, Peter P.C. Mertens, and Houssam Attoui. 2014. “Full-Genome Characterisation of Orungo, Lebombo and Changuinola Viruses Provides Evidence for Co-Evolution of Orbiviruses with Their Arthropod

- Vectors.” *PLoS ONE* 9 (1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086392>.
- Mohd Jaafar, Fauziah, Mourad Belhouchet, Damien Vitour, Micheline Adam, Emmanuel Breard, Stéphan Zientara, Peter P.C. Mertens, and Houssam Attoui. 2014. “Immunisation with Bacterial Expressed VP2 and VP5 of Bluetongue Virus (BTV) Protect  $\alpha/\beta$  Interferon-Receptor Knock-out (IFNAR-/-) Mice from Homologous Lethal Challenge.” *Vaccine* 32 (32): 4059–67. <https://doi.org/10.1016/j.vaccine.2014.05.056>.
- Moutailler, S., J.-C. George, Y. Hansmann, B. Degeilh, G. Joncour, E. Jourdain, L. Malandrin, et al. 2015. “Principales Maladies Transmises Par Les Tiques : Épidémiologie, Clinique et Diagnostic.” In *Tiques et Maladies à Tiques*, IRD, 193–238. Marseille: IRD.
- Moutailler, Sara, Ghazi Krida, Francis Schaffner, Marie Vazeille, and Anna Bella Failloux. 2008. “Potential Vectors of Rift Valley Fever Virus in the Mediterranean Region.” *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 8 (6): 749–54. <https://doi.org/10.1089/vbz.2008.0009>.
- Moutailler, Sara, Benjamin Roche, Jean Michel Thiberge, Valérie Caro, François Rougeon, and Anna Bella Failloux. 2011. “Host Alternation Is Necessary to Maintain the Genome Stability of Rift Valley Fever Virus.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001156>.
- Munderloh, U.G, M Wang Y Liu, C Chen, and T.J Kurtt. 1994. “Establishment, Maintenance and Description of Cell Lines from the Tick Ixodes Scapularis.” *Journal of Parasitology* 80: 533–43.
- Nathanson, Neal, and William J Moss. 2013. “General Virology, Chapter 12 : Epidemiology.” In *Fields Virology - Volume 1*, edited by David M. Knipe and Peter M. Howley, 6th ed. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins.
- Neitz, W.O. 1948. “Immunological Studies on Bluetongue in Sheep.” *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 23: 93–136.
- Noad, Rob, and Polly Roy. 2009. “Bluetongue Virus Replication and Assembly.” In *Bluetongue*, edited by P. P. C. Mertens, M. Baylis, and P. S. Mellor, 1st ed., 54–76. London: Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-369368-6.50002-2>.
- Nuttall, P. A., L. D. Jones, M. Labuda, and W. R. Kaufman. 1994. “Adaptations of Arboviruses to Ticks.” *Journal of Medical Entomology* 31 (1): 1–9. <https://doi.org/10.1093/jmedent/31.1.1>.
- OIE. 2018. “Peste Porcine Africaine.” 2018. <https://www.oie.int/fr/sante-animale-dans-le-monde/maladies-animales/african-swine-fever/>.
- . 2019a. “Guidelines on the Establishment, Management, and Self-Declaration to the Oie of an Equine Disease Free Zone.”
- . 2019b. “Manuel Des Tests de Diagnostic et Des Vaccins Pour Les Animaux Terrestres 2019.” 2019. <https://www.oie.int/fr/normes/manuel-terrestre/acces-en-ligne/>.
- Ortego, Javier, Francisco De la Poza, and Alejandro Marín-López. 2014a. “Interferon  $\alpha/\beta$  Receptor Knockout Mice as a Model to Study Bluetongue Virus Infection.” *Virus Research* 182: 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.038>.
- . 2014b. “Interferon  $\alpha/\beta$  Receptor Knockout Mice as a Model to Study Bluetongue Virus Infection.” *Virus Research* 182: 35–42. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2013.09.038>.
- Paulauskas, A., E. Galdikaitė-Brazienė, J. Radzijeuskaja, A. Aleksandravičienė, and M. Galdikas. 2016. “Genetic Diversity of Ixodes Ricinus (Ixodida: Ixodidae) Ticks in Sympatric and Allopatric Zones in Baltic Countries.” *Journal of Vector Ecology* 41 (2): 244–53. <https://doi.org/10.1111/jvec.12219>.
- Pereira De Oliveira, Rémi, Evelyne Hutet, Renaud Lancelot, Frédéric Paboeuf, Maxime Duhayon, Fernando Boinas, Adalberto A. Pérez de León, Serhii Filatov, Marie Frédérique Le Potier, and Laurence Vial. 2020. “Differential Vector Competence of Ornithodoros Soft Ticks for African Swine Fever Virus: What If It Involves More than Just Crossing Organic Barriers in Ticks?” *Parasites and Vectors* 13 (1): 1–15. <https://doi.org/10.1186/s13071-020-04497-1>.
- Pereira de Oliveira, Rémi, Evelyne Hutet, Frédéric Paboeuf, Maxime Duhayon, Fernando Boinas, Adalberto Perez de Leon, Serhii Filatov, Laurence Vial, and Marie Frédérique Le Potier. 2019. “Comparative Vector Competence of the Afrotropical Soft Tick Ornithodoros Moubata and Palearctic Species, O. erraticus and O. verrucosus, for African Swine Fever Virus Strains Circulating in Eurasia.” *PLoS ONE* 14 (11): 1–16. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0225657>.
- Pérez-Eid, Claudine. 2007. *Les Tiques: Identification, Biologie, Importance Médicale et Vétérinaire ; Collection Monographie de Microbiologie*. Edited by Lavoisier. TEC&DOC. Lavoisier.

- Perez de Leon, Adalberto A, Edouard Vannier, Consuelo Almazan, and Peter J Krause. 2014. "Tick-Borne Protozoa." In *Biology of Ticks*, 2, edited by Oxford University Press, 2nd editio, 147–79. New York.
- Pullinger, Gillian D., Marc Guimerà Busquets, Kyriaki Nomikou, Mark Boyce, Houssam Attoui, and Peter P. Mertens. 2016. "Identification of the Genome Segments of Bluetongue Virus Serotype 26 (Isolate KUW2010/02) That Restrict Replication in a Culicoides Sonorensis Cell Line (KC Cells)." *PLoS ONE* 11 (2): 1–19. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149709>.
- Ratinier, Maxime, Marco Caporale, Matthew Golder, Giulia Franzoni, Kathryn Allan, Sandro Filipe Nunes, Alessia Armezzani, et al. 2011. "Identification and Characterization of a Novel Non-Structural Protein of Bluetongue Virus." *PLoS Pathogens* 7 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002477>.
- Reis, Caroline, Martine Cote, Danielle Le Rhun, Benoit Lecuelle, Michael L. Levin, Muriel Vayssier-Taussat, and Sarah I. Bonnet. 2011. "Vector Competence of the Tick Ixodes Ricinus for Transmission of Bartonella Birtlesii." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5 (5): 1–6. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0001186>.
- Ribeiro, J.M.C. 1987. "Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods." *Annual Review of Entomolgy* 37: 463–78.
- Ries, Christina, Tumenjargal Sharav, Martin Beer, and Bernd Hoffmann. 2021. "Putative Novel Serotypes '33' and '35' in Clinically Healthy Small Ruminants in Mongolia Expand the Group of Atypical BTV." *Viruses* 13 (42): 21.
- Rivarola, María Elisa, Laura Beatriz Tauro, Guillermo Albrieu Llinás, and Marta Silvia Contigiani. 2014. "Virulence Variation among Epidemic and Non-Epidemic Strains of Saint Louis Encephalitis Virus Circulating in Argentina." *Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz* 109 (2): 197–201. <https://doi.org/10.1590/0074-0276130475>.
- Rodhain, F. 1991. "Le Fonctionnement Des Systèmes Virus-Vecteurs." *Annales de La Société Belge de Médecine Tropicale* 71 (Suppl.1): 189–99.
- Roy, Polly. 2013a. "Reoviridae, Chapter 44: Orbiviruses." In *Fields Virology - Volume 2*, edited by D. Knipe and P. Howley, 6th ed., 1402–23. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins.
- . 2013b. "Reoviridae." In *Fields Virology - Volume 2*, edited by D. Knipe and P. Howley, 6th ed., 1402–23. Philadelphia: Wolters Kluwer - Lippincott Williams & Wilkins.
- . 2016. "Orbiviruses." Basicmedical Key. 2016. <https://basicmedicalkey.com/orbiviruses/>.
- . 2017. "Bluetongue Virus Structure and Assembly." *Current Opinion in Virology* 24: 115–23. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2017.05.003>.
- Rushton, Jonathan, and Nick Lyons. 2015. "Economic Impact of Bluetongue: A Review of the Effects on Production." *Veterinaria Italiana* 51 (4): 401–6. <https://doi.org/10.12834/VetIt.646.3183.1>.
- Růžek, Daniel, Valeriy V. Yakimenko, Lyudmila S. Karan, and Sergey E. Tkachev. 2010. "Omsk Haemorrhagic Fever." *The Lancet* 376 (9758): 2104–13. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61120-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61120-8).
- Sato, M, N Maeda, H Yoshida, M Urade, and S Saito. 1977. "Plaque Formation of Herpes Virus Hominis Type 2 and Rubella Virus in Variants Isolated from the Colonies of BHK21/WI-2 Cells Formed in Soft Agar." *Archives of Virology* 53 (3): 269–73. <https://doi.org/10.1007/BF01314672>.
- Savage, Harry M., Kristen L. Burkhalter, Marvin S. Godsey, Nicholas A. Panella, David C. Ashley, William L. Nicholson, and Amy J. Lambert. 2017. "Bourbon Virus in Field-Collected Ticks, Missouri, USA." *Emerging Infectious Diseases* 23 (12): 2017–22. <https://doi.org/10.3201/eid2312.170532>.
- Savage, Harry M., Marvin S. Godsey, Nicholas A. Panella, Kristen L. Burkhalter, Justin Manford, Ingrid C. Trevino-Garrison, Anne Straily, Savannah Wilson, Jaden Bowen, and Ram K. Raghavan. 2018. "Surveillance for Tick-Borne Viruses near the Location of a Fatal Human Case of Bourbon Virus (Family Orthomyxoviridae: Genus Thogotovirus) in Eastern Kansas, 2015." *Journal of Medical Entomology* 55 (3): 701–5. <https://doi.org/10.1093/jme/tjx251>.
- Schmidt, J.R., and R.E. Shope. 1971. "Kemerovo Virus from a Migrating Common Redstart of Eurasia." *Acta Virol.* 15 (1): 112.
- Schoehn, Guy, Stephen R. Moss, Patricia A. Nuttall, and Elizabeth A. Hewat. 1997. "Structure of Broadhaven Virus by Cryoelectron Microscopy: Correlation of Structural and Antigenic Properties

- of Broadhaven Virus and Bluetongue Virus Outer Capsid Proteins.” *Virology* 235 (2): 191–200. <https://doi.org/10.1006/viro.1997.8685>.
- Semashko, I.V. 1971. “Comparative Investigation of the Kemerovo Serological Group Members.” (Ph.D. Thesis) Moscow (in Russian).
- Shapoval, A.N., E.A. Sokol, A.D. Emelyanova, and C.F. Kulikova. 1964. “About Structure of Outbreaks in the Natural Foci of the Tick-Borne Encephalitis. In:” *Report on IX Scientific Session of Research Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitides*.
- Shaw, Andrew E., Anke Brüning-Richardson, Ewan E. Morrison, Jacquelyn Bond, Jennifer Simpson, Natalie Ross-Smith, Oya Alpar, Peter P.C. Mertens, and Paul Monaghan. 2013. “Bluetongue Virus Infection Induces Aberrant Mitosis in Mammalian Cells.” *Virology Journal* 10: 1–12. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-319>.
- Shayan, Sara, Mohammad Bokaeian, Mona Ranjvar Shahrivar, and Sadegh Chinikar. 2015. “Crimean-Congo Hemorrhagic Fever.” *Lab Medicine* 46 (3): 180–89. <https://doi.org/10.1309/LMN1P2FRZ7BKZSCO>.
- Šimo, Ladislav, Maria Kazimirova, Jennifer Richardson, and Sarah I. Bonnet. 2017. “The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission.” *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7 (JUN): 1–23. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00281>.
- Šimo, Ladislav, Mirko Slovák, Yoonseong Park, and Dušan Žitňan. 2009. “Identification of a Complex Peptidergic Neuroendocrine Network in the Hard Tick, *Rhipicephalus Appendiculatus*.” *Cell and Tissue Research* 335 (3): 639–55. <https://doi.org/10.1007/s00441-008-0731-4>.
- Slovák, Mirko, Mária Kazimírová, Marta Siebenstichová, Katarína Ustaníková, Boris Klempa, Tamara Gritsun, Ernest A. Gould, and Patricia A. Nuttall. 2014. “Survival Dynamics of Tick-Borne Encephalitis Virus in *Ixodes Ricinus* Ticks.” *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5 (6): 962–69. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.07.019>.
- Sonenshine, Daniel E, and R Michael Roe. 2014. *Biology of Ticks, Vol 1*. Oxford Uni. New York.
- Springer, Andrea, Antje Glass, Julia Probst, and Christina Strube. 2021. “Tick-Borne Zoonoses and Commonly Used Diagnostic Methods in Human and Veterinary Medicine.” *Parasitology Research*. <https://doi.org/10.1007/s00436-020-07033-3>.
- Talactac, Melbourne Rio, Kentaro Yoshii, Emmanuel Pacia Hernandez, Kodai Kusakisako, Remil Linggatong Galay, Kozo Fujisaki, Masami Mochizuki, and Tetsuya Tanaka. 2018. “Vector Competence of *Haemaphysalis Longicornis* Ticks for a Japanese Isolate of the Thogoto Virus.” *Scientific Reports* 8 (1): 1–8. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27483-1>.
- Tambo, Ernest, and Ashraf G. El-Dessouky. 2018. “Defeating Re-Emerging Alkhurma Hemorrhagic Fever Virus Outbreak in Saudi Arabia and Worldwide.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 12 (9): 10–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006707>.
- Thompson, Julie D., Toby J. Gibson, Frédéric Plewniak, François Jeanmougin, and Desmond G. Higgins. 1997. “The CLUSTAL X Windows Interface: Flexible Strategies for Multiple Sequence Alignment Aided by Quality Analysis Tools.” *Nucleic Acids Research* 25 (24): 4876–82. <https://doi.org/10.1093/nar/25.24.4876>.
- Thompson, Kristen A. Stauffer, and John Yin. 2010. “Population Dynamics of an RNA Virus and Its Defective Interfering Particles in Passage Cultures.” *Virology Journal* 7: 1–10. <https://doi.org/10.1186/1743-422X-7-257>.
- Tjaden, Nils Benjamin, Stephanie Margarete Thomas, Dominik Fischer, and Carl Beierkuhnlein. 2013. “Extrinsic Incubation Period of Dengue: Knowledge, Backlog, and Applications of Temperature Dependence.” *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7 (6): 1–5. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002207>.
- Tkachev, Sergey E., Artem Yu Tikunov, Igor V. Babkin, Natalia N. Livanova, Stanislav G. Livanov, Victor V. Panov, Valeriy V. Yakimenko, Alexey K. Tantsev, Dmitrii E. Taranenko, and Nina V. Tikunova. 2017. “Occurrence and Genetic Variability of Kemerovo Virus in *Ixodes* Ticks from Different Regions of Western Siberia, Russia and Kazakhstan.” *Infection, Genetics and Evolution* 47: 56–63. <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2016.11.007>.
- Tkachev, Sergey, Victor Panov, Gerhard Dobler, and Nina Tikunova. 2014. “First Detection of Kemerovo Virus in *Ixodes Pavlovskyi* and *Ixodes Persulcatus* Ticks Collected in Novosibirsk Region, Russia.” *Ticks and Tick-Borne Diseases* 5 (5): 494–96. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.003>.

- Tomazatos, Alexandru, Rachel E. Marschang, Iulia Maranda, Heike Baum, Alexandra Bialonski, Marina Spînu, Renke Lühken, Jonas Schmidt-Chanasit, and Daniel Cadar. 2020. "Letea Virus: Comparative Genomics and Phylogenetic Analysis of a Novel Reassortant Orbivirus Discovered in Grass Snakes (*Natrix Natrix*)." *Viruses* 12 (2): 1–18. <https://doi.org/10.3390/v12020243>.
- Tsetsarkin, Konstantin A., Dana L. Vanlandingham, Charles E. McGee, and Stephen Higgs. 2007. "A Single Mutation in Chikungunya Virus Affects Vector Specificity and Epidemic Potential." *PLoS Pathogens* 3 (12): 1895–1906. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030201>.
- Tsetsarkin, Konstantin A., and Scott C. Weaver. 2011. "Sequential Adaptive Mutations Enhance Efficient Vector Switching by Chikungunya Virus and Its Epidemic Emergence." *PLoS Pathogens* 7 (12). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002412>.
- Valarcher, J F, S Hägglund, M Juremalm, and G Blomqvist. 2015. "Tick-Borne Encephalitis." *Rev. Sci Tech. Off. Int. Epiz.* 34 (2): 453–66.
- Vega-Rua, A., K. Zouache, R. Girod, A.-B. Failloux, and R. Lourenco-de-Oliveira. 2014. "High Level of Vector Competence of *Aedes Aegypti* and *Aedes Albopictus* from Ten American Countries as a Crucial Factor in the Spread of Chikungunya Virus." *Journal of Virology* 88 (11): 6294–6306. <https://doi.org/10.1128/jvi.00370-14>.
- ViralZone. 2010. "Orthonairovirus." 2010. <https://viralzone.expasy.org/251>.
- . 2016. "Flavivirus." 2016. <https://viralzone.expasy.org/24>.
- Wang, Ze-Dong, Bo Wang, Feng Wei, and Shu-Zheng Han. 2019. "A New Segmented Virus Associated with Human Febrile Illness in China." *The New England Journal of Medicine* 380: 2116–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1805068>.
- Wargo, Andrew R., and Gael Kurath. 2012. "Viral Fitness: Definitions, Measurement, and Current Insights." *Current Opinion in Virology* 2 (5): 538–45. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2012.07.007>.
- Weaver, Scott C., and Alan D.T. Barrett. 2004. "Transmission Cycles, Host Range, Evolution and Emergence of Arboviral Disease." *Nature Reviews Microbiology* 2 (10): 789–801. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1006>.
- Weaver, Scott C., Federico Costa, Mariano A. Garcia-Blanco, Albert I. Ko, Guilherme S. Ribeiro, George Saade, Pei Yong Shi, and Nikos Vasilakis. 2016. "Zika Virus: History, Emergence, Biology, and Prospects for Control." *Antiviral Research* 130: 69–80. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010>.
- Weaver, Scott C., and Naomi L. Forrester. 2015. "Chikungunya: Evolutionary History and Recent Epidemic Spread." *Antiviral Research* 120: 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.04.016>.
- Wechtaison, Wittawat, Sarah I. Bonnet, Yi Yang Lien, Shih Te Chuang, and Yi Lun Tsai. 2020. "Transmission of *Bartonella Henselae* within *Rhipicephalus Sanguineus*: Data on the Potential Vector Role of the Tick." *PLoS Neglected Tropical Diseases* 14 (10): 1–14. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008664>.
- Weisheit, Sabine, Margarita Villar, Hana Tykalová, Marina Popara, Julia Loecherbach, Mick Watson, Daniel Růžek, et al. 2015. "Ixodes Scapularis and Ixodes Ricinus Tick Cell Lines Respond to Infection with Tick-Borne Encephalitis Virus: Transcriptomic and Proteomic Analysis." *Parasites and Vectors* 8 (1): 1–26. <https://doi.org/10.1186/s13071-015-1210-x>.
- Wilson, Anthony J., and Philip S. Mellor. 2009. "Bluetongue in Europe: Past, Present and Future." *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 364 (1530): 2669–81. <https://doi.org/10.1098/rstb.2009.0091>.
- Wilson, Anthony J., Philip Scott Mellor, Camille Szmargd, and Peter Paul Clement Mertens. 2009. "Adaptive Strategies of African Horse Sickness Virus to Facilitate Vector Transmission." *Veterinary Research* 40 (16). <https://doi.org/10.1051/vetres:2008054>.
- Wilson, W. C., H. C. Ma, E. H. Venter, A. A. Van Dijk, B. S. Seal, and J. O. Mecham. 2000. "Phylogenetic Relationships of Bluetongue Viruses Based on Gene S7." *Virus Research* 67 (2): 141–51. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00138-6](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00138-6).
- Xia, Han, Andrew S. Beck, Aysen Gargili, Naomi Forrester, Alan D.T. Barrett, and Dennis A. Bente. 2016. "Transstadial Transmission and Long-Term Association of Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus in Ticks Shapes Genome Plasticity." *Scientific Reports* 6 (May): 1–12. <https://doi.org/10.1038/srep35819>.
- Xu, P. T., Y. M. Wang, J. M. Zuo, J. W. Lin, and P. M. Xu. 1990. "New Orbiviruses Isolated from

- Patients with Unknown Fever and Encephalitis in Yunnan Province.” *Chinese Journal of Virology* 6 (1): 27–33.
- Zhuang, Lu, Yi Sun, Xiao Ming Cui, Fang Tang, Jian Gong Hu, Li Yuan Wang, Ning Cui, et al. 2018. “Transmission of Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus by *Haemaphysalis Longicornis* Ticks, China.” *Emerging Infectious Diseases* 24 (5): 868–71. <https://doi.org/10.3201/eid2405.151435>.
- Zykov, S. 2021. “A Male and a Female of Taiga Tick (*Ixodes Persulcatus*) on a Green Leaf.” Shutterstock. 2021. <https://www.shutterstock.com/fr/image-photo/male-female-taiga-tick-ixodes-persulcatus-1406991311>.

# Annexes

## Annexe n°1

### Quantification des ARN viraux dans les organes de souris, sans distinction du sexe et de l'âge des souris, selon la souche inoculée KEMV P3, P.alt 30, Ps.BSR 30 et Ps.IRE 30

Afin d'augmenter le nombre d'échantillons dans nos analyses et mettre en évidence un potentiel effet de la condition de culture des 3 souches adaptées (effet de l'alternance), la figure 57 représente la quantité de virus par organes selon la souche inoculée sans distinction des âges et du sexe des souris. Dans la rate, la souche alternée est détectée significativement en plus grande quantité par rapport à la souche adaptée dans les cellules de mammifère. Dans le reste des organes, les trois souches ont infecté et se sont répliquées de manière équivalente. Au vu de ces résultats, il est difficile de conclure à un éventuel tropisme de chaque souche. Il s'agit d'une étude préliminaire et d'autres expérimentations sont nécessaires avec des groupes d'animaux en plus grand effectif afin de réaliser correctement des analyses statistiques sans que ces dernières ne soient biaisées par la différence d'âge et de sexe des souris.

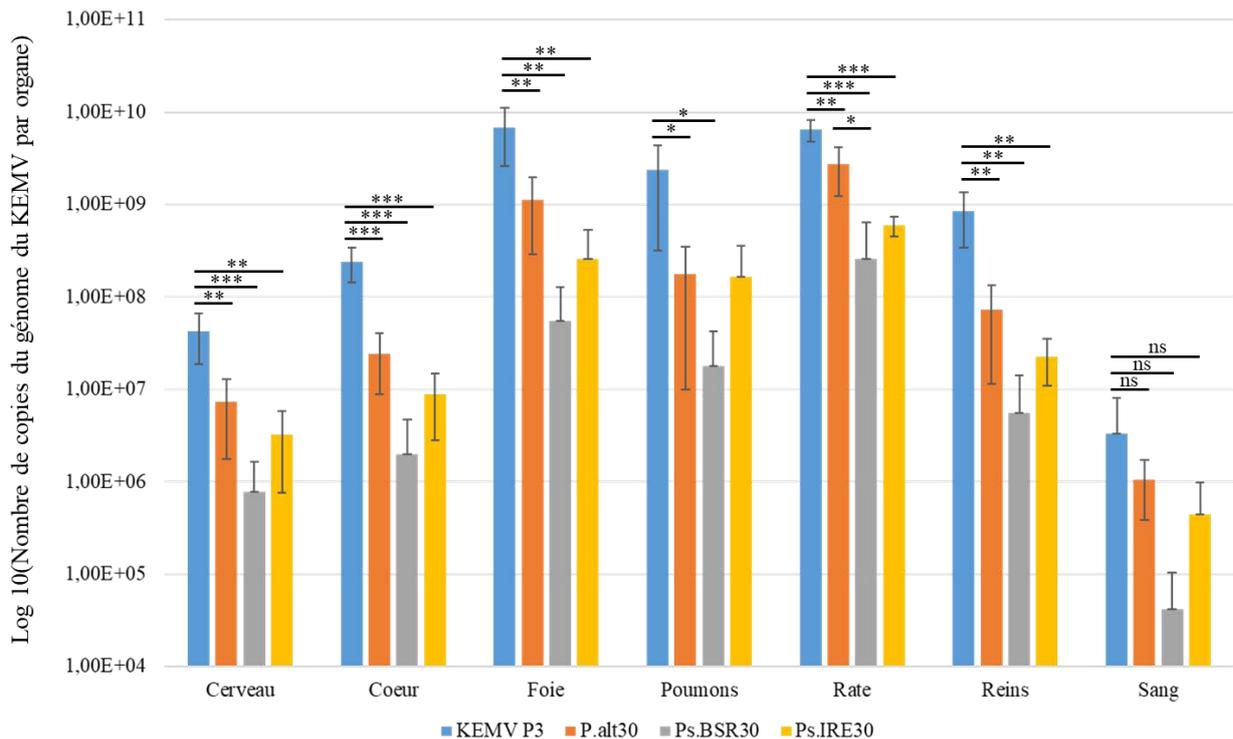


Figure 57: Quantification des ARN viraux des différentes souches du KEMV au sein des organes de souris IFNAR<sup>-/-</sup> inocuées en SC avec les différentes souches KEMV P3, P.alt 30, Ps.BSR 30 et Ps.IRE 30 (test statistique ANOVA à 1 facteur, '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05)

## Annexe n°2

### Cinétique de réplication des 30 dans les cellules de mammifère BSR et de tique IRE/CTVM20

Afin d'évaluer la capacité de réplication des différentes souches adaptées en culture cellulaire, des cinétiques de réplication ont été réalisées dans les cellules BSR et IRE/CTVM20. La MOI utilisée pour ces cinétiques était  $10^{-5}$ . Le choix de cette MOI très basse s'est basé sur la quantité de virus disponible, notamment pour la souche Ps.BSR 30, pour lequel le titre infectieux a été déterminé à  $10^3$  PFU/mL. Une MOI de 0,05 nécessitait alors de grand volume de virus.

Les cinétiques dans les BSR ont été réalisées sur 4 jours. Au bout de ces 4 jours, des effets cytopathiques étaient visibles seulement avec les souches Ps.IRE 30 et P.alt 30. Les cellules étaient toutes lysées à J4 post-infection. Pour les infections effectuées avec Ps.BSR 30, toutes les cellules n'étaient pas lysées (60 à 70% des cellules lysées) et formaient comme des « cheminées » ou « chapelet ». Concernant les infections dans les cellules de tique IRE/CTVM20, les cinétiques en IRE/CTVM20 ont été conduites sur 6 jours pour KEMV P3, Ps.BSR 30 et Ps.IRE 30 et 8 jours pour le P.alt 30. L'état général des cellules a été le même au cours de la cinétique, c'est-à-dire aucun effet cytopathique ou autre modification n'a été observé.

Les figures 58 et 59 représentent la cinétique de réplication en fonction du temps des différentes souches. Les ARN viraux ont été quantifiés dans les cellules et le surnageant par RT-PCR temps réel en ciblant le segment 2 du KEMV. Les valeurs obtenues pour J0 sont assez surprenantes puisqu'elles sont pour les 4 souches très éloignées les unes des autres, malgré une MOI de  $10^{-5}$ . Il est alors difficile d'interpréter ces résultats de manière sûre pour les deux types cellulaires.

Quelques tendances sont observables mais elles restent à confirmer. Dans les cellules de mammifère BSR, les 3 souches Ps.BSR 30, Ps.IRE 30 et P.alt 30 semblent être mieux adaptées pour se répliquer dans les cellules BSR puisqu'elles atteignent un plateau 1000 fois plus haut que celui atteint par KEMV P3 dans ces cellules. Malgré 30 passages dans les cellules de tique, la souche Ps.IRE 30 semble se répliquer de manière efficace dans les BSR. Enfin la souche P.alt 30 a montré une vitesse de réplication importante au vu de la pente de la phase exponentielle. Dans les cellules de tique IRE/CTVM20, KEMV P3 et Ps.BSR 30 montrent un certain délai (quelques jours) avant de se répliquer. Cet aspect n'est pas observé pour les souches Ps.IRE 30 et P.alt 30, pour lesquelles le début de réplication est visible à 24h post-infection. Les résultats indiqueraient que la souche alternée a une capacité à infecter et à se répliquer aisément dans les deux types cellulaires. La souche Ps.IRE 30 semble

être spécialisée dans les cellules de tique mais montre une grande capacité à se répliquer dans les cellules de mammifère.

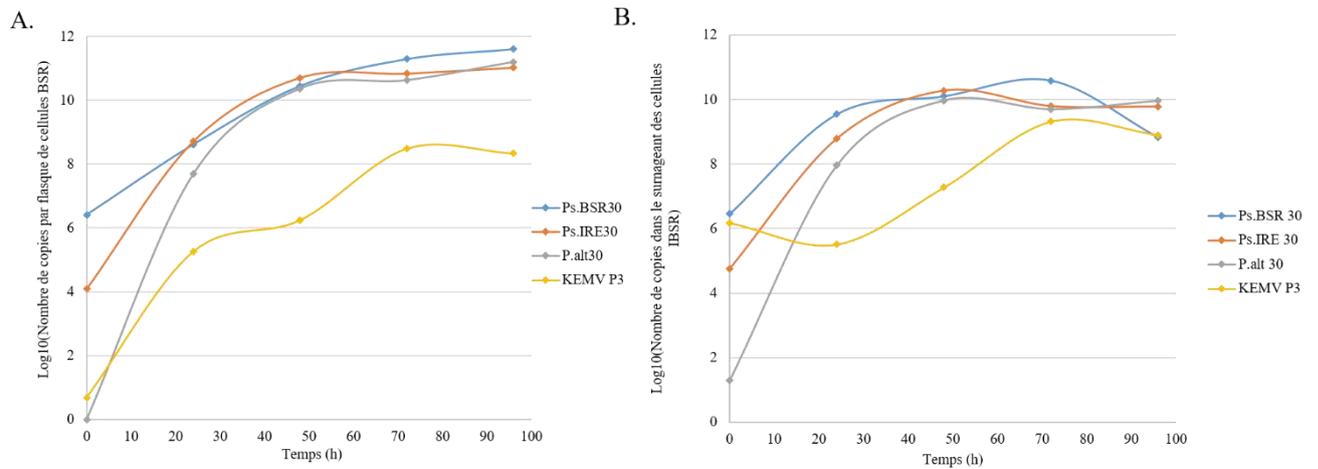


Figure 58: Cinétiques de répllication en cellules BSR (A) et dans le surnageant (B) des souches de KEMV adaptées en culture cellulaire

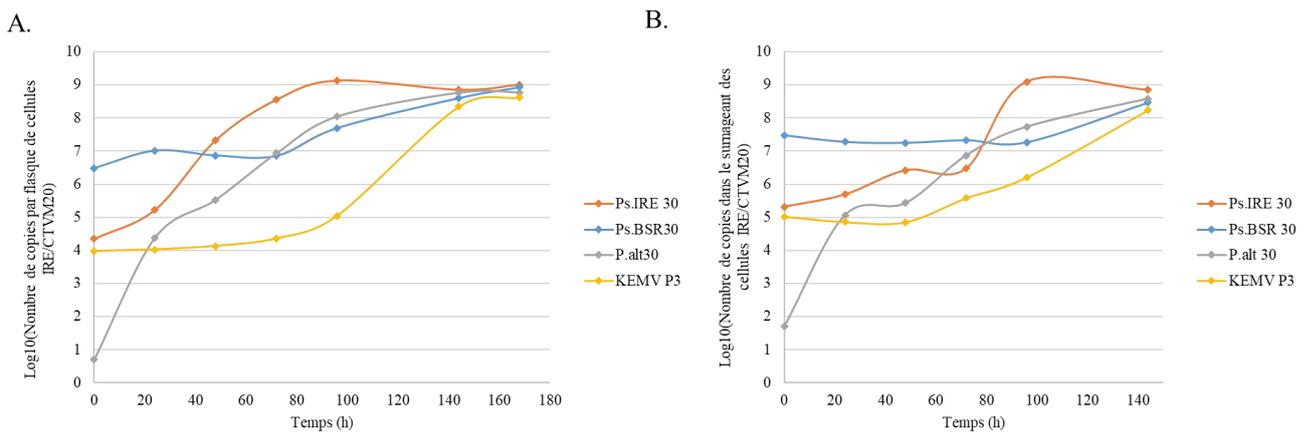


Figure 59: Cinétiques de répllication en cellules IRE/CTVM20 (A) et dans le surnageant (B) des souches de KEMV adaptées en culture cellulaire

## Annexe n°3

Revue : Migné, Camille Victoire, Cécile Beck, Gaëlle Gonzalez, Sylvie Lecollinet, and Sara Moutailler. 2021. “Which Tools for Monitoring Emerging Arboviruses within Their Mammalian Hosts and Arthropod Vectors ?” *Virologie* 25 (1):12–28. <https://doi.org/10.1684/vir.2021.0880>.



**Arcueil, le 27/02/2021**

Sara Moutailler

**Vous trouverez ci-après le tiré à part de votre article au format électronique (pdf) :**

Quels outils pour la surveillance des arbovirus émergents au sein de leurs hôtes mammifères et vecteurs arthropodes ?

**paru dans**

*Virologie*, 2021, Volume 25, Numéro 1

**John Libbey Eurotext**

*tiré à part numérique vous est délivré pour votre propre usage et ne peut être transmis à des tiers qu'à des fins de recherches personnelles scientifiques. En aucun cas, il ne doit faire l'objet d'une distribution ou d'une utilisation promotionnelle, commerciale ou publicitaire*

*Tous droits de reproduction, d'adaptation, de traduction et de diffusion réservés pour tous pays.*

© John Libbey Eurotext, 2021

# Quels outils pour la surveillance des arbovirus émergents au sein de leurs hôtes mammifères et vecteurs arthropodes ?

*Which tools for monitoring emerging arboviruses within their mammalian hosts and arthropod vectors ?*

Camille Victoire Migné<sup>1,2</sup>

Cécile Beck<sup>2</sup>

Gaëlle Gonzalez<sup>2</sup>

Sylvie Lecollinet<sup>2</sup>

Sara Moutailler<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Anses, Inrae, École nationale vétérinaire d'Alfort, UMR Bipar, Laboratoire de Santé animale, Maisons-Alfort, F-94700, France

<sup>2</sup> École nationale vétérinaire d'Alfort, Anses, Inrae, UMR Virologie, Maisons-Alfort, F-94700, France

**Résumé.** Les arbovirus sont des virus transmis à l'Homme et/ou à des animaux par des arthropodes hématophages. Ils sont importants en termes de santé publique mais également d'un point de vue économique. Au vu du nombre d'arbovirus déjà identifiés et de leur grande variabilité génétique, il est nécessaire, voire indispensable, d'avoir des outils ayant une grande flexibilité pour leur surveillance. La circulation des arbovirus au sein d'une population animale peut se démontrer par recherche directe du virus au sein de l'hôte et/ou du vecteur ou par recherche indirecte du virus en mettant en évidence une séroconversion chez l'hôte vertébré. Les virus ont des grandes capacités d'adaptation qui leur permettent d'émerger dans de nouvelles zones géographiques et/ou de franchir les barrières d'espèces. Au fil des décennies, la surveillance des arbovirus a considérablement évolué grâce à toutes les technologies innovantes qui ont vu le jour. Les objectifs de cette revue sont de faire l'état de l'art sur : (i) les outils classiques pour la recherche directe ou indirecte des arbovirus, (ii) les outils de nouvelle génération qui répondent au mieux aux attentes en termes de surveillance optimale des arbovirus et (iii) les axes d'amélioration pour la surveillance des arbovirus.

**Mots clés :** arbovirus, arthropodes, surveillance, outils classiques, outils de nouvelle génération

**Abstract.** Arboviruses are viruses transmitted to humans and/or animals by hematophagous arthropods. They have a significant economic and public health impact. Given the number of arboviruses already identified and their great genetic variability, it is essential to have highly flexible tools for their monitoring. Arbovirus circulation within animal populations can be demonstrated by direct and/or indirect screening of a specific virus within vertebrate hosts and/or arthropod vectors. Viruses have great adaptive capacities that enable them to emerge into new geographic areas and/or cross species barriers. Over the decades, arbovirus monitoring has considerably evolved due to innovations in detection technologies. The objectives of this review are to list and assess (i) the current tools for direct or indirect screening for arboviruses, (ii) the new generation tools that best meet expectations in terms of optimal arbovirus monitoring and (iii) the potentials for improved arbovirus monitoring.

**Key words:** arboviruses, arthropods, monitoring, current tools, new generation tools

**Correspondance :** S. Moutailler  
<sara.moutailler@anses.fr>

doi: 10.1684/vir.2021.0880

## Introduction

Les arbovirus (*arthropod-borne viruses*) sont des virus transmis à l'Homme et/ou à des animaux par des arthropodes hématophages [1]. Au moins 500 arbovirus ont été identifiés, la moitié étant transmis par des moustiques, un tiers par des tiques et le reste essentiellement par des phlébotomes et des moucheron piqueurs du genre *Culicoides* [2]. Les arbovirus peuvent être zoonotiques ou épizootiques. Les signes cliniques d'une arbovirose sont variables, allant de la simple fièvre, fatigue jusqu'à des signes cliniques plus sévères tels que des atteintes neurologiques ou des fièvres hémorragiques pouvant entraîner la mort. Ces virus sont importants en termes de santé publique puisqu'ils sont responsables d'épidémies dans certaines régions du monde. Par exemple, deux épidémies causées par deux virus transmis par des moustiques du genre *Aedes*, principalement par *Ae. aegypti* et secondairement *Ae. albopictus*, ont marqué le début du XXI<sup>e</sup> siècle : le virus Zika (ZIKV) en 2015-2016 sur le continent américain [3] et le virus Chikungunya (CHIKV) en 2005-2007 dans l'océan Indien (île de la Réunion, Inde, Malaisie, Sri Lanka) [4]. Les arbovirus ont également un impact économique non négligeable notamment pour les élevages comme le virus de la fièvre catarrhale ovine (*bluetongue* virus, BTV), transmis par les moucheron du genre *Culicoides*, responsable de taux de morbidité et de mortalité élevés dans les élevages ovins. L'épizootie due à la souche BTV de sérotype 8 (BTV-8) en Europe de 2006 à 2008 a eu un impact financier de l'ordre du milliard d'euros en France. En plus de l'impact direct de la maladie, les échanges commerciaux d'animaux et de produits animaux ont été bloqués [5].

Les arbovirus ont un cycle naturel qui implique des vecteurs arthropodes hématophages et des hôtes vertébrés. Leur transmission repose sur la compétence vectorielle de l'arthropode pour le virus. En effet, l'arthropode doit être capable d'acquérir le virus lors d'un repas sanguin sur un hôte infecté. Le virus doit ensuite infecter les cellules du tractus digestif et se disséminer au sein du vecteur jusqu'à atteindre les glandes salivaires afin d'être transmis à un nouvel hôte lors d'un autre repas sanguin [6]. Il a été démontré que les arbovirus pouvaient établir une infection persistante au sein des arthropodes. Ces derniers peuvent alors être considérés comme des vecteurs viraux mais également comme des réservoirs [7]. De plus, les arthropodes peuvent être porteurs de plusieurs virus, des cas de co-infections ayant déjà été rapportés chez les moustiques notamment [8]. La répartition géographique des arbovirus est donc à mettre en relation avec celle de leurs vecteurs pour lesquels des cartes de distribution sont généralement disponibles. En outre, le changement climatique et les activités humaines (déforestation, urbanisation,

échanges internationaux...) ont (largement) contribué à modifier l'écologie et la distribution des vecteurs et ainsi à engendrer de nouvelles émergences virales [9-11]. De plus, au vu de l'intensification des échanges internationaux, le risque d'introduction de virus dans de nouvelles aires géographiques n'est pas négligeable notamment par le biais d'importation de vecteurs et/ou d'animaux infectés et amplificateurs (commerce légal ou illégal) [12].

Les arbovirus appartiennent à dix familles virales : *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Asfarviridae*, *Nairoviridae*, *Peribunyaviridae*, *Phenuiviridae*, *Nyamiviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae* et *Orthomyxoviridae* [2]. La plupart des arbovirus animaux sont des virus à ARN, sauf le virus de la peste porcine africaine qui est un virus à ADN. Les virus à ARN ont un taux de mutation plus élevé que celui des virus à ADN en raison d'une absence d'activité de relecture de leur ARN polymérase ARN dépendante pendant la réplication [13]. D'autres événements peuvent participer à leur variabilité génétique comme des événements de recombinaisons, duplications de gènes, réassortiments de segments, etc. La population générée par la multiplication des virus dans une cellule est alors hétérogène mais ceux-ci sont proches génétiquement. Il s'agit de quasi-espèces virales qui ont une plasticité phénotypique importante et une grande capacité à s'adapter à de nouveaux hôtes et/ou environnements [14]. En outre, ces virus sont soumis à des sélections compétitives et aléatoires. Les pressions naturelles sont les plus efficaces pour la sélection des différents variants, notamment pour l'élimination des mutations à large effet. Parmi elles, les goulots d'étranglement réduisent fortement la variabilité génétique, et par conséquent, la taille des populations générées [15]. Par exemple, le franchissement de la barrière intestinale et des glandes salivaires du moustique *Culex taeniopus* représente un goulot d'étranglement qui a un fort impact sur la taille de la population du virus de l'encéphalite équine de l'Est [16]. En 2005-2007, CHIKV, responsable de l'épidémie dans l'océan Indien, présentait une mutation au niveau de la glycoprotéine E1 entraînant une substitution d'acide aminé (A226 V) et permettant au virus d'infecter un autre vecteur, *Aedes albopictus*. Ce moustique a une répartition géographique beaucoup plus large qu'*Aedes aegypti*, l'habituel vecteur du CHIKV [17].

La circulation des arbovirus au sein d'une population animale peut se démontrer par recherche directe du virus au sein de l'hôte et/ou du vecteur ou par recherche indirecte d'une infection passée par le virus en mettant en évidence une séroconversion chez l'hôte vertébré. La surveillance peut se faire de différentes manières en utilisant, par exemple, des animaux sentinelles. Afin d'identifier les espèces sentinelles, ces dernières doivent être fortement exposées à l'arbovirus concerné et développer une séroconversion rapide lors de l'infection. Ces espèces ne

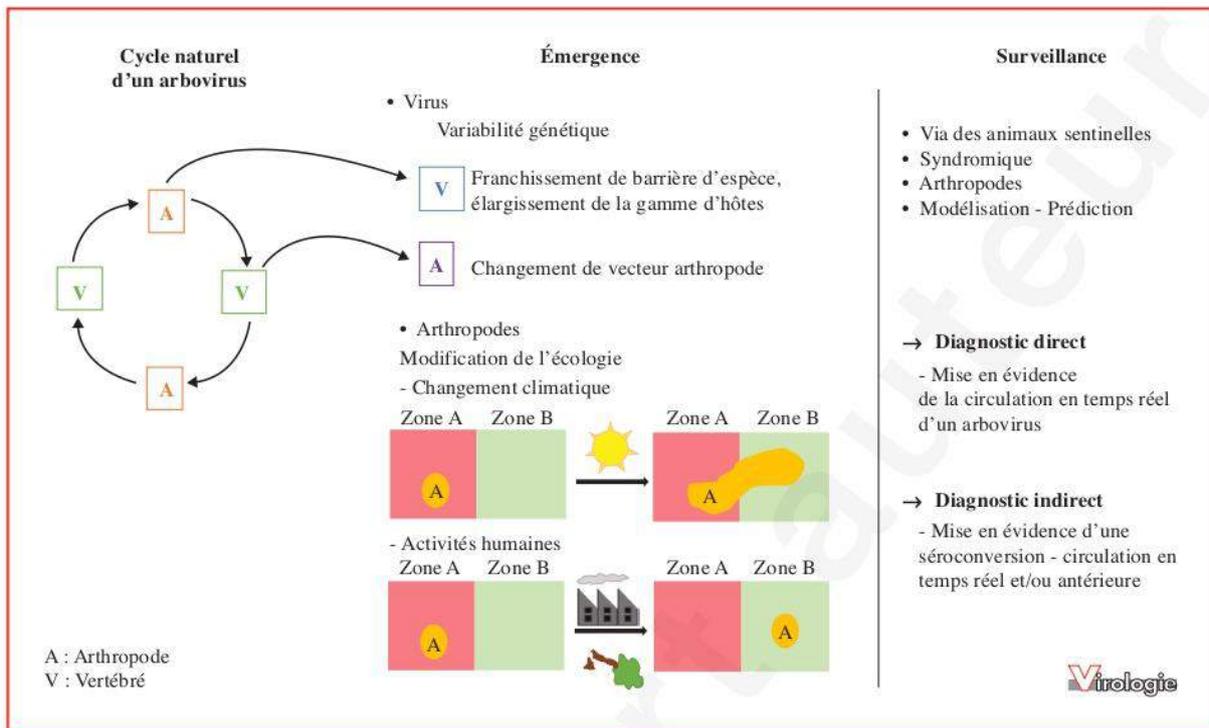


Figure 1. Schéma d'une émergence virale et des moyens mis en place pour la surveillance.

doivent, cependant, pas participer au cycle de transmission. Leur séroconversion est un signe de première alerte. En Amérique du Nord, les poules (*Gallus gallus domesticus*) sont utilisées comme sentinelles pour les virus du Nil occidental (*West Nile virus*, WNV) et de l'encéphalite équine de l'Est (EEEV) [18]. En Grèce, la séroconversion des pigeons domestiques (*Columba livia*) pour le WNV a été démontrée avant les cas humains [19]. La surveillance syndromique est également utile à la détection de signaux anormaux groupés dans l'espace et le temps. La description de signes cliniques inhabituels par les vétérinaires et les professionnels de la filière animale peut être une première indication d'une maladie émergente [20]. L'intérêt de la surveillance syndromique a été montré *a posteriori* pour plusieurs épidémies telles que celle de BTV-8 en Europe en 2006 [21] et de WNV en France en utilisant les signes neurologiques développés chez les équidés [22]. Pour le virus Schmallenberg, la baisse de production laitière a permis de mettre en évidence la circulation du virus en Belgique et aux Pays-Bas [23]. L'analyse spatiale des données issues de la surveillance syndromique, de la distribution des vecteurs et des données climatiques permet par la suite l'identification de zones hautement à risque pour des maladies vectorielles et de prédire d'éventuelles émergences [24]. Afin de prévenir l'apparition d'épidémies d'arbovirus, la surveillance de ces derniers au sein de

leurs vecteurs ou des populations animales réservoirs ou sentinelles est une stratégie clé. La figure 1 schématise les différents processus qui peuvent être à l'origine d'une émergence virale ainsi que les moyens mis en œuvre pour la surveillance des arbovirus. En Europe, la surveillance des arbovirus est active ou événementielle (anciennement dite passive). En Italie, par exemple, la surveillance active des virus transmis par les moustiques (comme le WNV) est faite par le biais de collectes d'arthropodes et de sérums d'animaux sentinelles (poules et chevaux en particulier) plusieurs fois durant la saison vectorielle (début juin à fin novembre) [25]. En France, la surveillance est, quant à elle, événementielle. Des prélèvements sont effectués sur des animaux ou individus malades lorsqu'une épizootie ou épidémie est suspectée. En cas d'émergence suspectée ou avérée, la surveillance active et la collecte d'arthropodes sont renforcées [25]. Pour les virus transmis par les tiques, la surveillance s'inscrit dans des programmes de recherche avec des collectes qui ont lieu seulement certaines années ou seulement sur certains territoires où l'on suppose que le virus circule afin de mesurer les prévalences de ces virus. La capture de tiques et hôtes réservoirs (souvent les rongeurs) demandent des efforts logistiques considérables en termes de temps de collecte et de moyen humain. De plus, la plupart des arbovirus sont des virus zoonotiques à déclaration obligatoire, cela permet de référencer pour chaque pays :

(1) le nombre de cas humains auprès des Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ou de l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC),

(2) le nombre de cas animaux auprès de l'Organisation mondiale de la santé animale (OIE) ou European Food Safety Authority (EFSA). Les déclarations des aires de répartitions des principales espèces d'arthropodes vectrices d'arbovirus sont disponibles sur le site de vectomet (<https://vectornet.ecdc.europa.eu/>).

La mise au point de techniques de dépistage performantes à grande échelle est une nécessité pour optimiser la surveillance des arbovirus. Cette revue présente un état de l'art des techniques établies pour la surveillance des arbovirus et les nouveaux outils disponibles. Ces derniers ont été principalement utilisés pour la détection des virus transmis par les moustiques et tiques mais sont, pour la plupart, applicables aux autres arthropodes. Il est à noter que les techniques utilisées pour le criblage d'arthropodes sont le plus souvent applicables aux prélèvements d'hôtes vertébrés.

## État de l'art

### Outils classiques

#### Recherche directe du virus

L'isolement viral est une technique utilisée pour la recherche directe d'un arbovirus. Cette méthode consiste à isoler et amplifier le virus à partir de prélèvements, issus de cerveau de souriceau, d'embryon de poulet ou de culture cellulaire selon le virus recherché. Des techniques moléculaires comme la *reverse transcription - (RT-) polymerase chain reaction* (PCR) et le séquençage sont ensuite utilisées pour identifier le virus [26–29]. Cependant l'isolement viral est de moins en moins utilisé car il est plus onéreux, nécessite des infrastructures de confinement de niveau 3 minimum pour la plupart des arbovirus et du personnel formé. De plus cette technique est fastidieuse et chronophage. Le résultat est obtenu en général au bout de 7 jours minimum. L'isolement viral n'est pas une technique à privilégier en cas d'épidémie où une réponse rapide est attendue. Les examens de laboratoire doivent être en lien avec les éléments cliniques et épidémiologiques. La technique la plus utilisée lors de la recherche directe d'un virus est la (RT-)PCR conventionnelle (en point final) s'appliquant sur une multitude d'échantillons : sang, liquide céphalo-rachidien (LCR), salive, écouvillon nasal, organes (cerveau, foie, rate, cœur ...) et arthropodes. La nature du prélèvement dépend bien évidemment si le diagnostic est à faire *ante* ou *post-mortem*. La (RT-)PCR conventionnelle est très couramment utilisée en laboratoire puisqu'elle est peu coûteuse, facile à réaliser et rapide. La technologie de PCR est actuellement l'outil de biologie moléculaire indispensable.

Elle est hautement sensible et spécifique, pour la détection des acides nucléiques. La PCR consiste à amplifier de l'ADN *in vitro* et se déroule en trois étapes : dénaturation de l'ADN par chauffage, hybridation des amorces sens et anti-sens aux extrémités de la séquence cible à amplifier et une élongation assurée par une ADN polymérase. Ce cycle est répété jusqu'à 50 fois. Toutefois, la PCR en point final a été, au fil des années, remplacée par la PCR en temps réel ou PCR quantitative (qPCR) en laboratoire, plus fine et plus fiable. Au cours des dernières décennies, la technique PCR a évolué, au vu de son usage, et s'est étendue de façon considérable contribuant au développement de la PCR en temps réel. Cette technique est devenue de plus en plus populaire et est basée sur la détection et la quantification d'un émetteur de fluorescence dont l'émission est directement proportionnelle à la quantité d'amplicons, augmentant ainsi la sensibilité analytique. La détection de l'amplicon peut se faire par le biais d'agents qui s'intercalent dans la double hélice d'ADN (ex: *SYBR Green I*) ou par sondes fluorescentes. Parmi les sondes, plusieurs types existent: hydrolyse de sondes (*TaqMan* [30]), hybridation de 2 sondes (*HybProbes*), balises moléculaires (*Molecular Beacons*) et amorces scorpions (*Scorpion primers*) [31, 32].

La flexibilité de la PCR en temps réel offre plusieurs possibilités telles que les tests en multiplex. Plusieurs agents pathogènes sont testés en un seul essai sur un même échantillon. Les méthodes traditionnelles moléculaires ((RT-)PCR conventionnelle, PCR nichée...) utilisent beaucoup de réactifs par réaction et sont mono-spécifiques : un seul agent pathogène est testé à la fois. Certaines infections virales ne peuvent être discriminées en se basant seulement sur les signes cliniques. ZIKV et CHIKV, par exemple, sont responsables de signes cliniques similaires chez l'Homme. De plus, plusieurs arbovirus co-circulent et sont co-endémiques sur une même zone géographique. Dans ces zones, des tests qui identifient et quantifient rapidement plusieurs virus, sont nécessaires. Selon les techniques déjà mises en place, des tests dépistent entre deux et sept virus en une seule réaction. Ces méthodes en multiplex sont utiles pour le diagnostic, le dépistage et la surveillance des arbovirus. Certains laboratoires ont mis en place des (RT-)PCR multiplex permettant la détection simultanée de plusieurs virus : CHIKV/de la dengue (DENV)/ZIKV/ de la fièvre jaune (YFV)/WNV à partir de prélèvements issus de patients, ZIKV/Spondweni (SPOV) sur des prélèvements de patients et sur des moustiques collectés, WNV/de l'encéphalite de Saint-Louis (SLEV)/de l'encéphalite équine de l'Ouest (WEEV) sur des pools de moustiques, etc [32–35]. La spécificité de cette approche offre la possibilité d'identifier les différents génotypes d'un même virus comme les six génotypes connus du virus de la fièvre hémorragique de Crimée et du Congo (CCHF) [36]. Beaucoup de ces tests utilisent des sondes *TaqMan*.

Les amorces et les sondes sont spécifiques au virus recherché. La conception de celles-ci est faite sur des régions conservées du génome, limitant ainsi les réactions croisées avec d'autres virus du même ordre, famille ou genre si ces régions sont suffisamment variables entre les espèces virales. Cependant, la variabilité génétique des arbovirus est parfois problématique, la grande spécificité des amorces et sondes ne permettant pas de détecter des mutations génétiques subtiles. Un test multiplex basé sur la technique de la (RT-)PCR permet l'identification de six genres viraux : *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus* et *Thogotovirus* [37]. La technique a d'abord été mise au point avec des cultures de virus produites en laboratoire, et son utilisation a été validée sur des échantillons de moustiques collectés. Cet outil est un test « pan-arbovirus » qui détecte et identifie des arbovirus connus dans une aire géographique et permet également la détection de nouveaux virus circulants. Des amorces universelles dégénérées sont utilisées pour reconnaître le genre viral et le virus est ensuite identifié grâce à son profil HRM (*High Resolution Melting*). L'utilisation d'intercalant est nécessaire pour l'analyse du profil HRM, le « SYTO-9 saturating intercalating dye » a été utilisé pour cette étude. La méthode a mis en évidence, au Kenya, la circulation du virus Wesselsbron, un flavivirus transmis par les moustiques et responsable de fièvre hémorragique chez l'Homme [37]. Le SYBR green est également utilisable comme intercalant pour l'analyse du profil HRM [38]. Cependant, les appareils ainsi que les réactifs permettant de faire des (RT-)PCR en temps réel représentent des investissements coûteux (prix d'un appareil PCR en temps réel ~ 20-40 k€). Tous les laborat ne peuvent pas avoir accès à ces équipements. Une étude a mis au point un essai qui est un compromis entre les anciennes méthodes de diagnostic (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*, Elisa et PCR conventionnelle) et les techniques de nouvelle génération (PCR en multiplex). Cette technique a été mise au point pour le diagnostic simultané de trois arbovirus: les virus Getah, Tahyna et de l'encéphalite japonaise (JEV). Après amplification, les produits de PCR sont purifiés, dénaturés et placés en plaque 96 puits recouverts avec de l'avidine et des sondes spécifiques aux virus recherchés, marquées à l'HRP (*horseradish peroxidase*). La révélation se fait par ajout du substrat de l'enzyme et une lecture à 450 nm dans un lecteur de plaque [39]. La sensibilité en multiplex est légèrement plus faible qu'en simplex.

La recherche directe d'un virus est parfois complexe, chez l'Homme ou l'animal. Lors d'une infection par certains virus comme ZIKV et WNV, la phase de virémie est très courte voire inexistante. ZIKV est détecté dans le sang pendant la première semaine des signes cliniques mais la fenêtre de détection est plus grande dans le sperme, le liquide amniotique, la salive et l'urine [40]. Pour les virus neurotropes, le prélèvement à privilégier est le LCR [41] ou

l'encéphale en *post-mortem* [42]. Il est donc important de prendre en considération le tropisme du virus recherché et la technique utilisée pour le choix du prélèvement. Cependant, un résultat négatif en (RT-)PCR ne signifie pas qu'il faut écarter une infection virale. À cause d'une phase de virémie très courte chez les hôtes vertébrés, d'une forte proportion de cas asymptomatiques et des difficultés à déterminer le jour exact du début des signes cliniques, la recherche directe présente de nombreuses limites.

### Recherche indirecte du virus

La recherche indirecte d'un arbovirus chez l'Homme ou l'animal se fait alors par la mise en évidence d'anticorps neutralisants ou immunoglobuline M (IgM) et/ou immunoglobuline G (IgG) spécifiques de l'arbovirus recherché. Lors d'une infection virale d'un vertébré, la première ligne de défense est l'immunité innée. L'immunité adaptative se met, ensuite, en place pour assurer l'élimination de l'agent pathogène. Au cours de cette dernière, les IgM apparaissent en premier au bout de quelques jours après l'infection et décroissent rapidement au fil des semaines voire des mois qui suivent. Les IgG apparaissent quelques jours après celle des IgM et confèrent une immunité à plus long terme. Pour une infection par le WNV, les IgM et les IgG apparaissent respectivement, en moyenne, 2 à 8 jours et 8 à 12 jours après le début des signes cliniques [43]. Le sérodiagnostic a alors une fenêtre de détection plus grande, contrairement à la recherche directe de l'agent pathogène. La visualisation des infections aiguës ou passées est alors possible et la circulation récente ou antérieure d'un arbovirus est mise en évidence. Cependant, pour certaines infections virales, le développement d'une séroconversion n'est pas systématique ou à longue durée [44, 45]. Il existe différentes techniques de sérodiagnostic : Elisa, test de l'inhibition de l'hémagglutination, immunofluorescence indirecte, séroneutralisation virale (PRNT : *plaque reduction neutralisation test*, micro-VNT : *micro-virus neutralisation test*), etc [46].

Le test de l'inhibition de l'hémagglutination (HIT) a très souvent été utilisé pour la surveillance sérologique des arbovirus. Le principe de cette technique repose sur la capacité des anticorps présents dans le sérum à inhiber l'agrégation des érythrocytes induite par le virus [47]. Les avantages de cette technique sont la rapidité de résultat (quelques heures), un coût unitaire faible et son application à des prélèvements provenant de différentes espèces animales. Cependant, l'HIT a ses limites puisqu'il ne distingue pas les isotopes d'anticorps et ne date donc pas l'infection. De plus, des réactions croisées surviennent au sein de certains sérocomplexes comme le sérocomplexe de l'encéphalite japonaise comprenant les virus WNV, JEV, de l'encéphalite de Murray Valley (MVEV), SLEV et d'Usutu (USUV). La

spécificité du test est donc diminuée, puisque dans certaines zones, les virus sont co-endémiques [46]. Par conséquent, un résultat positif avec l'HIT doit être ensuite confirmé par séroneutralisation [46, 48]. Selon l'OIE, la méthode sérologique de référence, la plus spécifique, est la séroneutralisation qui différencie notamment les infections dues à des virus appartenant à un même sérocomplexe [49]. Le principe de cette technique consiste à mettre en évidence la présence d'anticorps neutralisants dans le sérum d'un hôte vertébré *via* l'observation d'effets cytopathiques du virus sur une monocouche cellulaire. Les anticorps neutralisants inhibent une ou plusieurs étapes précoces du cycle viral (attachement du virus à la cellule, endocytose, fusion avec la membrane). La séroneutralisation donne, comme résultat, un taux d'anticorps neutralisants pour un virus donné au sein de l'hôte vertébré testé. Cette technique est standard, spécifique et peut être utilisée sur plusieurs espèces animales mais certaines réactions croisées subsistent encore. La méthode présente les mêmes désavantages que l'isolement viral (technique longue, infrastructure de confinement de niveau 3 minimum) [43, 46]. De ce fait, la séroneutralisation n'est pas un outil adéquat pour faire de la surveillance à grande échelle. Enfin, un personnel formé est nécessaire pour réaliser cette technique car l'interprétation des résultats est visuelle et subjective.

Le test sérologique le plus utilisé, de nos jours, pour mettre en évidence la séroconversion est le test Elisa, qui est un outil reproductible, rapide (résultat au bout de quelques heures) et peu coûteux. Trois techniques d'Elisa sont couramment utilisées : Elisa de compétition, Elisa IgG indirect et Elisa de capture ou MAC Elisa (capture des IgM). De plus, des kits commerciaux sont disponibles et la technique est standardisée pour beaucoup d'arbovirus [43]. La technique Elisa est une technique immuno-enzymatique qui met en évidence visuellement une réaction antigène-anticorps. Une réaction colorée est produite par l'action d'une enzyme sur son substrat, l'enzyme étant préalablement couplée à l'anticorps de révélation. Cependant, les réactions croisées sont encore problématiques avec ce type de test car la plupart reposent sur l'utilisation d'anticorps dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe, très immunogènes, pour les virus enveloppés. Afin d'augmenter la spécificité des tests Elisa, certains kits utilisent des anticorps plus spécifiques tels que ceux dirigés contre la NS1 pour les flavivirus. De plus, la capture des IgM par MAC Elisa doit être ensuite confirmée par séroneutralisation d'après le CDC pour certains virus comme ZIKV et d'autres flavivirus [50].

La recherche simultanée de plusieurs arbovirus augmenterait l'efficacité de leur diagnostic et par conséquent leur surveillance. Des tests sérologiques multiplex permettent en une seule fois de visualiser la séroconversion pour un ou plusieurs virus ou d'autres agents pathogènes. Les tests

en multiplex réduisent également les coûts par réaction. Des outils ont notamment été développés. Certains sérodiagnostics en multiplex reposent sur la technologie du Luminex, qui est un système micro-fluidique utilisant des billes sur lesquelles sont couplés des antigènes. Plusieurs billes portant des antigènes différents peuvent être utilisées en simultané. Les anticorps contenus dans le sérum vont alors se fixer sur ces antigènes. La révélation se fait par le biais d'un anticorps secondaire anti-espèce marqué et d'un fluorochrome. Les avantages que cette technique apporte, par rapport à d'autres techniques de sérodiagnostic comme le test Elisa ou la séroneutralisation, sont de tester la réactivité d'un sérum face à plusieurs antigènes en un seul essai, un résultat rapide (un jour) et le non-recours à une infrastructure de confinement de niveau 3 ou 4 [51-53]. Toutefois, des réactions croisées sont observées notamment pour les virus qui sont proches sur le plan antigénique comme les virus Louping ill et de l'encéphalite à tique (TBEV) [43]. Enfin, cette technique nécessite des investissements initiaux importants (achat de l'appareil : 40 K€). Actuellement, les méthodes utilisées pour l'identification des virus reposent pour beaucoup sur des techniques sérologiques comme les tests Elisa, la séroneutralisation ou des techniques moléculaires (PCR en temps réel). Le développement de tests en multiplex (sérologique et moléculaire), dans plusieurs laboratoires, a augmenté l'efficacité de la surveillance des arbovirus mais cela reste insuffisant, seulement quelques virus étant testés à la fois. Le dépistage à grande échelle reste limité avec ces techniques. Les techniques sérologiques montrent plus de limites dans la surveillance des arbovirus. Elles sont applicables seulement sur des échantillons de sérum de qualité issus de vertébrés supérieurs (non utilisable chez les arthropodes) et leur spécificité est parfois limitée du fait des réactions croisées qui peuvent survenir avec des virus proches d'un point de vue antigénique. Les techniques, décrites précédemment, sont toutes avec *a priori*. Les signes cliniques sont variés et similaires chez les hôtes vertébrés, y compris chez les humains. Les deux principaux syndromes sont les atteintes neurologiques et les fièvres hémorragiques. Les découvertes récentes de nouveaux arbovirus au sein des familles virales *Togaviridae*, *Flaviviridae* et *Bunyaviridae* suggèrent qu'une partie des arbovirus n'a pas encore été identifiée [54]. Ces découvertes démontrent la nécessité d'avoir des techniques de dépistage rapides et performantes des arbovirus qui facilitent l'identification et la mise en évidence de nouveaux virus à partir d'échantillons de terrain. L'approche moléculaire pour l'identification virale est alors indispensable et applicable à tout type d'échantillon (humain, animal, arthropode). Les outils classiques sont limités face à la grande variabilité et diversité des arbovirus.

## Outils de nouvelle génération

Afin d'optimiser la surveillance, il serait plus avantageux de pouvoir détecter les arbovirus au sein de leur vecteur pour avoir une image en temps réel de leur circulation. La prédiction du risque d'émergence et/ou de ré-émergence, par conséquent d'épidémie, est ainsi plus efficace. La mise en place des moyens de lutte et la gestion du risque d'épidémie seraient plus rapides et efficaces. Cependant, les prévalences des arbovirus dans leurs vecteurs arthropodes étant faibles (< 1 %), un très grand nombre d'arthropodes doit être collecté dans différents sites, puis identifié par des entomologistes, rendant ces investigations à large échelle rares [55]. Les outils de nouvelle génération répondent à plusieurs contraintes pour assurer l'efficacité de la surveillance des arbovirus : sensibilité et spécificité du test, rapidité, rentabilité, application sur différents types d'échantillons (mammifères/arthropodes) et/ou application directe sur le terrain, dépistage à très large échelle voire sans *a priori* de virus recherché.

### (RT)-LAMP

Parmi toutes les innovations pour le diagnostic moléculaire des arbovirus, la technologie LAMP (*Loop-mediated isothermal amplification*) rassemble beaucoup d'avantages : rapidité du test, très faible coût, pas d'investissements initiaux coûteux, grande spécificité, technique facile à mettre en œuvre, etc. La technologie LAMP n'est pas récente, elle a été mise au point en 2000 [56] mais ce n'est que depuis environ 10 ans qu'elle est utilisée pour la détection des arbovirus. Cette technologie permet de faire un diagnostic sensible et plus spécifique que la PCR conventionnelle en un temps très court (45 à 90 min) sans avoir à extraire les acides nucléiques au préalable. La sensibilité de la (RT)-LAMP est supérieure à celle de la PCR conventionnelle et comparable à celle de la PCR en temps réel. La sensibilité et la spécificité de la technique pour chaque virus ciblé sont détaillées dans les différentes études citées. La limite de détection de la (RT)-LAMP est de quelques copies de génome viral [56]. De plus, les équipements nécessaires pour réaliser cette technique se résument à un bain-marie, pouvant être portatif. Les techniques de PCR classique ou de PCR en temps réel demandent des équipements sophistiqués nécessitant un investissement initial coûteux et un entretien régulier. La technique de (RT)-LAMP peut représenter un substitut de la PCR dans les laboratoires à faibles moyens financiers et peut également être utilisée directement sur le terrain. Le principe de la technique repose sur l'activité de l'ADN polymérase I de la bactérie *Bacillus stearothermophilus* (Bst) qui ne nécessite pas de variation des températures

d'incubation pour l'amplification de la séquence ADN cible. Le processus est isotherme avec une température de l'ordre de 60-65 °C. Afin d'assurer la spécificité, plusieurs amorces sont utilisées, en général 2 à 3 paires d'amorces : amorces externes, amorces internes et des amorces supplémentaires permettant une amplification cyclique à partir des structures en boucle. Les différentes étapes du processus sont très bien schématisées dans l'article de T. Notomi *et al.*, 2000 [56]. La conception des amorces se fait dans les régions les plus conservées des génomes. L'alignement de différentes séquences d'un même virus est nécessaire pour visualiser ces régions conservées pour maximiser la spécificité du test. La révélation peut se faire de différentes manières : à l'œil nu grâce à un indicateur de pH (changement de couleur du mélange réactionnel) ou sous lampe UV avec l'utilisation d'un intercalant d'ADN, à la turbidité (lors de la précipitation du réactif pyrophosphate de magnésium), ou par mesure de la fluorescence dans un fluorimètre avec l'utilisation d'un intercalant d'ADN [57-59]. La révélation à l'œil nu a l'avantage d'être gratuite car elle ne nécessite pas d'équipement supplémentaire. La technique est également applicable sur des ARN viraux en utilisant une transcriptase inverse en début de réaction dans le même mélange réactionnel que l'ADN polymérase Bst [56].

L'outil a été mis au point pour le diagnostic de plusieurs agents pathogènes, y compris des arbovirus. Le développement du test pour le DENV a montré une bonne sensibilité à 95 % et une spécificité de 100 % dans des échantillons de patients. Les essais ont été conduits sur des cultures virales mais également sur des échantillons sanguins provenant de patients infectés. Aucune réaction croisée avec d'autres flavivirus n'a été détectée. La discrimination des 4 sérotypes de DENV est permise [60]. Le diagnostic de ZIKV avec cette technique est également réalisable. Des essais ont été effectués en utilisant un bain-marie portatif, une révélation à l'œil nu et en intégrant préalablement une étape de libération des acides nucléiques avec une protéolyse alcaline. La méthode est en adéquation avec une utilisation sur le terrain, dans des zones rurales endémiques sur différents types d'échantillon tels que l'urine, la salive et le sérum. De plus, la RT-LAMP du ZIKV développée lors de cette étude montre une sensibilité et une spécificité supérieures à celles retrouvées en PCR conventionnelle. La sensibilité du test est 10 à 100 fois plus élevée et la spécificité est assurée par des amorces qui reconnaissent entre 6 et 8 cibles d'une séquence génétique. L'ADN polymérase Bst est très efficace même en présence d'inhibiteurs de PCR en forte concentration dans des échantillons bruts. La technique est robuste et fiable. Son développement permet un diagnostic rapide et précoce facilitant par la suite la mise en place des mesures sanitaires adéquates et des traitements appropriés aux patients dans les zones endémiques [61]. La (RT)-LAMP est utilisable directement sur les arthropodes. Une

étude, en Australie, a mis au point la technique avec révélation par colorimétrie pour la détection et la surveillance de la souche *wMel* de la bactérie *Wolbachia* directement sur des populations de moustiques *Ae. aegypti* collectés sur le terrain [62]. En effet, la présence de *wMel Wolbachia* au sein des moustiques réduit leur infection par les virus DENV, ZIKV, CHIKV, YFV et Mayaro. La sensibilité du test est équivalente à celle retrouvée en PCR en temps réel, la technique de référence pour la détection de la souche *wMel* de *Wolbachia*. La (RT)-LAMP est alors un bon candidat, peu onéreux, pour remplacer le test en (RT)-PCR temps réel. Cependant la révélation par colorimétrie est visuelle et peut induire des biais puisqu'elle est subjective. Des résultats douteux surviennent lorsque le changement de couleur n'est pas franc mais leur fréquence reste très faible. Dans cette étude, 1 % des échantillons était concerné [62]. La (RT)-LAMP a été mise au point pour d'autres arbovirus tels que JEV sur des cultures virales, des échantillons de patients (LCR), de cerveaux de chauve-souris et de selles [63, 64]. En Californie, la surveillance efficace de WNV, SLEV et WEEV directement au sein de leurs moustiques vecteurs est possible grâce à la (RT)-LAMP. Les amorces SLEV et WEEV développées dans cette étude peuvent être combinées et ont une très grande spécificité et sensibilité [65]. La spécificité et la sensibilité qu'offre la (RT)-LAMP sont telles que la discrimination de différentes souches d'un même virus est réalisable. L'équipe d'Hayasaka *et al* a mis au point la technique pour les 3 souches de TBEV (*European, Siberian, Far Eastern*) sur des échantillons de souris infectées en laboratoire. Les auteurs ont également montré que la technique est applicable sur du sang humain et des tiques en mélangeant ces échantillons avec du virus. L'amplification du gène viral n'est pas inhibée dans ces deux types d'échantillons [66].

La technique de la (RT)-LAMP présente beaucoup d'avantages tels que la rapidité de test, une sensibilité et une spécificité équivalentes ou plus grandes qu'en PCR conventionnelle, un équipement peu onéreux (bain marie), réalisable directement sur le terrain, etc. Néanmoins, la conception des amorces et des sondes implique la disponibilité de séquences en nombre suffisant afin d'affiner au mieux la sensibilité et la spécificité de la méthode. La (RT)-LAMP permet le diagnostic d'un nombre très limité de virus à la fois. Les tests de (RT)-LAMP seraient à utiliser en ayant une idée du virus ou de la famille virale à incriminer ou bien en ayant à disposition une série d'amorces différentes pour réaliser les tests sur le terrain.

### (RT)-PCR en temps réel à haut débit

Au vu du nombre élevé d'arbovirus pathogènes pour l'humain et les animaux, de co-infections chez les

arthropodes, des interactions entre agents pathogènes, de la diffusion des vecteurs suite à l'intensification des échanges internationaux, ou encore de la modification des activités humaines et le réchauffement climatique, des nouveaux outils d'investigation à haut débit sont nécessaires voire indispensables pour assurer au mieux la surveillance des arbovirus. La (RT)-PCR en temps réel à haut débit semble être la technique qui allie les avantages des techniques multiplex et simplex : dépister plusieurs virus en un seul essai et avoir une bonne sensibilité et spécificité de test. La méthode à haut débit permet à la fois la surveillance des agents pathogènes les plus répandus et des « oubliés » ou rares, directement chez le vecteur arthropode. Le volume total d'ADN et/ou d'ARN utilisés est très faible par échantillon (1,5 à 2,7  $\mu$ L), ce qui est très avantageux pour les échantillons d'arthropodes pour lesquels habituellement un faible volume d'ADN et/ou d'ARN est disponible. Afin de réaliser une meilleure surveillance épidémiologique des agents pathogènes transmis par des arthropodes, il est nécessaire de tester un maximum d'agents en une seule fois [67]. Les travaux de Michelet *et al.* décrivent la mise au point d'un outil moléculaire haut débit, s'appuyant sur la technologie de la (RT)PCR en temps réel pour la détection des bactéries et parasites chez la tique [68]. Cette dernière est le premier vecteur d'agents pathogènes en Europe car elle peut transmettre une très grande variété d'agents (bactéries, parasites et virus) [69]. Dans l'étude, un système micro-fluidique (BioMark dynamic array system, Fluidigm) est utilisé et permet de faire en une seule fois, respectivement, 2304 et 9216 réactions en utilisant des puces 96.96 et 48.48 (nombre d'échantillons, nombre de cibles). Le volume réactionnel est très faible (6 nL, volume final par réaction individuelle) réduisant considérablement le coût par réaction (0,30 €). Les amorces et les sondes *TaqMan*, utilisées dans cette étude, ont été conçues pour chaque agent pathogène. Leur spécificité a d'abord été testée *in silico* en utilisant le logiciel *Blast* [67, 68]. La sensibilité de la technique peut être réduite du fait d'un faible volume réactionnel et d'ADN ou d'ARN par échantillon. Afin de pallier cela, une étape de pré-amplification est préalablement effectuée avec les mêmes amorces utilisées ensuite pour la PCR en temps réel [68]. Cette technique a ensuite été étendue aux virus transmis par les tiques [70], puis aux virus transmis par les moustiques [71]. Une étude menée sur 18 135 nymphes d'*Ixodes ricinus* collectées dans 13 sites européens (France, Royaume-Uni, Pays-Bas, Danemark et Suède) avait pour but de tester la présence de 21 virus transmis par les tiques et d'en estimer leur prévalence. Deux virus, Uukuniemi (UUKV) et un *Phlebovirus*, ont été détectés pour la première fois en Suède et aux Pays Bas. Le virus Eyach (EYAV), appartenant à la famille *Reoviridae* et au genre *Coltivirus*, a notamment été détecté lui aussi pour la première fois aux Pays Bas. La prévalence de virus connus chez

les populations de tiques et responsables de problèmes sanitaires a été estimée [70]. De plus, grâce à cet outil à haut débit, 64 virus transmis par les moustiques peuvent être testés/détectés sur un même moustique ou pool de moustiques en une seule fois. Une surveillance épidémiologique a été réalisée sur 17 958 moustiques collectés dans six pays (Cambodge, Sénégal, Brésil, Guyane, Guadeloupe et Suriname), incluant des pays qui sont endémiques pour certains arbovirus et d'autres qui ont connu des épidémies de ZIKV et de fièvre jaune (*yellow fever virus*, YFV). La technique à haut débit a détecté des virus endémiques (ZIKV, YFV) et un virus inattendu, le virus Trivittatus (TVTV), un orthobunyavirus [71]. Les avantages de cet outil sont variés : prix faible par réaction (0,30 €), rapidité (résultats au bout de 4 h) et la modularité et la flexibilité du système. Contrairement à d'autres tests où les cibles sont fixes, grâce à cet outil il est possible de s'adapter à différentes situations épidémiologiques et des cibles peuvent être facilement ajoutées [68, 70, 71]. Là encore l'inconvénient principal réside dans le prix de l'appareil, *i.e.* 250 k€.

Les outils de PCR haut débit peuvent également être utilisés pour une approche syndromique des infections virales chez l'humain et l'animal. Un nouvel outil de diagnostic moléculaire de (RT-)PCR en temps réel à haut débit s'appuyant sur la technologie LightCycler 1536 (Roche) a été récemment mis au point [72]. Chez les équidés, les affections nerveuses se classent au 4<sup>e</sup> rang des causes de mortalité et représentent un impact sanitaire majeur pour la filière équine [73]. Parmi les virus responsables d'encéphalites équines, les deux tiers sont zoonotiques et/ou vectorisés par des arthropodes. Le LightCycler 1536 permet la détection moléculaire d'ARN et d'ADN à haut débit. En effet, 1536 réactions de (RT-)PCR sont faites en une fois sur une seule plaque. Le volume réactionnel est faible (0,6 à 2 µL), réduisant ainsi le coût (0,065 €/réaction). Il existe une grande flexibilité dans la programmation. Il est par exemple possible de tester 32 cibles sur 48 échantillons ou encore 1536 cibles sur un seul échantillon. Le produit du nombre de cibles et du nombre d'échantillons doit faire un total de 1536 [74]. La mise au point de cet outil s'appuie sur les études de (RT-)PCR à haut débit décrites précédemment. Au cours de cette étude, la méthode a permis, en un seul essai, de détecter 28 génomes viraux et de faire la discrimination entre certaines lignées ou génotypes viraux comme pour les lignées 1 et 2 de WNV. La spécificité est correcte voire très bonne selon les couples d'amorces et sonde utilisés. Une sensibilité légèrement plus faible a été notée en comparaison avec un outil de RT-PCR en temps réel simplex. Cette diminution de sensibilité peut être expliquée par la faible quantité de matériel biologique utilisé avec le LightCycler 1536. Afin de pallier cela, une étape supplémentaire de pré-amplification pourrait être appliquée. Dans cette étude, les échantillons testés étaient des souches de références issues

de culture cellulaire, d'ADN de synthèse et des échantillons de terrain (encéphale, sang, liquide céphalorachidien, écouvillon nasal) pour lesquels l'étiologie infectieuse n'était pas toujours connue [72].

Enfin, les équipements nécessaires pour la réalisation de ces tests de (RT-)PCR en temps réel à haut débit représentent des investissements initiaux conséquents. La conception des différentes amorces et sondes implique, là aussi, que les séquences des agents pathogènes soient disponibles et en nombre suffisant. Enfin, ces techniques nécessitent un personnel formé. Il s'agit de techniques de pointe disponibles dans un nombre limité de laboratoires mais elles représentent un réel atout pour les programmes de surveillance des arbovirus. Elles permettent un dépistage à large échelle, pouvant mettre en évidence des arbovirus émergents (nouveaux foyers d'animaux malades) et par conséquent anticiper des décisions quant aux risques d'émergence dans de nouvelles aires géographiques.

## Puces à ADN

La diversité et la variabilité des arbovirus représentent une difficulté de taille pour leur détection et leur surveillance. Des puces à ADN ont été mises au point pour la détection des arbovirus au sein des arthropodes, à partir de prélèvements de mammifère, etc. Le principe de la puce à ADN repose sur l'hybridation par complémentarité entre un ADN à tester (cible) et des fragments nucléiques (sondes), fixés sur un support solide. Cette réaction permet la détection et l'identification de la ou des séquence(s) présentes dans l'échantillon, de manière très spécifique. L'analyse se fait grâce à l'acquisition d'un signal de fluorescence émis. Les hybridations spécifiques sont ainsi localisées sur la puce puisque la position des différentes sondes est connue [75]. Depuis le développement de la première puce à ADN sur membrane, tout un éventail de puces à ADN différentes a été développé : sur lame de verre, électronique, en milieu liquide, à haute densité de billes et à haute densité [75, 76]. Les puces à ADN sont à l'interface entre un diagnostic *a priori* et un diagnostic sans *a priori*. Les sondes immobilisées sur le support solide sont élaborées à partir des banques de données déjà connues et disponibles mais, du point de vue du manipulateur, le diagnostic est fait sans *a priori*. La puce à ADN a tout à fait sa place en virologie. Elle a notamment permis la caractérisation du virus SARS-CoV (*severe acute respiratory syndrome-coronavirus*) [77]. Elle permet, en outre, une approche multiplexe avec une part d'*a priori* moindre par rapport aux techniques décrites précédemment. Les puces sont construites à partir des genres viraux et/ou d'arthropodes et plusieurs genres peuvent être ajoutés. Un prototype de puce a été élaboré à partir du

gène de la protéine NS5 de 33 flavivirus, de l'ARN ribosomique de 4 genres différents de moustiques et du gène du cytochrome *b* de 8 espèces de mammifères. Les échantillons utilisés pour cette étude étaient des cultures de virus produites en laboratoire, des moustiques infectés artificiellement avec 14 virus différents et du sang de mammifères non infectés (singe, mouton, vache, chien, poule, cochon, chèvre, cheval et homme). Le prototype a identifié 13 flavivirus sur les 14 utilisés et différencié les 4 genres de moustiques (*Aedes*, *Armigeres*, *Culex* et *Mansonia*) et les différents mammifères [78]. Les travaux de Grubaugh *et al.* ont mis au point une puce à ADN pour la détection et l'identification de virus appartenant aux genres *Flavivirus*, *Alphavirus*, *Orthobunyavirus* et *Phlebovirus*. Pour cela, 3 gènes de chaque genre viral ont été utilisés. Au total 12 groupes de sondes ont été conçus, 3 pour chaque genre et des sous-groupes ont été constitués avec des sondes plus spécifiques pour les différents clades de virus. Par exemple, pour les flavivirus, le gène utilisé est celui de la NS5. Cet essai a été mené sur 20 flavivirus, 14 alphavirus, 6 phlebovirus et 12 orthobunyavirus. Les limites de détection de la puce ont été estimées en utilisant des moustiques infectés au laboratoire avec WNV et les virus Sindbis et de la fièvre de la vallée du Rift (*Rift valley fever virus*, RVFV). Tous les virus ont été détectés et la discrimination des virus proches, comme les différentes lignées de JEV et DENV, a été permise grâce à la grande spécificité de la puce. La sensibilité de la puce semble légèrement supérieure à celle de la PCR conventionnelle et de la PCR en temps réel. Cette puce à ADN a été mise au point dans le but de faire un dépistage à grande échelle dans un temps réduit. Les auteurs ont testé, en une seule expérimentation, 1445 moustiques de terrain collectés en Thaïlande avec une sensibilité comparable aux autres techniques de PCR [79].

La puce à ADN répond à plusieurs besoins en termes de surveillance des arbovirus. La technique est notamment rapide, spécifique, sensible, applicable directement sur des arthropodes et permet le dépistage d'un grand nombre de virus. Cependant, comme pour les autres techniques décrites précédemment, sa limite réside dans la disponibilité des séquences génomiques indispensables à la constitution des puces. L'identification de nouveaux virus est donc possible mais difficile. Enfin, il s'agit d'une technologie de pointe et là encore son accès est limité à certains laboratoires et son coût est conséquent.

### NGS (Next Generation Sequencing – Séquençage de nouvelle génération)

Le choix des virus à détecter dépend des signes cliniques observés chez le patient et des contextes épidémiolo-

gique et épidémique où il se trouve. Des facteurs anthropiques (urbanisation, déforestation, mondialisation : échanges internationaux...), climatiques (réchauffement climatique), biologiques (variabilité génétique des virus...) sont parfois à l'origine d'émergence d'arbovirus dans de nouvelles aires géographiques. Les techniques moléculaires en multiplex et à haut débit testent un grand nombre de virus mais ne mettent pas en évidence de nouveaux virus émergents non caractérisés. Les techniques de séquençage à haut débit (NGS) sont utilisées pour faire du diagnostic et de la surveillance sans *a priori*.

Durant la dernière décennie, les techniques NGS ont révolutionné le séquençage traditionnel. Elles ont notamment apporté, grâce à la profondeur du séquençage, plus d'informations sur la dynamique et l'écologie des communautés microbiennes au sein des arthropodes [67]. Grâce à leur développement et à la haute résolution qu'elles offrent, comprendre la complexité des espèces microbiennes et des différentes souches qui peuvent être trouvées dans un écosystème est devenu plus rapide et accessible. L'identification des différents composants d'un microbiote d'arthropode, par exemple dans les tiques, est maintenant possible [80]. Des études sur les agents pathogènes transmis par les tiques ont montré que ces derniers étaient associés à d'autres agents pathogènes, mais également à des organismes symbiotes et commensaux [81]. Les méthodes de séquençage NGS les plus utilisées sont l'Illumina et le pyroséquençage 454, appartenant aux techniques de séquençage de 2<sup>e</sup> génération. Ces deux techniques reposent sur un même principe de séquençage par synthèse. Le principe de la technique Illumina repose sur la synthèse du brin complémentaire d'ADN dénaturé en phase solide (*flow cell*). L'ADN à séquencer est fragmenté puis immobilisé sur la *flow cell* par des adaptateurs rajoutés à leurs extrémités. Une étape préalable de préparation de librairie est nécessaire afin d'ajouter ces adaptateurs de séquençage. Ils sont complémentaires aux oligonucléotides présents sur la *flow cell* et fixent les ADN. À chaque ajout d'un nucléotide complémentaire, une fluorescence est émise. La mesure de cette dernière est ensuite enregistrée et la séquence est établie [82]. Le pyroséquençage se déroule, quant à lui, en phase mobile. Les ADN amplifiés par PCR sont immobilisés sur des billes. L'ajout d'un nucléotide complémentaire émet un signal chimioluminescent qui est enregistré. La réaction de pyroséquençage fait intervenir la matrice d'ADN, des dNTP, l'ADN polymérase, l'ATP sulfurylase, la luciférine, la luciférase et l'apyrase. Du pyrophosphate est libéré et converti en ATP par l'ATP sulfurylase lors de l'incorporation d'un dNTP complémentaire. Cet ATP agit comme un catalyseur pour la luciférase qui convertit la luciférine en oxyluciférine, générant ainsi de la lumière [83]. Selon les plateformes utilisées pour les deux méthodes décrites précédemment, la capacité de

séquençage, la taille des zones de lecture et le temps d'obtention diffèrent. La technique Illumina offre une capacité de séquençage comprise entre 8 et 600 giga bases, la taille des zones de lecture entre 100 à 300 bases et le temps d'obtention d'une séquence varie entre 14 et 27 jours. Le pyroséquençage, quant à lui, a une capacité comprise entre 100 méga bases et 32 giga bases. La taille des zones de lecture est entre 100 et 700 bases et le temps d'obtention d'une séquence entre 4 h et 7 h. Pour l'analyse, l'alignement des zones de lecture génère des séquences et leurs chevauchements sont appelés *contigs*. Une séquence complète est obtenue à partir de l'assemblage de ces *contigs*. Cependant, les techniques de séquençage NGS conduisent à l'analyse d'un nombre important de petits fragments. La qualité du séquençage est dépendante de la longueur et de la continuité des *contigs* et enfin de la profondeur du séquençage qui déterminent le pourcentage de couverture de la séquence. Des trous dans les séquences obtenues peuvent être observés. L'analyse des séquences nécessitent des outils bio-informatiques performants, adaptés à l'objectif de l'étude et un personnel formé en bio-informatique.

Ces techniques NGS ont déjà fait leur preuve et mis en évidence la présence de certains virus dans de nouvelles aires géographiques ainsi que la découverte de nouveaux virus émergents. EYAV a notamment été mis en exergue au sein de tiques collectées en France dans les régions Alsace et Ardennes lors d'une étude sur le virome de la tique la plus présente en Europe, *Ixodes ricinus*. Le séquençage a été effectué avec le séquenceur Illumina HiSeq2000. Les *contigs* obtenus (395 pour les échantillons d'Alsace et 150 pour ceux des Ardennes) ont révélé la présence de différents virus appartenant à différents genres viraux tels que *Nairovirus*, *Phlebovirus*, *Orthobunyavirus*, *Coltivirus*, *Vesiculovirus*, *Sigmavirus*, etc. Parmi les *contigs*, 19 correspondaient aux 12 segments d'un génome viral appartenant au genre *Coltivirus*. EYAV a été isolé à partir d'une tique et dans le cerveau d'un souriceau *Interferon- $\alpha/\beta$  receptor* (IFNAR<sup>-/-</sup>) pour la première fois en France. Une prévalence pour ce virus de 0,35 % à 5,26 % a été observée au sein des tiques collectées selon leur stade (larves, nymphes et adultes). Cette étude a également mis en évidence la présence de deux nouveaux virus : un *Nairovirus* et un *Phlebovirus* mais qui n'ont pu être isolés [84]. La technique de séquençage NGS haut débit représente un outil moderne pour la surveillance des arbovirus au sein de leurs vecteurs arthropodes. Elle peut être combinée avec l'attribution de codes-barres (*barcoding*) moléculaire. Le procédé de *metabarcoding* a un champ d'application très large et peut être notamment utilisé pour la surveillance des vecteurs arthropodes. Le séquençage simultané d'un très grand nombre d'échantillons est possible. L'équipe de Batovska *et al.* a mis au point le

*metabarcoding* pour la surveillance des moustiques et du virus *Ross river* (RRV) en Australie. Dans cette étude, le *metabarcoding* identifie les 3 espèces de moustiques (collectés sur terrain) utilisées pour l'étude : *Aedes campitorhynchus*, *Anopheles annulipes* et *Aedes notoscriptus*. L'identification des différentes espèces de moustiques et de RRV se base, respectivement, sur la sous-unité I de la cytochrome c oxydase (COI) et le gène de la glycoprotéine E2. Après amplification de ces gènes d'intérêt, des séquences de codes-barres (*barcodes*) sont ajoutées aux ADNc obtenus. Le séquençage a ensuite été effectué avec un séquenceur MiSeq illumina. La sensibilité de la technique est telle que RRV a été détecté dans un pool contenant 1 000 moustiques avec seulement un moustique infecté [85].

Les techniques NGS sont en perpétuelle évolution, la 3<sup>e</sup> génération de séquençage est dorénavant disponible. Contrairement au séquençage de 2<sup>e</sup> génération, la 3<sup>e</sup> génération ne nécessite pas d'étape d'amplification de l'ADN ou de l'ARN ou d'étape de rétro-transcription pour les ARN. Il existe 3 technologies de séquençage mises au point : *via* des nanopores par détection des bases successives d'une molécule d'ADN (lecture directe), en temps réel avec synthèse du brin d'ADN complémentaire par le biais d'une polymérase et basée sur des techniques de microscopie [86]. Le séquençage de 3<sup>e</sup> génération a déjà sa place dans le domaine de la virologie. Il a notamment été utilisé pour la surveillance du virus Ebola avec la technologie du MinION (séquençage par nanopores) [87]. Son format aussi grand qu'une clé USB et sa lecture directe, sans étape de pré-amplification au préalable, offrent la possibilité de l'utiliser directement sur le terrain. Le séquençage se fait au niveau de nanopores protéiques placés sur une membrane présentant une résistance électrique. Ces nanopores sont traversés par un courant ionique. Lorsque des acides nucléiques passent dans le nanopore, ce courant est perturbé. La perturbation est caractéristique d'une base et la séquence est établie à partir de son enregistrement [88]. Le MinION est déjà utilisé pour la surveillance de certains arbovirus comme RRV. Ce virus a pu être détecté et identifié à partir d'un seul moustique infecté [89]. Le séquençage haut débit a permis de faire un bond en avant en termes de surveillance des arbovirus. Les 2<sup>e</sup> et 3<sup>e</sup> générations de séquençage permettent en un temps record d'obtenir des séquences de génomes complets à la fois de virus mais également d'arthropodes. Les génomes complets de beaucoup d'arthropodes vecteurs sont dorénavant disponibles sur des bases de données comme VectorBase (<https://www.vectorbase.org/>) ou bien InsectBase [90]. De ce fait, l'analyse de séquences est plus rapide et optimisée, la différenciation entre séquences attendues ou non est possible, ce qui permet de faire un tri plus rapide et de retirer les séquences « exogènes » dans les analyses.

Tableau 1 Récapitulatif des différentes méthodes de diagnostic des arbovirus.

| Recherche directe ou indirecte | Méthodes de diagnostic            | Nombre d'agents pathogènes recherchés par expérimentation | Temps d'obtention du résultat | Circulation en cours ou antérieure de ou des agents pathogènes | Principaux avantages  | Principaux inconvénients   | Prix par réaction / Prix appareil |
|--------------------------------|-----------------------------------|---|-------------------------------|--|---|--|-----------------------------------|
| Indirecte                      | Séroneutralisation                | 1   | ≤ 7 jours                     | Antérieure   | Spécificité, sensibilité, technique de référence  | Chronophage, fastidieux, laboratoire confiné de niveau 3 ou 4, personnel formé, réactions croisées pour certains virus | €/€                               |
|                                | Elisa                             | 1   | 3-20 h                        | Antérieure ou en cours   | Sensibilité, reproductibilité, analyses à haut débit  | Réactions croisées   | €/€/€                             |
|                                | HIT                               | 1   | 1-3 h                         | Antérieure   | Rapidité  | Réactions croisées   | €/€                               |
| Directe                        | Immuno-essai multiplex sur billes | 500   | 1 jour                        | Antérieure   | Sensibilité, spécificité (selon les antigènes choisis)  | Investissement initial conséquent  | €/€/€€                            |
|                                | Isolement viral                   | 1   | 7 jours minimum               | En cours   | Spécificité, isolat viral disponible pour une caractérisation de ses propriétés   | Chronophage, fastidieux, laboratoire confiné de niveau 3 ou 4, personnel formé   | €/€                               |
|                                | (RT-) PCR conventionnelle         | 1   | 3 à 4 h                       | En cours   | Spécificité   | Personnel formé  | €/€/€                             |
|                                | (RT-) PCR multiplex               | Plus de 5 cibles par puits                                | 3 à 4 h                       | En cours   | Spécificité, sensibilité, détection à large spectre, rapidité   | Investissement initial conséquent, personnel formé   | €/€/€€                            |
|                                | (RT-) LAMP                        | 1   | 45 à 90 min                   | En cours   | Sensibilité, spécificité, rapidité, faible coût, reproductibilité, équipement simple, utilisable directement sur le terrain | Disponibilité des séquences limités pour le design des amorces   | €/€                               |
|                                | (RT-) PCR à haut débit            | 96 à 1536 selon l'appareil                                | 3 à 4 h                       | En cours   | Spécificité, sensibilité, détection à très large spectre, rapidité  | Investissement initial conséquent, personnel formé   | €/€/€€                            |
|                                | Puce à ADN                        | Illimité  | 20-24 h                       | En cours   | Spécificité, sensibilité, rapidité, détection à très large spectre  | Investissement initial conséquent, personnel formé   | €/€/€/€€                          |
|                                | Séquençage NGS                    | Illimité  | 4 h à 14 jours                | En cours   | Diagnostic sans <i>a priori</i> , sensibilité, spécificité  | Investissement initial conséquent, personnel formé   | €/€/€/€€                          |

## Enjeux majeurs pour les prochaines décennies

Dans cette revue, les outils classiques et de nouvelle génération, utilisés pour la surveillance des arbovirus, ont été décrits et sont applicables de manière générale en virologie. Le *tableau 1* les résume et la *figure 2* représente la prise en charge d'un échantillon selon sa nature. Au vu du nombre d'arbovirus déjà identifiés et de leur grande variabilité génétique, il est nécessaire voire indispensable d'avoir des outils ayant une grande flexibilité pour leur surveillance. Les virus ont de grandes capacités d'adaptation qui leur permettent d'émerger dans de nouvelles zones géographiques et/ou de franchir les barrières d'espèces. Au fil des décennies, la surveillance des arbovirus a considérablement évolué grâce à toutes les technologies innovantes qui ont vu le jour. Les techniques sont aujourd'hui plus spécifiques, sensibles et rapides (*figure 3*). De plus, le coût par réaction est maintenant très faible, offrant la possibilité de tester un grand nombre d'échantillons. Certaines techniques sont directement utilisables sur le terrain, d'autres permettent de balayer un éventail très large d'arbovirus au sein d'un seul arthropode ou encore de tester sans *a priori* dans le but de mettre en évidence de nouveaux arbovirus émergents. Les techniques moléculaires sont maintenant très performantes, les rendant incontournables et indispensables pour la surveillance des arbovirus. Elles ont également l'avantage d'être utilisables directement sur les vecteurs arthropodes,

permettant de prédire et d'alerter quant à une éventuelle épidémie. Beaucoup de ces techniques ont été mises au point avec, comme matériel biologique, des moustiques et des tiques mais elles sont applicables sur d'autres vecteurs tels que les mouches du genre *Culicoides* et les phlébotomes. Un accès aux techniques innovantes et rapides comme la LAMP pour tous les laboratoires, en particulier dans les zones endémiques pour certains virus représentant des risques sanitaires importants, améliorerait considérablement la rapidité de gestion des épidémies et permettrait, en conséquence, de donner le traitement le plus approprié aux patients. Des kits commerciaux pour la détection rapide de certains arbovirus existent déjà sur le marché. Par exemple, le kit SD Bionline Dengue Duo (Standard Diagnostics, Corée du Sud) permet, en une quinzaine de minutes, la détection simultanée du DENV ainsi que les IgM et IgG associés. Ce test est un dosage immuno-chromatographique, les échantillons qui peuvent être utilisés sont le sang total, le sérum et le plasma [91]. Malheureusement ces types de kits rapides adaptables au terrain, bien qu'ils soient très utiles en épidémiologie, ne détecteront pas un nouveau virus émergent.

Toutes les techniques de nouvelle génération ne sont malheureusement pas utilisées de manière uniforme sur l'ensemble du globe. La standardisation de ces techniques dans des laboratoires de référence régionaux serait un avantage pour une surveillance plus efficace. Pour les technologies de pointe telles que les PCR en multiplex, à haut

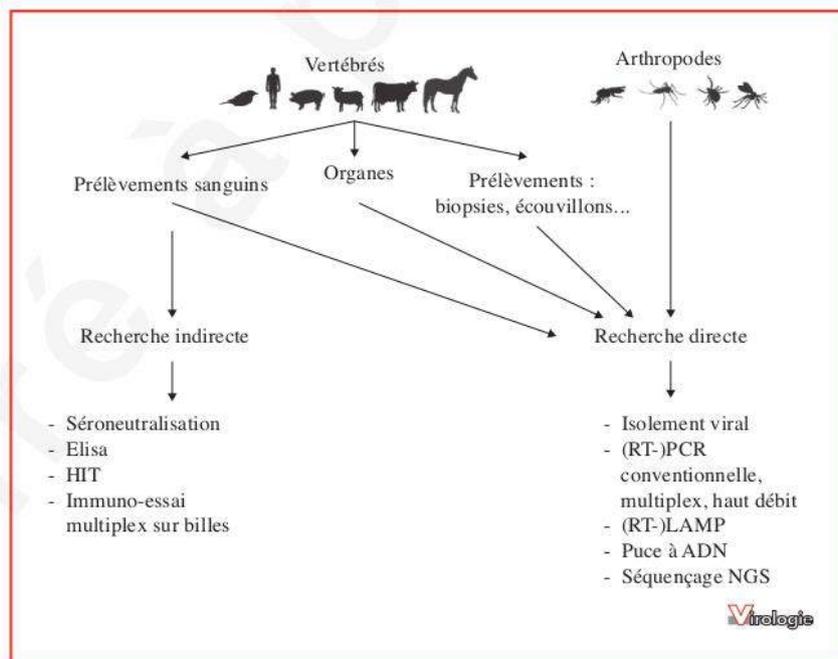


Figure 2. Prise en charge de l'échantillon selon sa nature lors d'un dépistage d'un ou des arbovirus.

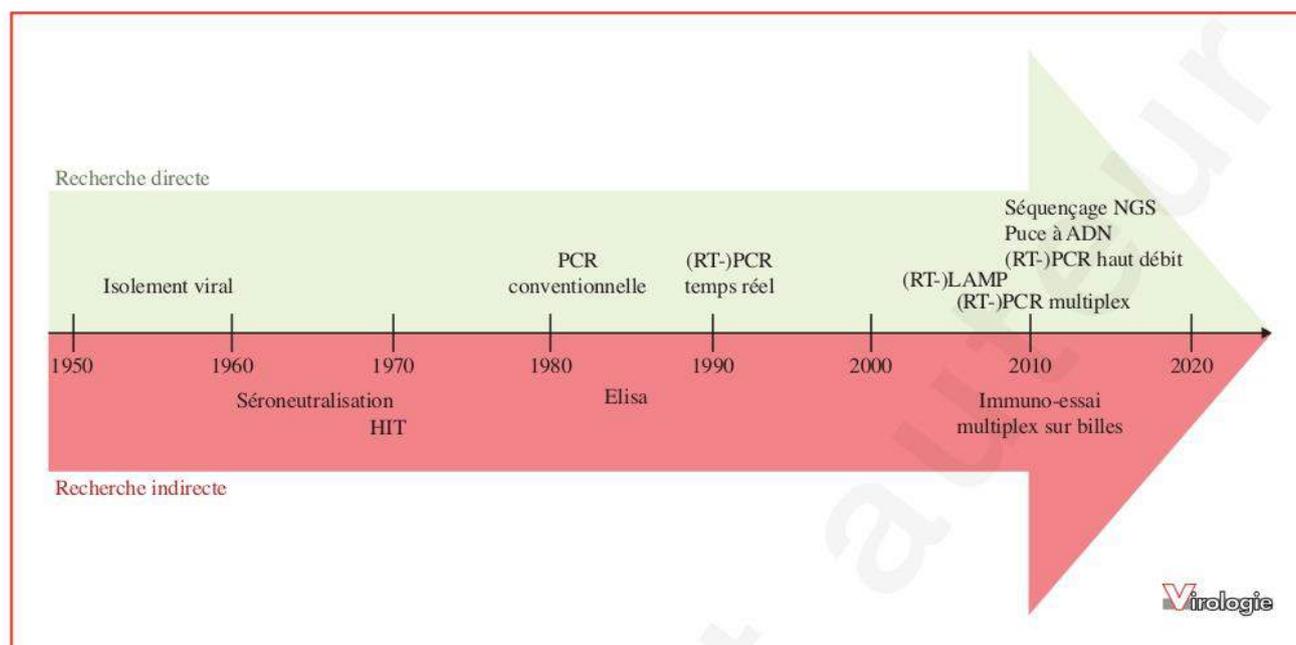


Figure 3. Représentation chronologique du développement des grands outils utilisés pour la détection des arbovirus.

débit ou bien de séquençage, il serait préférable de privilégier des centres experts pour maintenir un niveau d'analyse suffisant. De plus, ces technologies représentent des investissements initiaux colossaux pour certains laboratoires. C'est pourquoi, il serait recommandé d'identifier des lieux stratégiques où la surveillance est plus que nécessaire pour implanter ces technologies *via* des plateformes et ainsi optimiser le transport des échantillons collectés sur le terrain. La plupart des arbovirus nécessitent des structures de confinement de niveau 3 pour être manipulés. De ce fait le transport d'échantillons potentiellement infectés représentent un risque biologique important et ils doivent être congelés pour leur bonne conservation. Toutes les procédures mises en place représentent des coûts importants et des charges de travail en plus. Ainsi, des protocoles d'envoi d'échantillons doivent être élaborés pour simplifier le transport de ces échantillons vers les centres de référence. Un protocole a notamment été mis en place pour le transport d'échantillons potentiellement infectés par le virus de la fièvre aphteuse [92]. Le virus est alors inactivé sur « un dispositif d'écoulement latéral » après un traitement à l'acide citrique à 0,2 %. La détection et le typage du virus après cette inactivation sont toujours possibles. De ce fait, tous risques biologiques sont écartés et les procédures d'envoi allégées [92]. Un autre système a été mis au point pour faciliter le stockage et le transport d'ARN: la carte *Flinders Technology Associates* (FTA). Les virus sont inactivés et les ARN libérés sont fixés et préservés sur une matrice. L'utilisation de cette carte a notamment été validée avec des moustiques infectés

collectés sur le terrain [93]. Toutes ces améliorations de stockage, de transport et de préservation des échantillons augmentent également l'efficacité de la surveillance des arbovirus.

**Liens d'intérêt :** Les auteurs déclarent ne pas avoir de lien d'intérêt en rapport avec cet article.

## Références

1. Kuno G, Chang G. Biological transmission of arboviruses: reexamination of and new insights into components, mechanisms, and unique traits as well as their evolutionary trends. *Clinical Microbiology Reviews* 2005 ; 18(4) : 608-37.
2. Karabatsos N. *International catalogue of arboviruses, including certain other viruses of vertebrates*. 3rd, editor. San Antonio, Texas: American Society of Tropical Medicine and Hygiene for The Subcommittee on Information Exchange of the American Committee on Arthropod-borne Viruses;1985.
3. Weaver SC, Costa F, Garcia-Blanco MA, Ko AI, Ribeiro GS, Saade G, *et al*. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. *Antiviral Research* 2016 ; 130 : 69-80.
4. Weaver SC, Forrester NL. Chikungunya: Evolutionary history and recent epidemic spread. *Antiviral Research* 2015 ; 120 : 32-9.
5. Rushton J, Lyons N. Economic impact of Bluetongue: a review of the effects on production. *Veterinaria italiana* 2015 ; 51 : 401-6.
6. Rodhain F. Le fonctionnement des systèmes virus-vecteurs. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale* 1991 ; 71 : 189-99.
7. Weaver SC, Barrett ADT. Transmission cycles, host range, evolution and emergence of arboviral disease. *Nature Reviews Microbiology* 2004 ; 2 : 789-801.

8. Caron M, Paupy C, Grard G, Becquart P, Mombo I, Nso BBB, *et al.* Recent introduction and rapid dissemination of chikungunya virus and dengue virus serotype 2 associated with human and mosquito coinfections in gabon, central africa. *Clinical Infectious Diseases* 2012; 55: 45-53.
9. Gould EA, Higgs S. Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *TRANSACTIONS OF THE ROYAL SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE AND HYGIENE* 2009; 103: 109-21.
10. Gould EA, Pettersson J, Higgs S, Charrel R, de Lamballerie X. Emerging arboviruses: Why today? *One Health* 2017; 4: 1-13.
11. Kamal M, Kenawy MA, Rady MH, Khaled AS, Samy AM. Mapping the global potential distributions of two arboviral vectors *Aedes aegypti* and *Ae. Albopictus* under changing climate. *PLoS ONE* 2018; 13: 1-21.
12. Durand B, Lecollinet S, Beck C, Martínez-López B, Balenghien T, Chevalier V. Identification of Hotspots in the European Union for the Introduction of Four Zoonotic Arboviruses by Live Animal Trade. *PLoS ONE* 2013; 8: 1-16.
13. Drake JW. Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 2006; 90: 4171-5.
14. Domingo E, Perales C. Quasispecies and virus. *European Biophysics Journal* 2018; 47: 443-57.
15. Manrubia SC, Escarmís C, Domingo E, Lázaro E. High mutation rates, bottlenecks, and robustness of RNA viral quasispecies. *Gene* 2005; 347: 273-82.
16. Forrester NL, Guerbois M, Seymour RL, Spratt H, Weaver SC. Vector-Borne Transmission Imposes a Severe Bottleneck on an RNA Virus Population. *PLoS Pathogens* 2012; 8(9): e1002897.
17. Tsetsarkin KA, Vanlandingham DL, McGee CE, Higgs S. A single mutation in Chikungunya virus affects vector specificity and epidemic potential. *PLoS Pathogens* 2007; 3: 1895-906.
18. Loftin KC, Diallo AA, Herbert MW, Phaltankar PG, Yuan C, Grefe N, *et al.* Five-year surveillance of West Nile and eastern equine encephalitis viruses in Southeastern Virginia. *Journal of Environmental Health* 2006; 68: 33-40.
19. Chaintoutis SC, Dovas CI, Papanastassopoulou M, Gewehr S, Danis K, Beck C, *et al.* Evaluation of a West Nile virus surveillance and early warning system in Greece, based on domestic pigeons. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases* 2014; 37: 131-41.
20. May L, Chretien JP, Pavlin JA. Beyond traditional surveillance: Applying syndromic surveillance to developing settings-opportunities and challenges. *BMC Public Health* 2009; 9: 1-11.
21. Elbers ARW, Backx A, Mintiens K, Gerbier G, Staubach C, Hendrickx G, *et al.* Field observations during the Bluetongue serotype 8 epidemic in 2006. II. Morbidity and mortality rate, case fatality and clinical recovery in sheep and cattle in the Netherlands. *Preventive Veterinary Medicine* 2008; 87: 31-40.
22. Faverjon C, Vial F, Andersson MG, Lecollinet S, Leblond A. Early detection of West Nile virus in France: Quantitative assessment of syndromic surveillance system using nervous signs in horses. *Epidemiology and Infection* 2017; 145: 1044-57.
23. Veldhuis A, Brouwer-Middeltesch H, Marceau A, Madouasse A, Van der Stede Y, Fourichon C, *et al.* Application of syndromic surveillance on routinely collected cattle reproduction and milk production data for the early detection of outbreaks of Bluetongue and Schmallenberg viruses. *Preventive Veterinary Medicine* 2016; 124: 15-24.
24. Thompson PN, Etter E. Epidemiological surveillance methods for vector-borne diseases. *Revue Scientifique et Technique* 2015; 34: 235-47.
25. Johnson N, de Marco MF, Giovannini A, Ippoliti C, Danzetta ML, Svartz G, *et al.* Emerging mosquito-borne threats and the response from European and Eastern Mediterranean countries. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2018; 15(12): 2775.
26. Tesh RB. A Method for the Isolation and Identification of Dengue Viruses, using Mosquito Cell Cultures. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1979; 28: 1053-9.
27. Lwande OW, Lutomiah J, Obanda V, Gakuya F, Mutisya J, Mulwa F, *et al.* Isolation of tick and mosquito-borne arboviruses from ticks sampled from livestock and wild animal hosts in Ijara District, Kenya. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases* 2013; 13: 637-42.
28. Clavijo A, Heckert RA, Dulac GC, Afshar A. Isolation and identification of bluetongue virus. *Journal of Virological Methods* 2000; 87: 13-23.
29. David-West TS. Method for accelerated identification of arboviruses after inoculation of mice. *Applied microbiology* 1972; 23: 437-40.
30. Collot S, Alain S, Denis F, Ranger-Rogez S. Quantification par PCR en temps réel, technologie TaqMan et applications en virologie. *Virologie* 2001; 5 (6): 439-48.
31. Tse C, Capeau J. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Annales de Biologie Clinique* 2003; 61: 279-93.
32. Poitras E, Houde A. La PCR en temps réel: principes et applications. *Reviews in Biology and Biotechnology* 2002; 2: 2-11.
33. Brault AC, Fang Y, Reisen WK. Multiplex qRT-PCR for the detection of western equine encephalomyelitis, St. Louis encephalitis, and west nile viral RNA in mosquito pools (diptera: Culicidae). *Journal of Medical Entomology* 2015; 52: 491-9.
34. Colombo TE, Versiani AF, Dutra KR, Rubiato JGD, Galvão TM, Negri Reis AF, *et al.* Performance of CDC Triplex qPCR during a dengue outbreak in Brazil. *Journal of Clinical Virology* 2019; 121: 104208. doi: 10.1016/j.jcv.2019.104208.
35. Liu SQ, Li X, Deng CL, Yuan ZM, Zhang B. Development and evaluation of one-step multiplex real-time RT-PCR assay for simultaneous detection of Zika virus and Chikungunya virus. *Journal of Medical Virology* 2018; 90: 389-96.
36. Rademan R, Markotter W, Paweska JT, Jansen van Vuren P. Multiplex real-time RT-PCR for detection and distinction of Spodweni and Zika virus. *Journal of Virological Methods* 2019; 266: 72-6.
37. Sas MA, Vina-Rodriguez A, Mertens M, Eiden M, Emmerich P, Chaintoutis SC, *et al.* A one-step multiplex real-time RT-PCR for the universal detection of all currently known CCHFV genotypes. *Journal of Virological Methods* 2018; 255: 38-43.
38. Villinger J, Mbaya MK, Ouso D, Kipanga PN, Lutomiah J, Masiga DK. Arbovirus and insect-specific virus discovery in Kenya by novel six genera multiplex high-resolution melting analysis. *Molecular Ecology Resources* 2017; 17: 466-80.
39. Naze F, Le Roux K, Schuffenecker I, Zeller H, Staikowsky F, Grivard P, *et al.* Simultaneous detection and quantitation of Chikungunya, Dengue and West Nile viruses by multiplex RT-PCR assays and Dengue virus typing using High Resolution Melting. *Journal of Virological Methods* 2009; 162: 1-7.
40. Dong D, Fu SH, Wang LH, Lv Z, Li TY, Liang GD. Simultaneous detection of three arboviruses using a triplex RT-PCR enzyme hybridization assay. *Virologica Sinica* 2012; 27: 179-86.
41. Ohst C, Saschenbrecker S, Stiba K, Steinhagen K, Probst C, Radzinski C *et al.* Reliable Serological Testing for the Diagnosis of Emerging Infectious Diseases. In: Vasudevan SG, editor. *Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies*. Hilgenfeld ed. Singapore: Springer Singapore; 2018. p. 265-76.
42. Ferese R, Scorzolini L, Campopiano R, Albano V, Griguoli AM, Giardina E, *et al.* PCR-based approach for qualitative molecular analysis of six neurotropic pathogens. *Acta Virologica* 2017; 61: 273-9.
43. Tritz P, Leblond A, Pronost S, Couplier M, Levy M, Lecollinet S. Diagnostic différentiel épidémiologique et de laboratoire des affections nerveuses d'origine infectieuse. *Pratique Vétérinaire Équine* 2014; N° Spécial: 68-76.

44. Beck C. *Nouvelles stratégies diagnostiques et thérapeutiques contre les flavivirus neurotropes en médecine vétérinaire*. Paris-Saclay : Maisons-Alfort, 2017.
45. Rossi SL. West Nile Virus. *Clinics in Laboratory Medicine* 2010 ; 30 : 47-65.
46. Kuno G. Persistence of arboviruses and antiviral antibodies in vertebrate hosts: its occurrence and impacts. *Reviews in Medical Virology* 2001 ; 11 : 165-90.
47. Beck C, Jimenez-Clavero MA, Leblond A, Durand B, Nowotny N, Leparac-Goffart I, et al. Flaviviruses in Europe: Complex circulation patterns and their consequences for the diagnosis and control of West Nile disease. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 2013 ; 10 : 6049-83.
48. Clarke DH, Casals J. Techniques for hemagglutination and hemagglutination-inhibition with arthropod-borne viruses. *American Journal of Public Health and the Nations Health* 1958 ; 7 : 561-73.
49. Sukhavachana P, YUILL TM, Russell PK. Assay of arbovirus neutralizing antibody by micro methods. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* 1969 ; 63 : 1969.
50. OIE. *Manuel des tests de diagnostic et des vaccins pour les animaux terrestres 2019*. Paris 2019 [updated 26/06/2019; cited 2020 24/08/2020]; 8. [Available from: <https://www.oie.int/fr/normes/manuel-terrestre/acces-en-ligne/>].
51. CDC, editor. Zika MAC-ELISA 2018.
52. Rogier EW, Moss DM, Mace KE, Chang M, Jean SE, Bullard SM, et al. Use of bead-based serologic assay to evaluate chikungunya virus epidemic, Haiti. *Emerging Infectious Diseases* 2018 ; 24 : 995-1001.
53. Beck C, Desprès P, Paulous S, Vanhomwegen J, Lowenski S, Nowotny N et al. A High-Performance Multiplex Immunoassay for Serodiagnosis of Flavivirus-Associated Neurological Diseases in Horses. *BioMed Res Int* 2015 ; 2015 : 678084.
54. Beck C, Leparac-Goffart I, Desoutter D, Debergé E, Bichet H, Lowenski S, et al. Serological evidence of infection with dengue and Zika viruses in horses on French Pacific Islands. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2019 ; 13 : 1-14.
55. Junglen S, Drosten C. Virus discovery and recent insights into virus diversity in arthropods. *Current Opinion in Microbiology* 2013 ; 16 : 507-13.
56. Vecteurs CNdEsI, editor. *Surveillance et contrôle des Culicoides vecteurs de fièvre catarrhale du mouton en France métropolitaine* 2012; Montpellier.
57. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Research* 2000 ; 28(12) : E63.
58. Mori Y, Nagamine K, Tomita N, Notomi T. Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2001 ; 289 : 150-4.
59. Tomita N, Mori Y, Kanda H, Notomi T. Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nature Protocols* 2008 ; 3 : 877-82.
60. Lopez-Jimena B, Wehner S, Harold G, Bakheit M, Frischmann S, Bekaert M, et al. Development of a single-tube one-step RT-LAMP assay to detect the Chikungunya virus genome. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2018 ; 12 : 1-14.
61. Lopez-Jimena B, Bekaert M, Bakheit M, Frischmann S, Patel P, Simon-Lorière E, et al. Development and validation of four one-step real-time RT-LAMP assays for specific detection of each dengue virus serotype. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2018 ; 12 : 1-22.
62. Wang X, Yin F, Bi Y, Cheng G, Li J, Hou L, et al. Rapid and sensitive detection of Zika virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Journal of Virological Methods* 2016 ; 238 : 86-93.
63. Gonçalves DDS, Hooker DJ, Dong Y, Baran N, Kyrylos P, Iturbe-Ormaetxe I, et al. Detecting wMel Wolbachia in field-collected *Aedes aegypti* mosquitoes using loop-mediated isothermal amplification (LAMP). *Parasites and Vectors* 2019 ; 12 : 1-5.
64. Chen Z, Liao Y, Ke X, Zhou J, Chen Y, Gao LL, et al. Comparison of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification, conventional PCR and real-time PCR assays for Japanese encephalitis virus. *Molecular Biology Reports* 2011 ; 38 : 4063-70.
65. Parida MM, Santhosh SR, Dash PK, Tripathi NK, Saxena P, Ambuj S, et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid and real-time detection of Japanese encephalitis virus. *Journal of Clinical Microbiology* 2006 ; 44 : 4172-8.
66. Wheeler SS, Ball CS, Langevin SA, Fang Y, Coffey LL, Meagher RJ. Surveillance for western equine encephalitis, St. Louis encephalitis, and West Nile viruses using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE* 2016 ; 11 : 1-17.
67. Hayasaka D, Aoki K, Morita K. Development of simple and rapid assay to detect viral RNA of tick-borne encephalitis virus by reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification. *Virology Journal* 2013 ; 10 : 1.
68. Cabezas-Cruz A, Pollet T, Estrada-Peña A, Allain E, Bonnet SI, Moutailler S. Handling the Microbial Complexity Associated with Ticks. In: Abubaka M, Kanchana Perera P, editors. *Ticks and tick-borne pathogens*. London: IntechOpen, 2019.
69. Michelet L, Delannoy S, Devillers E, Umhang G, Aspan A, Juremalm M, et al. High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2014 ; 4 : 1-13.
70. Bonnet S, George J-C, Boulanger N. L'interface tique-hôte et la transmission des pathogènes. In: IRD, editor. *Tiques et maladies à tiques*. Marseille 2015. p. 165-91.
71. Gondard M, Michelet L, Nisavanh A, Devillers E, Delannoy S, Fach P, et al. Prevalence of tick-borne viruses in *Ixodes ricinus* assessed by high-throughput real-time PCR. *Pathogens and Disease* 2018 ; 76 : 1-13.
72. Moutailler S, Yousfi L, Mousson L, Devillers E, Vazeille M, Vega-Rúa A, et al. A new high-throughput tool to screen mosquito-borne viruses in Zika virus endemic/epidemic areas. *Viruses* 2019 ; 11.
73. Migné C, Delannoy S, Lecollinet S, Gaudaire D, Tapprest J, Yousfi L et al., editors. *Amélioration du diagnostic des encéphalites virales équine*. Congrès: Journées sciences et innovations équines JSIE, Ifce, Saumur (France), 23 et 24 mai 2019; 2019; Saumur, France: Le Pin au Haras: IFCE.
74. Lecollinet S, Pronost S, Couplier M, Beck C, Gonzalez G, Leblond A, et al. *Viral equine encephalitis, a growing threat to the horse population in Europe?* *Viruses* 2019 ; 12 : E23.
75. ROCHE. LightCycler 1536 System.
76. Berthet N, Leclercq I, Vallaëys T, Gessain A, Manuguerra JC. Les puces à ADN en virologie: concepts de base et applications pour la détection des virus. *Virologie* 2013 ; 17 : 61-80.
77. Berthet N. La puce à ADN de reséquençage: un outil rapide pour mieux identifier et comprendre une émergence virale et bactérienne. *Bulletin de l'Académie Nationale de Médecine* 2013 ; 197 : 1669-82.
78. Wang D, Urisman A, Liu YT, Springer M, Ksiazek TG, Erdman DD, et al. Viral discovery and sequence recovery using DNA microarrays. *PLoS Biology* 2003 ; 1(2) : 257-60.
79. Grubaugh ND, Petz LN, Melanson VR, McMenamy SS, Turell MJ, Long LS, et al. Evaluation of a field-portable DNA microarray platform and nucleic acid amplification strategies for the detection of arboviruses, arthropods, and bloodmeals. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2013 ; 88 : 245-53.

80. Grubaugh ND, McMenamy SS, Turell MJ, Lee JS, Multi-Gene Detection JS. Identification of Mosquito-Borne RNA Viruses Using an Oligonucleotide Microarray. *PLoS Neglected Tropical Diseases* 2013 ; 7(8) : e2349.
81. Carpi G, Cagnacci F, Wittekindt NE, Zhao F, Qi J, Tomsho LP, *et al.* Metagenomic profile of the bacterial communities associated with Ixodes ricinus ticks. *PLoS ONE* 2011 ; 6(10) : e25604.
82. Bonnet SI, Binetruy F, Hernández-Jarguín AM, Duron O. The tick microbiome: Why non-pathogenic microorganisms matter in tick biology and pathogen transmission. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 2017 ; 7 : 1-14.
83. Illumina, Illumina sequencing Technology, 2010. [Online]. Available: [https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight\\_sequencing.pdf](https://www.illumina.com/documents/products/techspotlights/techspotlight_sequencing.pdf). [Accessed: 29-Jul-2020].
84. Cummings PJ, Ahmed R, Durocher JA, Jessen A, Vardi T, Obom KM. Pyrosequencing for Microbial Identification and Characterization. *J Vis Exp* 2013:e50405. doi:10.3791/50405.
85. Moutailler S, Popovici I, Devillers E, Vayssier-Taussat M, Eloit M. Diversity of viruses in Ixodes ricinus, and characterization of a neurotropic strain of Eyaich virus. *New Microbes and New Infections* 2016 ; 11 : 71-81.
86. Batovska J, Lynch SE, Cogan NOI, Brown K, Darbro JM, Kho EA, *et al.* Effective mosquito and arbovirus surveillance using metabarcoding. *Molecular Ecology Resources* 2018 ; 18 : 32-40.
87. Blervaque R. Séquenceurs haut débit 3e génération ou le séquençage d'ADN simple molécule. *Biorigami* 2012 [Online]. Available: <http://www.biorigami.com/?p=1565> [Accessed: 12-Aug-2020].
88. Quick J, Loman NJ, Duraffour S, Simpson JT, Severi E, Cowley L, *et al.* Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 2016 ; 530(7589) : 228-32.
89. Oxford Nanopore Technologies. A nanopore is a very small hole. 2008 [Online]. Available: <https://nanoporetech.com/cn/node/332> [Accessed: 31-Jul-2020].
90. Batovska J, Lynch SE, Rodoni BC, Sawbridge TI, Cogan NO. Metagenomic arbovirus detection using MinION nanopore sequencing. *Journal of Virological Methods* 2017 ; 249 : 79-84.
91. Yin C, Shen G, Guo D, Wang S, Ma X, Xiao H, *et al.* InsectBase: A resource for insect genomes and transcriptomes. *Nucleic Acids Research* 2016 ; 44 : D801-7.
92. Wang SM, Sekaran SD. Early diagnosis of dengue infection using a commercial dengue duo rapid test kit for the detection of NS1, IGM, and IGG. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2010 ; 83(3) : 690-5.
93. Romey A, Relmy A, Gorna K, Laloy E, Zientara S, Blaise-Boisseau S, *et al.* Safe and cost-effective protocol for shipment of samples from Foot-and-Mouth Disease suspected cases for laboratory diagnostic. *Transboundary and Emerging Diseases* 2018 ; 65(1) : 197-204.
94. Hall-Mendelin S, Hewitson GR, Genge D, Burtonclay PJ, De Jong AJ, Pyke AT, *et al.* FTA Cards Facilitate Storage Shipment, and Detection of Arboviruses in Infected Aedes aegypti Collected in Adult Mosquito Traps. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 2017 ; 96(5) : 1241-3.

Title : Kemerovo virus, an encephalitic tick-borne orbivirus : *in vivo* and *in vitro* studies

Keywords : orbivirus, ticks, interactions, vector competence, genetic variability

Abstract :

Ticks represent a major risk to human and animal health and are responsible for important economic losses. It is the principal vector of pathogens in Europe and can transmit the widest variety of microorganisms (bacteria, parasites and viruses). Among these, about 170 tick-borne viruses have been identified to date. These viruses are arboviruses (arthropod-borne viruses) transmitted by hematophagous arthropod vectors such as ticks, mosquitoes, sandflies and biting midges. Complex interactions define the relationships between arboviruses and their vectors. The ability of an arthropod to transmit a virus is defined by its vector competence. The arthropod must ingest the virus during a blood meal on infected vertebrate hosts and replicate it, and further transmit it to other hosts during the next blood meal. Arboviruses replicate within an arthropod vector and a vertebrate host. Animal arboviruses are mainly RNA viruses and have high mutation rates compared to DNA viruses. These mutations are mainly due to a lack of proofreading properties of their RNA-dependent RNA polymerase. Their life cycle within 2 very different hosts would lead to the fixation of beneficial mutations for infection and replication in these hosts. Arboviruses have a great capacity to generate variants (quasispecies) that are able to explore new environments and facilitate viral emergence. However, the genomic variability of insect-borne viruses has been extensively studied and host alternation could constrain arbovirus evolution. This hypothesis was then extrapolated to all arboviruses, including tick-borne viruses. However, ticks and insects have different life cycles and traits and the viruses are not subject to the same pressures.

In this context, this PhD project was devised to study the interactions between Kemerovo virus (KEMV) and its tick vectors at different levels. KEMV is an orbivirus discovered in 1962 in the Kemerovo region. KEMV and its two serotypes Tribeč (TRBV) and Lipovnik (LIPV) have all three been implicated in human cases of encephalitis in Russia and/or Central Europe. However, the interest in KEMV has declined in favour of the diagnosis of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in these regions. The studies conducted during this thesis pertained to *in vivo* and *in vitro* models. First, the vector competence of *Ixodes ricinus* and *Ixodes persulcatus* ticks was studied. This work involved setting up a tick infection model with KEMV in the laboratory. The different criteria of vector competence were then tested for *I. ricinus* and *I. persulcatus*. In the course of this study, we were able to highlight the influence of (1) the virus genus on the infection technique used and (2) the species and origin of the ticks when testing vector competence.

Finally, the second part of this work was the study of the influence of host alternation on fitness, virulence and tropism of KEMV in an animal model. KEMV was adapted in cell culture according to 3 scenarios: 30 serial passages in mammalian or tick cells or alternated passages between the 2 cell types. For that purpose, it was necessary to collect information on KEMV biology in order to set up the different passages. The fitness of the different cell-adapted strains was studied in our animal model, the IFNAR-/- mouse, as well as the virulence. We were able to show a link between the virulence of the adapted strains and the sex and age of the mice, suggesting the selection of quasispecies during different passages.

Titre : Le virus Kemerovo, un orbivirus encéphalitique transmis par les tiques : études *in vivo* et *in vitro*

Mots-clés : orbivirus, tiques, interactions, compétence vectorielle, variabilité génétique  
Résumé :

Les tiques représentent un risque majeur pour la santé humaine et animale et ont, par conséquent, une importance économique majeure. La tique est le plus grand vecteur d'agents pathogènes en Europe et peut transmettre la plus grande variété de microorganismes (bactéries, parasites et virus). Parmi eux, environ 170 virus transmis par les tiques ont été identifiés à ce jour. Ces virus font partie des arbovirus (arthropod-borne viruses) transmis par des vecteurs arthropodes hématophages comme la tique, le moustique, le phlébotome et le moucheron piqueur. Les arbovirus et leurs vecteurs forment des complexes où des interactions fortes ont lieu entre eux à différents niveaux. L'aptitude d'un arthropode à transmettre un virus se définit par la compétence vectorielle. L'arthropode doit ingérer le virus sur un hôte vertébré infecté et assurer la multiplication de ce dernier pour ensuite le retransmettre au cours d'un autre repas sanguin sur hôte vertébré sain. Les arbovirus se répliquent dans un vecteur arthropode et un hôte vertébré. Les arbovirus animaux sont principalement des virus à ARN et présentent des taux de mutations élevés par rapport aux virus à ADN. Ces mutations sont notamment dues à un manque de propriété de relecture de leur ARN polymérase ARN dépendante. Leur cycle de vie à 2 hôtes très différents entrainerait la fixation de mutations bénéfiques pour l'infection et la réplication dans 2 types d'hôtes. Les arbovirus ont alors une grande capacité à générer des variants (quasi-espèces) capables d'explorer de nouveaux environnements et d'induire des émergences. Cependant, la variabilité génomique des arbovirus transmis par les insectes a beaucoup été étudiée et l'alternance d'hôtes serait à l'origine de la stabilité génomique de ces virus. Cette hypothèse a ensuite été extrapolée à tous les arbovirus, y compris les virus transmis par les tiques. Or, les tiques et les insectes ont des cycles et des traits de vie différents et les virus ne sont pas soumis aux mêmes pressions.

C'est dans ce contexte que ce projet de thèse a été construit et avait pour but d'étudier les interactions entre le virus Kemerovo (KEMV) et son vecteur tique à différents niveaux. KEMV est un Orbivirus découvert en 1962 dans la région Kemerovo en Russie. Il a été impliqué dans des cas humains d'encéphalite en Russie et en Europe Centrale où notamment deux sérotypes, Tribeč (TRBV) et Lipovnik (LIPV), de KEMV circulent. Mais son intérêt a décliné au profit du diagnostic pour le virus de l'encéphalite à tique (TBEV) dans ces régions. La thèse a été menée dans deux modèles : *in vivo* et *in vitro*. Dans un premier temps, la compétence vectorielle des tiques *Ixodes ricinus* et *Ixodes persulcatus* a été étudiée. Ces travaux ont impliqué la mise en place d'un modèle d'infection des tiques avec KEMV au laboratoire. Les différents critères de la compétence vectorielle ont ensuite été testés pour *I. ricinus* et *I. persulcatus*. Au cours de cette étude, nous avons pu mettre en évidence l'influence : (1) du genre viral sur la technique d'infection à utiliser et (2) de l'espèce et de l'origine des tiques lors des essais de compétence vectorielle.

Enfin, la seconde partie de ces travaux correspondait à l'étude de l'influence de l'alternance d'hôtes sur la fitness, la virulence et le tropisme de KEMV dans un modèle animal. Le KEMV a été adapté en culture cellulaire selon 3 scénarii : 30 passages en série dans des cellules de mammifère ou de tique ou en alternance entre les 2 types de cellules. Pour se faire, connaître la biologie de KEMV était nécessaire pour la mise au point et la mise en place des différents passages. La fitness des différentes souches adaptées en culture cellulaire a été étudiée dans notre modèle animal, la souris IFNAR<sup>-/-</sup>, ainsi que la virulence. Nous avons pu mettre en évidence un lien entre la virulence des souches adaptées et le sexe et l'âge des souris, suggérant la sélection de quasi-espèces au cours des différents passages.