



HAL
open science

Étude des relations entre les *Coxiella* endosymbiotiques, leurs hôtes tique et *C. burnetii*, l'agent de la Fièvre Q

Olivier Morel

► **To cite this version:**

Olivier Morel. Étude des relations entre les *Coxiella* endosymbiotiques, leurs hôtes tique et *C. burnetii*, l'agent de la Fièvre Q. *Maladies infectieuses*. Université de Lyon, 2017. Français. NNT : 2017LYSE1241 . tel-01771066

HAL Id: tel-01771066

<https://theses.hal.science/tel-01771066>

Submitted on 19 Apr 2018

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.



N°d'ordre NNT : xxx

THÈSE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
opérée au sein de
l'Université Claude Bernard Lyon 1

École Doctorale :
Evolution, Écosystèmes, Microbiologie, Modélisation

Spécialité de doctorat :
Biologie

Soutenue publiquement le 09/11/2017, par :
Olivier Morel

**Étude des relations entre les *Coxiella*
endosymbiotiques, leurs hôtes tiques et *Coxiella*
burnetii, l'agent responsable de la fièvre Q.**

Devant le jury composé de :

Dominique Pontier	PU	Université Lyon 1	Présidente
Emmanuelle Jousselin	CR INRA	INRA	Rapporteuse
Maarten Voordouw	PU assistant	Université Neuchatel	Rapporteur
Mylène Weill	DR CNRS	Université de Montpellier	Rapporteuse
Matteo Bonazzi	CR CNRS	Université de Montpellier	Examineur
Lionel Zenner	Pr Vetagrosup	Université Lyon1	Directeur de thèse
Fabrice Vavre	DR CNRS	Université Lyon1	Co-directeur de thèse

UNIVERSITÉ CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directrice Générale des Services

M. le Professeur Frédéric FLEURY

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

Mme Dominique MARCHAND

COMPOSANTES SANTÉ

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur G.RODE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. X. PERROT

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DÉPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. le Professeur E.PERRIN

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements :

Je voudrais tout d'abord remercier les membres de mon jury – Emmanuelle Jousselein, Mylène Weill, Dominique Pontier, Maarten Voordouw et Mattéo Bonazzi – d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Ce faisant vous me permettez de présenter mes travaux, ce qui correspond à l'aboutissement de ce doctorat , et pour cela je vous en remercie.

Je crois que je n'échappe pas à la règle et comme beaucoup de doctorants me voilà contraint de réaliser cette partie de mon manuscrit (et non des moindres !) dans la précipitation. Je m'excuse donc auprès de ceux qui ne se retrouveront pas dans ces lignes ou qui ne se reconnaîtront pas à leur juste valeur. Mais la fatigue se fait sentir et les pensées ne sont plus très claires...

Une thèse c'est beaucoup de boulot, heureusement on peut compter sur des personnes pour nous épauler.

Merci à tous à toutes de m'avoir aidé dans mon travail ou, pour d'autres, de me l'avoir fait oublier !

Tout d'abord un grand merci à tous les membres du LBBE. Je suis arrivé ici timidement, moi qui ne connaissais quasiment rien aux interactions symbiotiques. Je n'avais jamais entendu parler de *Wolbachia*, c'est dire si j'étais à ma place ! Et pourtant on se sent bien dans ce labo, malgré des locaux vétustes, vous avez réussi à transformer ce lieu de travail en un lieux convivial et chaleureux.

Pour cela, je tiens en particulier à remercier Fabrice, qui m'a ouvert les portes de ce laboratoire mais aussi d'un monde qui m'était alors inconnu : la biologie de l'évolution. Grâce à ta vision des choses et ta pertinence j'ai beaucoup appris dans ce domaine. Merci pour ta patience et le temps que tu as passé (notamment ces derniers jours) à m'aider à façonner cette thèse. Malgré toutes tes casquettes de chef tu restes quelqu'un de très accessible, et même avec un emploi du temps (sur)chargé tu sais trouver un créneau pour caler une réunion ... une partie de foot ou de boulettes.

Merci donc à tous les membres de cette équipe pour ces bons moments passés à parler de sciences certes, mais aussi d'actualités politiques, sportives et autres commérages. Le tout autour d'une table qui sert tout autant aux réunions importantes, à prendre le café, à manger ou à faire des manip. Cette ambiance familiale fait qu'on se sent un peu comme à la maison dans ce labo. Un peu trop d'ailleurs puisque les années ont défilées et que je suis rapidement passé du petit dernier au vieux ~~eu~~ sage du bureau des doctorants. Bref il manquait plus que la barre du clavier imprimée sur la joue après une bonne sieste (et les compétences de moine chaolain sur R) et je me transformais en bon gars.

Car comment ne pas parler de ce bureau ! Merci les gars : Gabito, Dave et Juju pour ces conditions de travail qui en auraient sûrement rebuté plus d'un mais qui était un vrai bonheur au quotidien. Les journées étaient ainsi bien rythmées, entre parties de Rick (ou autre divertissement.io), de boulettes et de concours de calembour – et de boulot aussi, si si – on avait pas le temps de s'ennuyer. Cricri et la Goub' étaient toujours les bienvenus pour venir pimenter encore plus ce bureau avec des bonnes idées à poursuivre (Sciences en Marche, LBBeEr, rencontres inter-équipes..) et d'autres moins bonnes à bannir (défi 8.6). Merci aussi à Marie qui a su nous supporter et refréner quand cela était nécessaire les humeurs lyriques du Daaave. Merci aussi à Tibo l'artiste pour ses belles photos et pour tes dix ans de basket qui étaient appréciables (ou pas) à la boulette. Ce bureau est un endroit remarquable (rien que par sa décoration), où les échanges entre doctorants sont faciliter permettant d'acquérir des connaissances importantes pour le travail mais aussi dans la vie de tous jours avec la part belle à la culture dans toutes ses déclinaisons. Je compte sur les prochains thésards pour continuer dans cette direction mais avec Pierrot et Alex la relève est assurée !

J'avais aussi un autre bureau bien plus paisible sur le site de « l'école véto » et je remercie bien évidemment mon directeur de thèse, Lionel. C'est grâce à toi que j'ai pu obtenir cette thèse, et toi non plus tu n'as pas hésité à m'intégrer dans ton équipe. Avec tes compétences en Acarologie et celles de Fabrice en biologie de l'évolution j'étais bien encadré, malgré les problèmes que peuvent engendrer la distance entre les deux sites. Tu es aussi venu m'aider sur le terrain, pour échantillonner des tiques et sans ton aide pour immobiliser les vaches la collecte des tiques gorgées aurait été bien plus laborieuse ! Encore une fois il est agréable d'être encadré par quelqu'un de passionné qui ne compte pas ses heures.

Un grand merci à Marie-Thérèse et tous les membres du laboratoire de parasitologie de Vetagrosup et aussi Olivier de m'avoir appris à disséquer des tiques.

Merci à tous ceux qui m'ont aider à mener ce projet de thèse :

Hélène la reine de la PCR et des primers, de bonne humeur quelque soit l'heure, même s'il faut manipuler toute la journée. Au four et au moulin aidant la veuve comme l'orphelin, débordée sans jamais saturer, tu es une pièce maîtresse de cette équipe CNRS.

Merci à Olivier Duron pour m'avoir impliqué dans ses projets et m'avoir hébergé chez lui à Montpellier sans se poser plus de questions. Ta manière d'aborder le métier de chercheur et d'être en général m'ont permis de découvrir d'autres facettes du monde de la recherche. Comme Fabrice et Sylvain au LBBE, tu fais partie de ces personnes passionnées par la recherche scientifique avec qui il est passionnant d'en discuter.

Merci à Adil, la Goub' et Simon pour m'avoir éclairé sur la manière dans je pouvais me dépatouiller avec mes données de bioinfo.

Merci à Lisa pour m'avoir ouvert les portes de ses locaux en Suède pour ces même raisons.

Merci à Cécile Grand de m'avoir laissé échantillonner mes specimens de tiques sur son exploitation.

Merci aux membres du pôle administratif, Odile, Nathalie et Lætitia qui sont aussi indispensables au déroulement d'une thèse. (Et avec qui il est agréable de manger de bons tacos)

Merci à ma famille et à mes amis. Grâce à vous et à vos coupures de journaux mes recherches sur la maladie de Lyme vont enfin aboutir ! Merci pour toutes les tiques que vous m'avez ramenées et qui sont toujours dans de l'éthanol dans un mes tiroirs, (ne vous inquiétez pas pour vos chats/chiens j'ai fais des test hyper pointus et les tiques en question n'étaient porteuses d'aucun agent pathogène). Mention spéciale pour le Juliano qui, de part sa capacité impressionnante à attirer ces « sales bêtes », aurait été mon plan B en cas d'échantillonnage insuffisant. Merci à vous, qui durant ces dernières années, n'avez pas eu beaucoup de nouvelles, que ce soit la famille, les gros de St Ju, les buses Rochoises, de Clermont, de Montpellier, du Brésil, des mecs qui ont la hoo et même ceux tout près pour qui je n'étais plus aussi disponible. Malgré la distance et le temps qui passe, vous êtes toujours là (et prêts pour me 'traquenardiser').

Enfin, merci à ma petite Lu qui, elle, a dû me supporter toutes ces années. Tu as ainsi participé pleinement à ce travail de thèse : subissant les sempiternelles bonnes blagues du labo et parfois les larrons qui vont avec, m'aidant à faire des rétroplanning (les fameuses tout doux liste) et me remontant le moral. Tu participes pleinement à tous les autres aspects de ma vie en m'accompagnant et me soutenant au quotidien, ~~sans râler~~. J'ai hâte [de tenter] de réaliser tous les projets que tu arrives à imaginer.

You're my yes and my no, my stop and my go...

Résumé

Parmi les arthropodes, les tiques sont les plus importants vecteurs de pathogènes en termes de diversité et sont la première cause de transmission de maladies vectorielles en Europe et Amérique du Nord. Si ces pathogènes font l'objet de nombreux travaux, les tiques hébergent aussi d'autres symbiotes qui contribuent de manière importante à leur phénotype. Au cours des dernières années, de nombreuses bactéries symbiotiques ont ainsi été recensées chez les tiques. Parmi celles-ci des bactéries présentant une forte homologie avec *Coxiella burnetii* ont été découvertes. Contrairement à *C. burnetii*, l'agent responsable de la fièvre Q, les *Coxiella*-like endosymbiotiques (*Coxiella*-LE) ne semblent pas capables d'infecter d'autres hôtes que les tiques. Elles font partie des symbiotes à transmission maternelle les plus répandus chez les espèces de tiques et pourraient jouer un rôle important dans la biologie de ces arthropodes. Des premiers éléments suggèrent en effet, que les *Coxiella*-LE pourraient avoir un rôle nutritionnel en synthétisant vitamines B et cofacteurs absents de l'alimentation de leur hôte tique.

Pour comprendre les relations entretenues entre les *Coxiella*-LE et leurs hôtes je me suis intéressé, au cours de mes travaux de thèse, à l'évolution du genre *Coxiella*. Pour cela des approches d'analyses phylogénétiques et de génomique comparative ont été utilisées. J'ai ainsi participé à l'établissement de la phylogénie du genre *Coxiella* par Multi-Locus Sequence Typing (MLST), qui a permis de mettre en évidence la diversité de ce genre bactérien. De manière intéressante *C. burnetii* émerge au sein d'un de ces clades de bactéries endosymbiotiques de tiques, ce qui semble témoigner d'une récente transition vers la pathogénie. Nous avons séquencé deux nouveaux génomes de *Coxiella*-LE afin de réaliser une étude de génomique comparative. Tous les génomes de *Coxiella* étudiés, y compris ceux de *C. burnetii*, possèdent les gènes nécessaires à la biosynthèse des vitamines B et des cofacteurs, retrouvés habituellement chez les symbiotes nutritionnels d'arthropodes hématophages. Cette découverte renforce l'idée d'un rôle important des *Coxiella*-LE pour leur hôte tique et, d'après la phylogénie, l'ancêtre commun de ces bactéries serait donc un endosymbiote mutualiste de tique. Pourtant des traces de gènes impliqués dans la virulence de *Coxiella burnetii* ont été retrouvées dans des génomes appartenant à des clades distincts de *Coxiella*-LE, ce qui semble plutôt indiquer des pertes récurrentes de la virulence. De plus, différents niveaux d'érosion génomique sont retrouvés dans les génomes de *Coxiella*-LE étudiés, ce qui indiquerait de fréquents transferts d'hôtes. De tels transferts expliqueraient l'absence de co-cladogénèse entre la phylogénie des *Coxiella*-LE et celle de leur hôte, une caractéristique originale pour un symbiote qui semble obligatoire.

Par ailleurs, plusieurs symbiotes à transmission maternelle peuvent être retrouvés chez les tiques, le deuxième axe de ma thèse s'intéresse à l'impact de ces co-infections. Pour cela une population de tiques appartenant à l'espèce *Dermacentor marginatus* a été étudiée. Cette espèce est, en effet, fréquemment infectée par des bactéries *Coxiella*-LE, *Rickettsia* et *Spiroplasma* et différents statuts d'infection peuvent être observés chez les individus. Aucune compétition n'a été démontrée entre ces bactéries, puisqu'aucune n'interfère avec la transmission et la densité des autres. Néanmoins, en cas de triple infection, la valeur adaptative des hôtes est fortement diminuée avec une réduction importante de leur taille (10%). La transmission verticale de ces symbiotes n'étant pas complète, il devient alors difficile de comprendre comment ces bactéries atteignent de si fortes prévalences au sein de la population avec des coûts associés aussi importants. Si les stratégies symbiotiques de ces symbiotes restent à découvrir, il paraît probable que leur transmission peut également se faire de manière horizontale.

L'ensemble des résultats obtenus montre l'importance d'étudier les symbiotes de tiques. Ces derniers peuvent s'avérer cruciaux pour la biologie de leur hôte et pourraient interférer avec la transmission de pathogènes. Plusieurs de ces symbiotes peuvent co-infecter un même hôte ce qui favorise de potentiels transferts horizontaux de gènes. De plus des changements d'hôtes par transmission horizontale semblent être fréquents. Ces caractéristiques influencent l'évolution de ces bactéries et pourraient expliquer les transitions rapides au sein du continuum mutualisme-parasitisme observées chez ces symbiotes. Les tiques, et plus généralement les arthropodes hématophages, semblent être des carrefours évolutifs importants pour de nombreux micro-organismes pouvant conduire à l'émergence de nouveaux pathogènes, ou au contraire à l'établissement de symbioses mutualistes. Parmi ces symbiotes les bactéries *Coxiella*-LE semblent indispensables pour leur hôte avec un rôle nutritionnel. Pourtant l'histoire évolutive de ce genre bactérien est complexe et encore non totalement résolue. Différentes adaptations ont conduit à des stratégies symbiotiques très différentes chez les bactéries du genre *Coxiella* et rendent ce genre bactérien particulièrement intéressant pour l'étude des transitions sur le continuum mutualisme-parasitisme.

Mot clés: symbiotes de tiques ; *Coxiella*-LE ; *C. burnetii* ; virulence ; génomique comparative ; co-infection

Abstract

Among arthropods, ticks are the most important vectors of pathogens in terms of diversity and are the leading cause of transmission of vector-borne diseases in Europe and North America. While these pathogens are the most studied, ticks also harbor other symbionts that contribute significantly to their phenotype. Recently many symbiotic bacteria have been described in ticks. Among them, bacteria exhibiting strong homology with *Coxiella burnetii* have been discovered. Unlike *C. burnetii*, the causative agent of Q fever, *Coxiella*-Like Endosymbiont (*Coxiella*-LE) seems unable to infect other hosts than ticks. They are among the most widespread maternally-inherited symbionts in tick species and could play an important role in their biology. *Coxiella*-LE may indeed have a nutritional role by synthesizing B vitamins and cofactors absent from their host's diet.

To understand the interaction between *Coxiella*-LE and their hosts, my thesis work focused on the evolution of the *Coxiella* genus. For this purpose, phylogenetic analyzes and comparative genomic approaches have been carried out. I have participated in the establishment of the phylogeny of the *Coxiella* genus by Multi-Locus Sequence Typing (MLST), which highlights the diversity of this bacterial genus. Interestingly *C. burnetii* emerges within one of these clads of tick endosymbiotic bacteria, which may suggest a recent transition towards pathogenicity. Two new genomes of *Coxiella*-LE were sequenced to perform comparative genomic analyses. All *Coxiella* genomes studied, including those of *C. burnetii*, possess the genes encoding for the biosynthesis of B vitamins and cofactors, as usually found in nutritional symbionts of blood-sucking arthropods. This result strengthens the idea of an important role of *Coxiella*-LE for their host ticks and, according to the phylogeny, the common ancestor of these bacteria was therefore a mutualistic tick endosymbiont. However, traces of genes involved in the virulence of *C. burnetii* have been found in genomes belonging to distinct clads of *Coxiella*-LE, which rather indicate recurrent losses of virulence. Moreover, different levels of genomic erosion are found in the genomes of *Coxiella*-LE studied, which could indicate different transitions towards the mutualistic way of life. Such recurrent transfers would explain the absence of co-cladogenesis between *Coxiella*-LE and their host phylogeny, an uncommon feature for an obligatory symbiont.

As several maternally-inherited symbionts can be found in ticks, the second axis of my thesis has focused on the impact of co-infections. For this purpose, a population of ticks belonging to the species *Dermacentor marginatus* was studied. This species is frequently infected with *Coxiella*-LE, *Rickettsia* and *Spiroplasma* bacteria and different infection status can be observed in individuals from a single population. No competition has been demonstrated between these bacteria, since none interferes with the transmission and density of the others. However, in case of triple infection, the fitness of the host appears greatly reduced with a significant reduction in size (10%). Since vertical transmission of these symbionts is incomplete, understanding how these symbionts and co-infections are maintained despite this significant cost remains an open question. If the symbiotic strategies of these symbionts are still unknown, it is likely that their transmission is not only maternal, but also horizontal.

All the results obtained show the importance of studying tick symbionts. They are crucial for the biology of their host, and could also interfere with the transmission of tick-born pathogens. Several of these symbionts can co-infect the same host, which promotes potential lateral gene transfers, and host exchanges through horizontal transmission appear frequent. These characteristics influence the evolution of these bacteria and could explain rapid transitions along the mutualism-parasitism continuum that have been reported in these symbionts. Ticks, and more generally hematophagous arthropods, are important evolutionary hubs for many microorganisms that could lead to the emergence of new pathogens. Among these symbionts, *Coxiella*-LE bacteria appear to be essential for their tick hosts with a nutritional role, yet the evolutionary history of this bacterial genus is complex and not fully resolved. Various adaptations have led to very different symbiotic strategies in *Coxiella* bacteria and make this bacterial genus particularly interesting for the study of transitions along the mutualism-parasitism continuum.

Key words: tick symbionts; *Coxiella*-LE; *C. burnetii*; virulence; comparative genomic; co-infection

Table des matières

Résumé	9
Abstract	10
Introduction générale	13
I. Endosymbioses chez les arthropodes	17
1) Rôle et transmission	17
a) Symbioses obligatoires	17
b) Symbioses facultatives	19
2) Les co-infections	21
3) Impact de la symbiose sur le génome des partenaires symbiotiques	24
a) Impact sur les génomes des endosymbiotes	24
b) Impact sur les génomes de l'hôte	26
II. Les tiques	29
1) Description	29
a) Systématique et Morphologie	29
b) Cycles de développement	33
2) Microbiome	34
III. Les bactéries du genre <i>Coxiella</i>	37
1) <i>Coxiella burnetii</i>	37
2) <i>Coxiella</i> -like endosymbiotiques	40
IV. Plan de thèse et objectif général	43
Première partie : Histoire évolutive du genre <i>Coxiella</i>	45
	46
Chapitre I : Analyse Phylogénétique du genre <i>Coxiella</i>	47
I. Diversité génétique chez les <i>Coxiella</i> -like endosymbiotiques de tiques	48
II. L'ancêtre de <i>C. burnetii</i> serait une bactérie endosymbiotique de tique	50
Discussion	52

Chapitre II : Génomique comparative des bactéries du genre <i>Coxiella</i>	55
Article :	56
Evolutionary history of the genus <i>Coxiella</i> : Phylogeny and Genomic tell different stories about the emergence of pathogenicity	56
Discussion	82
Seconde partie : Interaction des <i>Coxiella</i>-LE avec d'autres bactéries symbiotiques de tiques : Impact des Co-infections	85
Chapitre III : Impact des co-infections chez les tiques <i>D. marginatus</i>	87
Article :	88
High cost associated with multiple infections by endosymbiont in <i>Dermacentor marginatus</i> ticks.	88
Discussion	115
Discussion générale	117
I. Rôle des <i>Coxiella</i> -LE chez les tiques	119
1) Des symbiotes certainement nutritionnels ...	119
	119
2) ... mais avec une histoire évolutive particulière	120
II. Virulence dans le genre <i>Coxiella</i>	121
III. Dynamiques des interactions symbiotiques chez les arthropodes	122
1) Transmission mixte	122
2) Rôle des arthropodes	124
IV. Conclusion	126
Références bibliographiques:	128
Annexe : The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, <i>Coxiella burnetii</i>	144

Introduction générale

La symbiose, qui signifie « vivre avec », est une association intime et durable entre plusieurs organismes hétérospécifiques. Cette notion n'a été décrite qu'à la fin du XIX^e siècle. Pourtant la symbiose est un acteur majeur de l'évolution du vivant. Les cellules eucaryotes ayant permis l'avènement d'organismes complexes et pluricellulaires en sont un exemple frappant. Ces cellules sont de fait des chimères issues d'associations de différents micro-organismes procaryotes (Margulis, 1970; Gray & Doolittle, 1982). En effet, mitochondries et chloroplastes sont les vestiges d'anciennes symbioses (Margulis, 1993). Les symbioses intracellulaires, appelées endosymbioses, sont donc capables de générer des organismes chimériques et peuvent engendrer de nouvelles lignées. Mais la symbiose a d'autres impacts sur l'évolution des espèces.

D'après sa définition originelle (Frank, 1877; Bary, 1879), la symbiose comprend tous les types d'interactions au sein d'un continuum s'étendant du parasitisme au mutualisme (Ewald 1987). Les organismes participant à cette association sont appelés des symbiotes et le plus gros est généralement identifié comme l'hôte. On parle de parasitisme lorsqu'un des organismes profite de cette interaction au détriment de l'autre, tandis que le mutualisme caractérise la situation où chaque partenaire bénéficie de l'association. Dès lors, la symbiose a un impact sur la valeur sélective des différents partenaires, ce qui peut avoir d'importantes conséquences sur l'évolution des espèces. Si l'hôte est généralement considéré comme bénéfique pour les symbiotes qu'il héberge, ces derniers ont forcément un coût physiologique. En effet, un symbiote consomme une partie des nutriments de son hôte (Shigenobu *et al.*, 2000), et a aussi un impact sur l'homéostasie et le système immunitaire de celui-ci (Fytrou *et al.*, 2006; Kremer *et al.*, 2009). Ces effets peuvent toutefois être contrebalancés par certains bénéfices. C'est la balance entre coûts et bénéfices qui définira la nature de la relation symbiotique. Toutefois, ces relations sont loin d'être immuables et le type d'interaction peut se déplacer le long du continuum parasitisme-mutualisme en fonction des génotypes des partenaires ou des conditions environnementales (Lin & Koskella, 2015).

Au sein du règne animal, l'embranchement des arthropodes comprend le plus d'espèces et se caractérise par une diversité exceptionnelle d'associations avec des micro-organismes. Ainsi de nombreuses études ont pour objectif de décrire ces symbioses, notamment chez les insectes où de nombreux micro-organismes infectent les cellules. Ces symbiotes intracellulaires, ou endosymbiotes, ont des impacts importants sur la valeur adaptative de leurs hôtes. En effet, ils ont développé des phénotypes particuliers au cours de l'évolution pour se maintenir et se transmettre chez leur hôte. Cette introduction a pour but de présenter les principales situations rencontrées dans la nature et les conséquences évolutives associées aux infections par des endosymbiotes.

I. Endosymbioses chez les arthropodes

1) Rôle et transmission

a) Symbioses obligatoires

Les symbioses obligatoires font parties d'associations symbiotiques mutualistes, en général très anciennes et très spécifiques. Ce cas de figure correspond à un extrême dans le spectre des interactions des symbioses, les micro-organismes impliqués dans l'association étant indispensables pour leurs hôtes.

Ces symbiotes, dits « primaires », ont souvent un rôle nutritionnel, en permettant à leur hôte d'utiliser des niches trophiques spécialisées. Cette capacité de colonisation de milieux pauvres en certains nutriments essentiels a conduit à d'impressionnantes radiations évolutives (Clark *et al.*, 2000). Par exemple, si le phloème composant la sève est riche en sucres – ce qui en fait une cible de choix – il est en revanche pauvre en protéines et constitue donc un régime alimentaire déséquilibré (Douglas, 1998). Ainsi seuls certains insectes de l'ordre des Hémiptères peuvent se nourrir exclusivement de sève, et ce grâce aux associations symbiotiques. Pour cela, ils possèdent tous des endosymbiotes capables de synthétiser les acides aminés essentiels qui ne sont pas disponibles par ce mode de nutrition (Buchner, 1965; Baumann & Baumann, 2005; Moran *et al.*, 2008). Par exemple, les pucerons sont nécessairement infectés par la bactérie *Buchnera* qui, en produisant des acides aminés essentiels, complète leur alimentation (Sasaki & Ishikawa, 1995). Cette symbiose compte parmi les plus étudiées et a permis de mettre en évidence le lien entre l'apparition des insectes phloémophages et l'acquisition de symbiotes nutritionnels.

De la même manière de nombreux groupes d'arthropodes se nourrissent exclusivement de sang. Pourtant le sang est lui aussi un régime déséquilibré où des métabolites essentiels au maintien de l'homéostasie sont absents. Les arthropodes hématophages stricts nécessitent la présence de symbiotes qui supplémentent leur régime alimentaire, notamment en synthétisant les vitamines B et certains cofacteurs (Manzano-Marín *et al.*, 2015). L'étude des Glossines pour leur implication dans la propagation de maladies infectieuses a permis de mettre évidence ce type d'interaction. En 1976, Nogge montre que *Glossina morsitans* (communément appelée « mouche tsé-tsé »), vectorisant les protistes parasites *Trypanosoma gambiense* responsables de trypanosomiasés humaines (e.g. la maladie du sommeil), devient stérile lorsqu'un traitement antibiotique détruisant ses bactéries symbiotiques est effectué (Nogge, 1976), suggérant ainsi la présence de symbiotes obligatoires. Des bactéries nommées *Wigglesworthia* seront ensuite identifiées au sein de ces mouches hématophages (Aksoy,

1995). Ces dernières sont, en effet, nécessaires à la nutrition et à la reproduction de leur hôte (Nogge, 1981). Le séquençage du génome d'une bactérie *Wigglesworthia* a permis de mettre en évidence que les voies de synthèses des vitamines B et autres cofacteurs associés étaient bien conservées malgré la petite taille de son génome (Akman *et al.*, 2002).

Chez la plupart des insectes, il existe un organe spécifiquement alloué à l'hébergement des endosymbiotes primaires, appelé le bacteriome. Il est constitué de cellules spécialisées, les bactériocytes, au sein desquelles se multiplient les symbiotes. Ceci permet à la fois de faciliter les échanges de métabolites mais également un contrôle de la population symbiotique (Login *et al.*, 2011; Koga *et al.*, 2012). Les bactériocytes peuvent aussi avoir un rôle à jouer dans la transmission de certains symbiotes primaires, en fusionnant directement avec les oocytes (Costa *et al.*, 1996).

En effet, comme les organelles, les endosymbiotes indispensables à la survie de l'hôte sont transmis de génération en génération par transmission verticale. Les œufs de l'hôte sont généralement infectés durant l'ovogénèse et dès lors, les symbiotes seront présents dans le cytoplasme des cellules des descendants. Ainsi la transmission des symbiotes dépend directement de la reproduction de leur hôte, ce qui génère un alignement des intérêts des partenaires et une corrélation de leurs valeurs adaptatives (Sachs & Simms, 2006). Ce mode de transmission limite la virulence chez le symbiote (Ewald, 1987), et favorise même les stratégies mutualistes (Sachs *et al.*, 2013) : les symbiotes qui augmentent la capacité reproductive de leur hôte se transmettent mieux et sont donc sélectionnés.

Les symbioses obligatoires sont généralement stables depuis des centaines de millions d'années. Par exemple la bactérie *Sulcia muelleri* et son hôte, une cicadelle, seraient associés depuis plus de 270 millions d'années (N. A. Moran *et al.* 2005a). Cette longue période d'intime association se traduit par une congruence entre les phylogénies des deux partenaires. L'arbre phylogénétique du symbiote est ainsi similaire à celui de son hôte, c'est ce que l'on appelle la co-cladogénèse, et traduit une transmission maternelle parfaite (Munson *et al.*, 1991; Baumann *et al.*, 1993; Lo *et al.*, 2003). D'ailleurs comme pour le puceron et les symbiotes primaires du genre *Buchnera*, des analyses phylogénétiques montrent une co-cladogénèse entre *Wigglesworthia* et les Glossines (Chen *et al.*, 1999). Ce phénomène illustre bien l'importance des relations entre un hôte et ses symbiotes obligatoires, qui dès lors partagent une histoire évolutive commune.

b) Symbioses facultatives

D'autres partenaires symbiotiques plus ou moins transitoires peuvent infecter les arthropodes, on parle alors de symbiotes secondaires. Ces derniers peuvent utiliser différentes stratégies symbiotiques pour se maintenir dans les populations et ont une relation avec leur hôte qui peut couvrir l'ensemble du spectre entre parasitisme et mutualisme (Moran *et al.*, 2008).

Certains symbiotes secondaires confèrent ainsi des avantages à leurs hôtes sans pour autant être indispensables. Ces avantages peuvent être de natures différentes, parmi lesquels on trouve la résistance aux stress biotiques ou abiotiques (Brownlie & Johnson, 2009). Ces stratégies symbiotiques mutualistes sont sélectionnées parmi les symbiotes car elles permettent d'augmenter la valeur adaptative de l'hôte et entraîne donc une meilleure transmission des symbiotes. Par exemple, chez certaines espèces de pucerons, la bactérie *Hamiltonella defensa* est capable de protéger son hôte contre des parasitoïdes (Oliver *et al.*, 2003; Moran *et al.*, 2005b). Si les endosymbiotes secondaires peuvent conférer un avantage pour leur hôte à un moment donné, ils exercent constitutivement un coût pour l'hôte. Ainsi en fonction des facteurs environnementaux (e.g. abondance des parasitoïdes) ou de l'état de l'hôte, la relation entre les deux partenaires peut varier et les symbiotes secondaires peuvent être sélectionnés ou contre-sélectionnés. Par exemple, les coûts importants infligés à son hôte par cette même bactérie *H. defensa* empêchent sa fixation dans les populations de pucerons (Oliver *et al.*, 2008).

Toutefois, la transmission verticale n'est pas totalement synonyme d'alignement complet des intérêts des partenaires symbiotiques. Il existe ainsi des symbiotes verticalement transmis ayant des stratégies égoïstes : les manipulateurs de la reproduction. La transmission des symbiotes étant généralement maternelle, les mâles sont des « impasses évolutives » pour ces bactéries. Ces parasites vont alors modifier le sexe-ratio de leur hôte en faveur des individus femelles, ce qui a pour conséquence de favoriser leur transmission (Engelstädter & Hurst, 2009).

Pour ce faire les manipulateurs de la reproduction utilisent différentes stratégies. L'une d'elles, le « male-killing », consiste, comme son nom l'indique, à tuer les mâles. Si dans la descendance d'une femelle infectée tous les mâles sont efficacement tués par la bactérie, cela peut conférer un avantage aux femelles de cette fratrie si la compétition pour les ressources est forte entre apparentés (Fialho & Stevens, 2000; Engelstädter & Hurst, 2009). Les bactéries manipulatrices de la reproduction peuvent aussi féminiser des individus génétiquement mâles, qui vont dès lors être capables de transmettre ces symbiotes à leur tour. On observe

notamment ce phénotype étendu chez le cloporte *Armadillium vulgare* (Bouchon *et al.*, 2008; Cordaux *et al.*, 2011). Chez les hyménoptères haplo-diploïdes, l'induction de la parthénogenèse thélytoque va permettre aux femelles infectées de produire des femelles diploïdes sans avoir été fécondées. Or lors de reproduction haplo-diploïdes, les femelles sont diploïdes et ne produisent normalement que des mâles haploïdes si elles ne sont pas fécondées et des femelles diploïdes lorsqu'il y a reproduction sexuée. Certaines souches de la bactérie *Wolbachia* vont induire la diploïdisation des œufs non fécondés et modifier le sexe-ratio de leur hôte en produisant uniquement des femelles (Stouthamer *et al.*, 1990; Stouthamer & Kazmer, 1994; Pannebakker *et al.*, 2004).

L'incompatibilité cytoplasmique (« IC ») est un autre phénomène intéressant développé par ces bactéries (Breeuwer & Werren, 1990, 1993; Werren & Jaenike, 1995). Lors d'accouplement entre mâles infectés et femelles non infectées, les bactéries capables d'induire de l'IC chez leur hôte vont affecter le développement du zygote. Contrairement aux femelles non-infectées, les femelles infectées vont pouvoir se reproduire avec tous les mâles. Le succès reproducteur de ces dernières sera donc supérieur à celui des femelles non infectées, ce qui va favoriser la propagation du symbiote dans la population.

Plusieurs bactéries appartenant à des genres très éloignés d'un point de vue phylogénétique, comme certaines *Rickettsia*, *Arsenophonus* et *Spiroplasma*, ont développé ce type de phénotypes, mais la plus répandue reste *Wolbachia pipientis*. Les différentes souches de cette bactérie sont capables d'utiliser l'ensemble de ces manipulations et infecteraient jusqu'à 40 % des espèces d'arthropodes (Zug & Hammerstein, 2012).

Ces manipulations de la reproduction peuvent générer des conflits nucléo-cytoplasmiques. Les pressions de sélection qui agissent sur le compartiment cytoplasmique (à transmission maternelle), comprenant le symbiote, ne sont pas les mêmes que celles agissant sur le noyau (à transmission bi-parentale), comprenant le génome de l'hôte (Rigaud & Juchault, 1993). Ce conflit (transitoire dans le cas de l'IC) peut sélectionner des mécanismes permettant à l'hôte de lutter contre ces parasites (Turelli, 1994). Ainsi les stratégies de manipulation de la reproduction de l'hôte peuvent s'avérer instables, et conduire soit à la perte de l'infection, soit à l'extinction. Dans ces conditions, comment expliquer le maintien des manipulateurs de la reproduction ?

L'absence de congruence entre les phylogénies des symbiotes secondaires et de leurs hôtes Arthropodes peut être un élément de réponse. Ces incongruences reflètent en effet les nombreux transferts horizontaux des symbiotes qui ont lieu ont eu lieu chez les arthropodes et

notamment chez les insectes (O'Neill *et al.*, 1992; Rousset *et al.*, 1992; Moran & Baumann, 1994; Werren *et al.*, 1995; Vavre *et al.*, 1999). Ainsi, si la transmission des symbiotes secondaires se fait majoritairement de manière verticale, de la transmission horizontale est également observée au cours de l'histoire évolutive de ces symbiotes. À l'échelle évolutive, ce mode de transmission a permis la capture de nouveaux hôtes et permet ainsi le maintien des symbiotes secondaires malgré des transmissions verticales imparfaites, des coûts importants dans certaines conditions environnementales ou des conflits nucléo-cytoplasmiques. Il en résulte une dynamique d'acquisition et de perte des symbiotes (Bailly-Bechet *et al.*, 2017).

2) Les co-infections

La plupart des études sont généralement focalisées sur le modèle un symbiote/un hôte. Pourtant les populations de symbiotes sont souvent constituées de différents micro-organismes qui cohabitent au sein d'un même hôte, c'est ce que l'on appelle les infections multiples (Read, 2001). Ainsi, les arthropodes ne sont pas infectés par un seul symbiote et doivent être considérés comme de véritables écosystèmes où plusieurs micro-organismes cohabitent.

Plusieurs symbiotes à transmission verticale peuvent ainsi être retrouvés au sein d'un même hôte (Vavre *et al.*, 1999; Zchori-Fein & Brown, 2002; Duron *et al.*, 2008). Ainsi chez le puceron, en plus du symbiote primaire *B. aphidicola*, 9 symbiotes facultatifs sont connus (Werren *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 1996; Chen & Purcell, 1997; Roux *et al.*, 1997; Darby, 2001; Fukatsu *et al.*, 2001; Sandstrom *et al.*, 2001; Guay *et al.*, 2009; Ferrari *et al.*, 2012; Guo *et al.*, 2017). Dans le cas de multi-infections stables, la fidélité entre les différents partenaires peut permettre l'émergence de coopération entre différentes espèces (Vautrin *et al.*, 2007). Dans certains cas on observe même de la dépendance entre différents symbiotes. Ainsi chez les aleurodes *B. tabaci* le symbiote primaire *Portiera aleyrodidarum* a perdu la capacité de synthétiser certains acides aminés essentiels à la survie de son hôte. C'est le symbiote *H. defensa*, qui dans ce cas, permet de compléter ces voies de synthèses, devenant alors un symbiote obligatoire chez certaines espèces de *B. tabaci* (Rollat-Farnier *et al.*, 2015). De même, chez le puceron *Cinara cedri*, il existe de nombreuses complémentations de voies métaboliques entre *B. aphidicola* et *Serratia symbiotica*. Ces complémentations permettent d'assurer la stabilité au sein des communautés symbiotiques infectant un même organisme

hôte (Lamelas et al., 2011).

Pourtant les infections multiples peuvent être associées à des coûts pour l'hôte (Mouton *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2006). Les hôtes représentent, de fait, une ressource limitée qui peut entraîner de la compétition entre les symbiotes pour son exploitation. Les conséquences de ces co-infections ont été largement étudiées chez les parasites à transmission horizontale où l'on peut notamment observer de la compétition entre ces parasites (Frank, 1996; Chao *et al.*, 2000). Les résultats de ces études montrent que les parasites les plus virulents sortent généralement « vainqueurs » de cette compétition intra-hôte. De même, la sélection de variants les plus à même d'accaparer la ressource au sein des symbiotes à transmission verticale peut conduire à ce que l'on appelle la « tragédie des biens communs » (Hardin, 1968).

On peut ainsi retrouver chez le puceron des symbiotes protecteurs comme *H. defensa*, *Regiella insecticola* et *Serratia symbiotica* associées au symbiote primaire. Il existe en revanche de la compétition entre ces symbiotes et certains peuvent exclure ou impacter la transmission des autres (Darby *et al.*, 2005). Le phénotype de ces bactéries peut aussi être altéré par la présence d'autres symbiotes. *S. symbiotica* ne protège plus son hôte contre d'éventuels stress thermiques en cas de présence de *Rickettsia* sp. (Montllor *et al.*, 2002). Outre leurs coûts physiologiques, ces symbiotes mutualistes peuvent être sélectionnés ou contre sélectionnés en fonction des conditions environnementales et des partenaires impliqués dans la relation symbiotique. On assiste ainsi à des gains, des pertes et même des remplacements de symbiotes dans les communautés symbiotiques infectant un même hôte.

Les co-infections doivent exprimer des phénotypes particuliers pour être maintenues dans les populations, afin que la production moyenne de femelles multi-infectées soit supérieure à la production de femelles mono ou non infectées (Vautrin & Vavre, 2009). Différentes stratégies évolutives peuvent ainsi être mises en place comme la manipulation de la reproduction ou des stratégies mutualistes visant à augmenter la valeur adaptative de l'hôte. Toutefois afin de limiter le coût de ces infections multiples, les symbiotes doivent induire différents effets ou travailler en synergie pour ne pas être redondants. On retrouve ainsi fréquemment des symbiotes mutualistes et des manipulateurs de la reproduction au sein d'un même hôte (Zchori-Fein & Brown, 2002; Tsuchida, 2004)

Les stratégies de manipulation de la reproduction de l'hôte sont classiquement

observées dans le cas de co-infections. Plusieurs bactéries induisant différents mécanismes de manipulation de la reproduction peuvent d'ailleurs infecter un même hôte (Hiroki *et al.*, 2004; Montenegro *et al.*, 2006). Le cas des manipulateurs induisant de l'IC est toutefois remarquable, car différentes bactéries induisant de l'IC peuvent être maintenues en co-infection chez un même hôte dès lors que l'IC est spécifique de chaque souche (Mouton *et al.*, 2003). Bien qu'induisant le même effet, ces bactéries permettent aux femelles multi-infectées de se reproduire avec l'ensemble des mâles de la population. Le mécanisme d'IC favorise alors la diversité bactérienne et permet de maintenir activement les co-infections (Vautrin & Vavre, 2009).

Les stratégies mutualistes permettent aussi la mise en place de co-infections. Outre les symbiotes primaires, nous avons vu précédemment que les symbiotes facultatifs peuvent aussi avoir des phénotypes mutualistes leur permettant de se maintenir dans les populations d'hôtes. Parmi les phénotypes développés par ces symbiotes on peut ainsi citer la protection de l'hôte contre les pathogènes.

Les organismes pathogènes sont généralement associés à des densités élevées et ont un impact délétère sur la valeur adaptative de l'hôte. Le conflit entre symbiotes à transmission verticale et parasites à transmission horizontale a ainsi, conduit à l'évolution de stratégies mutualistes permettant aux symbiotes de protéger leur hôte contre ces pathogènes (Haine, 2008). Les individus infectés par ces mutualistes ne seront, alors, pas impactés par les coûts associés aux pathogènes. Leur succès reproducteur et la transmission de leurs symbiotes seront donc accrus par rapport aux individus parasités par des pathogènes.

Certains symbiotes sont capables de maîtriser plusieurs de ces stratégies. Ainsi la bactérie *Wolbachia* est capable de manipuler la reproduction de son hôte mais également d'induire de la résistance face à nombreux virus à ARN chez les drosophiles (Teixeira *et al.*, 2008). Cette capacité de protection chez des bactéries capables d'induire de l'IC est très intéressante. L'introduction de la souche de *Wolbachia* de *Drosophila melanogaster* responsable de ce phénotype (wMel) chez le moustique *Aedes aegypti* permettrait de lutter efficacement contre la propagation de virus transmissible à l'homme (Hoffmann *et al.*, 2011; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011). Des relargages massifs de moustiques infectés par cette bactérie sont en cours et semblent fournir des résultats encourageants pour la lutte contre les épidémies de Dengue, Zika et Chikungunya (Aliota *et al.*, 2016; Dutra *et al.*, 2016).

3) Impact de la symbiose sur le génome des partenaires symbiotiques

a) Impact sur les génomes des endosymbiotes

Le mode de vie intracellulaire a un fort impact sur l'évolution des génomes des endosymbiotes. Ce confinement extrême limite d'une part, les échanges génétiques par transfert latéral de gènes avec d'autres bactéries et d'autre part, ce nouvel environnement est bien plus stable que celui dans lequel évoluait leur ancêtre pré-endosymbiotique. Des gènes essentiels à la survie de bactéries libres, permettant de s'adapter aux conditions environnementales, seront dès lors dispensables chez les endosymbiotes. Par ailleurs, la taille effective des populations de bactéries intracellulaires est très faible par rapport aux populations de bactéries libres car, lors de la transmission, seule une infime fraction est transmise au nouvel hôte. Cet effet de « goulot d'étranglement » se traduit par une réduction de l'efficacité de la sélection au profit de la dérive génétique et permet une accumulation de mutations faiblement délétères (« cliquet de Müller ») (Bergstrom & Pritchard, 1998; Rispe & Moran, 2000). Ainsi dans le cas de longues coévolutions entre hôte et symbiote, notamment lors de symbioses obligatoires, un relâchement de la pression de sélection s'opère dans le génome des endosymbiotes au profit de la dérive génétique et conduit à l'élimination de nombreux gènes (*Figure i.1*). Les génomes des endosymbiotes primaires sont alors extrêmement réduits, ne comportant parfois que les gènes essentiels. Ils sont aussi enrichis en bases AT puisque leur composition en bases nucléotidiques est biaisée par l'accumulation de mutation. Un des génomes de *B. aphidicola*, symbiote primaire de puceron, séquencés n'est par exemple composé que de 640 681 paires de bases (Shigenobu *et al.*, 2000), proche de ce qui était il y a peu considéré comme la taille minimale pour un organisme bactérien (Nakabachi *et al.*, 2006). La Beta Protéobactérie *Tremblaya princeps*, symbiote primaire de la cochenille farineuse des agrumes *Planococcus citri* (Coccoidae), possède également un génome extrêmement réduit avec seulement 138 931 bases (Lopez-Madrigal *et al.*, 2011).

Les endosymbiotes facultatifs ne présentent pas une réduction génomique aussi intense. Si la taille de leur génome est moins notable que celle des génomes de symbiotes obligatoires, le processus d'érosion est tout de même actif. Toutefois, lors des premiers stades de la réduction génomique, l'accumulation de mutations délétères se traduit par l'inactivation de nombreux gènes. Ces gènes inactifs, appelés pseudogènes, vont subsister dans le génome des nouveaux endosymbiotes qui sont alors composés d'une proportion importante de régions non codantes. Ces génomes sont aussi caractérisés par la présence de nombreux éléments mobiles (*Figure i.1*). En effet, les régions non codantes ainsi qu'un relâchement de l'efficacité

de la sélection vont permettre la prolifération de ces derniers qui ne seront plus éliminés (Baumann & Baumann, 2005; Moran *et al.*, 2008; McCutcheon & Moran, 2011). Les éléments mobiles peuvent ainsi représenter une part importante des génomes des endosymbiotes récemment acquis par leurs hôtes. Par exemple, ils constituent près de 35 % du génome d'une *Rickettsia* endosymbiotique de tique (Gillespie *et al.*, 2012). La présence de tels éléments dans les génomes n'est pas anodine et peut conduire à de nombreux réarrangements chromosomiques affectant la synténie entre les génomes de bactéries apparentées. Les éléments mobiles facilitent aussi le transfert horizontal de gènes entre différentes bactéries. Cela permet à ces dernières d'acquérir de nouvelles fonctions, ce qui peut avoir des impacts importants sur leur histoire évolutive. Une souche de *Wolbachia* est, par exemple, retrouvée dans le bactériome des punaises de lits (*Cimex lectularius*, Cimicidae). Ces bactéries, connues surtout pour la manipulation de la reproduction, sont devenues indispensables pour cet hôte. En effet, par le biais de transferts de gènes, ces dernières ont acquis les voies de synthèse permettant la production de vitamines B. Ce parasite manipulateur de la reproduction est alors devenu un symbiote nutritionnel chez les punaises de lit, illustrant parfaitement les transitions des interactions symbiotiques le long du continuum mutualisme-parasitisme (Hosokawa *et al.*, 2010).

La *Figure i.1* montre que les génomes de bactéries endosymbiotiques sont tous soumis à l'érosion génomique et peuvent être extrêmement réduits, comme chez les symbiotes primaires « anciens », ou plus plastiques dans le cas de symbioses plus récentes ou transitoires. La vitesse de ce processus n'est toutefois pas la même et il semble que l'inactivation et la perte des mécanismes de réparation et de recombinaison de l'ADN conduisent à une érosion rapide du génome (Gil *et al.*, 2003). Des travaux d'évolution expérimentale ont ainsi montré que le taux d'ADN perdu au cours du temps est multiplié par 50 chez les bactéries où le gène *mutS*, nécessaire à la réparation de l'ADN, n'est plus fonctionnel (Nilsson *et al.*, 2005). La perte de ces mécanismes peut donc être considérée comme un tournant dans l'évolution des endosymbiotes. Elle marque le début d'une érosion rapide, mais surtout la perte de la plasticité jugée nécessaire à des changements d'hôtes ou de stratégies symbiotiques.

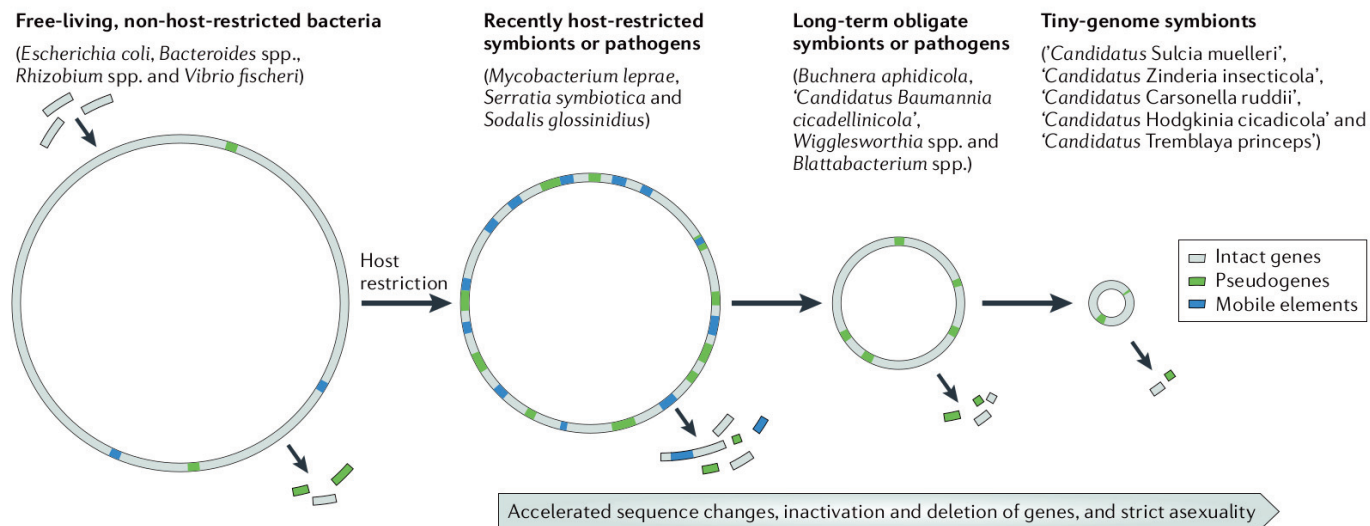
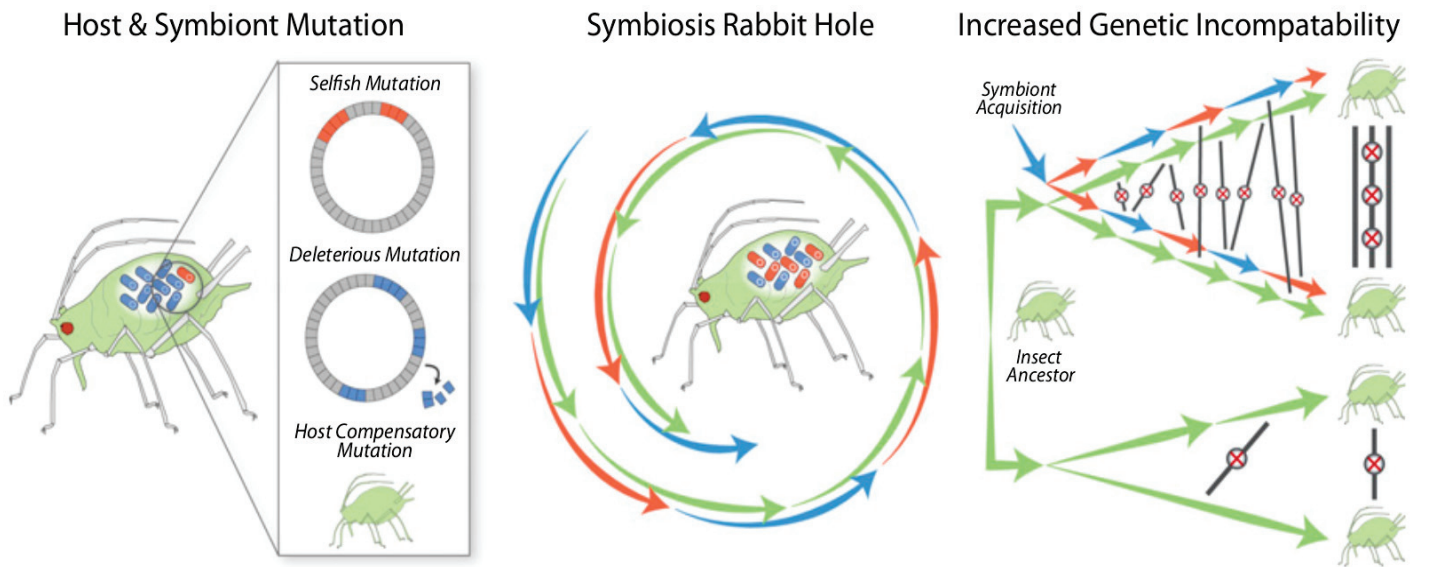


Figure i.1 | **Étapes de réduction génomique chez des bactéries symbiotiques**
(*McCutcheon & Moran 2011*)

b) Impact sur les génomes de l'hôte

Les symbioses ont aussi des conséquences sur le génome de l'hôte. Certaines mutations chez le symbiote, qu'elles soient dues à la forte dérive génétique ou à la sélection intra-hôte de symbiotes égoïstes, peuvent par exemple fortement impacter la valeur adaptative de l'hôte. Ce dernier va alors être soumis à de fortes pressions de sélection pour atténuer les effets néfastes de ces mutations apparues chez le symbiote. Cette forme de co-évolution entre les deux organismes peut entraîner d'importantes différences dans le génome de l'hôte et potentiellement conduire à l'incompatibilité génétique entre différentes lignées d'hôtes et souches de symbiotes. La *Figure i.2* schématise bien ce processus qui s'apparente à un cercle vicieux conduisant à une évolution rapide des gènes de l'hôte. Dans cet exemple une population de puceron hébergeant un endosymbiote va ainsi rapidement évoluer du fait de la sélection visant à compenser les mutations délétères apparues chez son symbiote. La rapide évolution affectant cette population de pucerons peut alors conduire à de l'incompatibilité entre individus de la même espèce et ainsi faciliter la spéciation.



1) Apparitions de mutations chez le symbiote pouvant altérer la relation mutualiste avec l'hôte

2) Sélection chez l'hôte pour compenser ces mutations

3) Rapide évolution de gènes conduisant à de l'incompatibilité entre populations

Figure i.2 | **Rabbit Hole Theory : Conséquences de la co-évolution hôte-symbiote primaire**
(Benett&Moran, 2015)

Dans le cas des symbioses facultatives, les adaptations d'un organisme à son partenaire peuvent avoir un impact négatif sur ce dernier, générant un conflit d'intérêts. Dès lors une course à l'armement peut se mettre en place entre le symbiote, alors appelé parasite, et son hôte. Cette course à l'armement se caractérise par un cycle ininterrompu d'adaptations et de contre-adaptations (Svensson & Råberg, 2010). Cette évolution rapide du génome de l'hôte peut encore une fois mener à de la spéciation et peut conduire à des phénotypes extrêmes.

Chez l'hyménoptère *Asobara tabida* cette course aux armements aurait de manière contre-intuitive mené à la dépendance de ces hôtes vis-à-vis du parasite de la reproduction *Wolbachia* (Dedine *et al.*, 2001). Afin de réduire les coûts de l'infection par *Wolbachia*, *A. tabida* aurait ainsi modulé son homéostasie oxydative (Kremer *et al.*, 2009). Cette adaptation est toutefois délétère puisqu' en absence du symbiote elle semble être responsable de l'absence d'ovogenèse chez ces guêpes parasitoïdes (Dedine *et al.*, 2005; Monnin, 2016). Cet exemple montre l'impact des interactions symbiotiques sur l'évolution des espèces mais surtout à quel point les limites entre parasitisme/mutualisme et symbioses primaires/secondaires peuvent être floues. Comment, dès lors, caractériser ce type d'interaction. Serait-ce du « parasitisme obligatoire » ?

Dans certains cas de symbioses, on peut aussi observer des transferts de gènes symbiotiques dans le génome nucléaire de l'hôte (Nikoh & Nakabachi, 2009; Husnik *et al.*, 2013; Ioannidis *et al.*, 2014). L'échelle de temps nécessaire pour déceler de tels phénomènes dépasse le cadre de la biologie expérimentale et pose la question de l'impact de ces phénomènes (Ros & Hurst, 2009). Pourtant du point de vue de l'évolution des espèces, ces transferts de gènes peuvent avoir de grandes conséquences. Ainsi un élément génétique nucléaire appelé « élément f » permet la féminisation du cloporte *Armadillium vulgare* en absence de parasite manipulateur de la reproduction (Juchault *et al.*, 1993). Récemment ce facteur féminisant a été identifié comme une insertion récente de 3Mb dans le génome de ce cloporte provenant de la bactérie *Wolbachia*, et constitue un nouveau chromosome sexuel (W) (Leclercq *et al.*, 2016; Cordaux & Gilbert, 2017). Les transferts horizontaux de gène de symbiote vers le génome nucléaire peuvent ainsi apporter de nouvelles fonctions à ces génomes. L'acquisition de gènes provenant d'un champignon par, transfert horizontal, chez les pucerons permet ainsi de produire des caroténoïdes et de synthétiser de l'énergie à partir de la lumière (Moran & Jarvik, 2010; Valmalette *et al.*, 2012). De la photosynthèse chez un arthropode en somme ! Un autre exemple frappant montre carrément des insertions massives comprenant près de l'ensemble du génome de *Wolbachia pipientis* dans le génome nucléaire de son hôte *Drosophila ananassae* (Klasson *et al.*, 2014) – ce qui n'est pas sans rappeler la création de chimères comme conséquence aux endosymbioses (*cf.* introduction générale).

II. Les tiques

1) Description

a) Systématique et Morphologie

Les tiques sont des ectoparasites vivant aux dépens de leurs hôtes vertébrés. Elles comptent parmi les plus importants vecteurs d'agents pathogènes au sein des arthropodes, au même titre que les moustiques (Goodman *et al.*, 2005). Elles sont d'ailleurs considérées comme le principal vecteur de maladies transmissibles à l'homme dans les régions tempérées (Dantas-Torres *et al.*, 2012).

La *Figure i.3* montre la position des tiques au sein des Invertébrés. Les tiques appartiennent à l'embranchement des Arthropodes, leur corps est recouvert d'un exosquelette protégeant les organes internes et sur lequel s'insèrent les muscles. Elles sont ensuite classées dans le sous-embranchement des Chélicérates, car elles sont dépourvues d'antennes et de mandibules, mais possèdent une paire de chélicères et des pédipalpes. Les tiques sont des arthropodes terrestres se déplaçant grâce à 4 paires de pattes (à l'exception du stade larvaire qui n'en possède que 3) et font donc partie de la classe Arachnides. Enfin, l'ordre des Ixodida est retrouvé dans la sous-classe des Acariens. Les tiques adultes mesurent généralement de 3 à 6 mm lorsqu'elles ne sont pas gorgées et comptent parmi les plus grands organismes vivants de cette sous-classe généralement composée d'organismes microscopiques. Chez les acariens, le corps est découpé en deux segments, et non trois comme chez la plupart des arthropodes, on distingue ainsi chez la tique une partie antérieure, le capitulum (« tête » en latin) et une partie postérieure ou idosome.

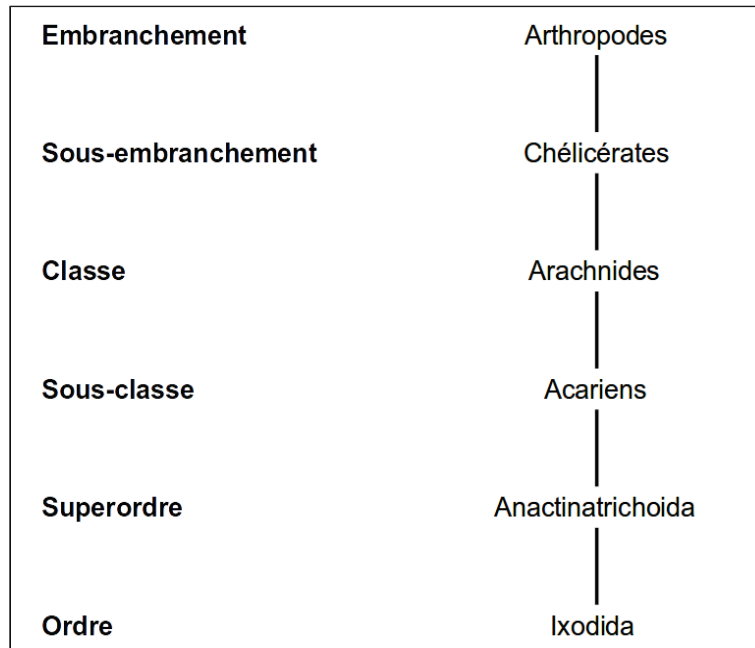


Figure i.3 | **Systématique des tiques**
d'après Camicas et Morel (1977)

Le capitulum des tiques est pourvu d'une paire de palpes et, axialement, des chélicères sur la partie dorsale ainsi qu'un hypostome sur la partie ventrale. Les palpes, formés de 4 articles, sont symétriques et portent de nombreuses soies dont les fonctions sont sensorielles. Chélicères et hypostome pénètrent la peau de l'hôte lors des repas sanguins. Les premières sont munies de « doigts » coupants permettant de trancher et qui peuvent être rétractés dans une gaine protectrice, tandis que l'hypostome est garni de plusieurs files de dents permettant un ancrage dans la peau de l'hôte.

L'idosome est le tagme postérieur des tiques où l'on retrouve ventralement les orifices génital et anal et où vont s'attacher les quatre paires de pattes. Chacune des pattes est composée des articles suivants : coxa, trochanter, fémur, patelle, tibia et tarse et s'insèrent sur la face ventrale. Elles s'achèvent par une sorte de ventouse, la pulvile et deux griffes qui permettent aux tiques de grimper sur tous types de supports. La première paire de pattes est dotée d'un organe sensoriel sensible à la composition de l'air, l'organe de Haller, important pour localiser les hôtes (Haller, 1881; Sonenshine, 2006).

Au sein des Ixodida plusieurs classifications différentes existent. Nous retiendrons dans ce manuscrit celle de Camicas *et al.* où cet ordre est subdivisé en 3 sous-ordres et 4 familles (Camicas *et al.*, 1998). La famille des Argasidae est l'unique représentante du sous-ordre des *Argasina* et comprend ce que l'on appelle couramment les « tiques molles ». Les

représentants des familles Ixodidae et Amblyomidae sont eux des « tiques dures » et forment le sous-ordre des *Ixodina*. Enfin, la famille des Nuttalliellina, appartenant au sous-ordre des Nuttalliellina, ne comporte que l'espèce *Nuttallia namaqua* qui n'est pas très bien décrite (Figure i.4). Peu de données sont disponibles sur la morphologie et le cycle de vie de cette espèce, car peu d'individus ont été observés. Face à ce manque d'information, il ne sera pas ou peu question de cette famille de tique dans la suite de ce manuscrit.

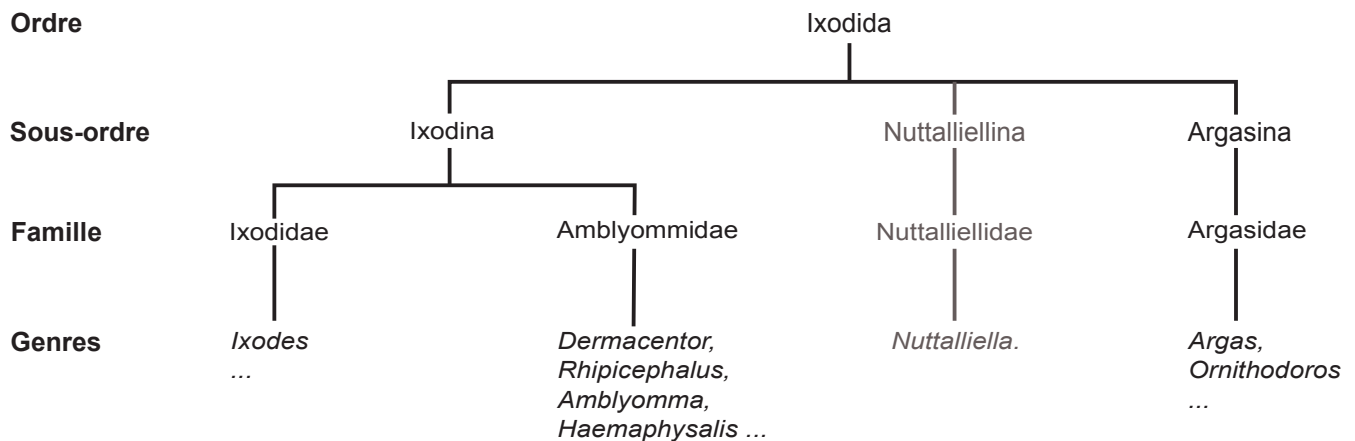
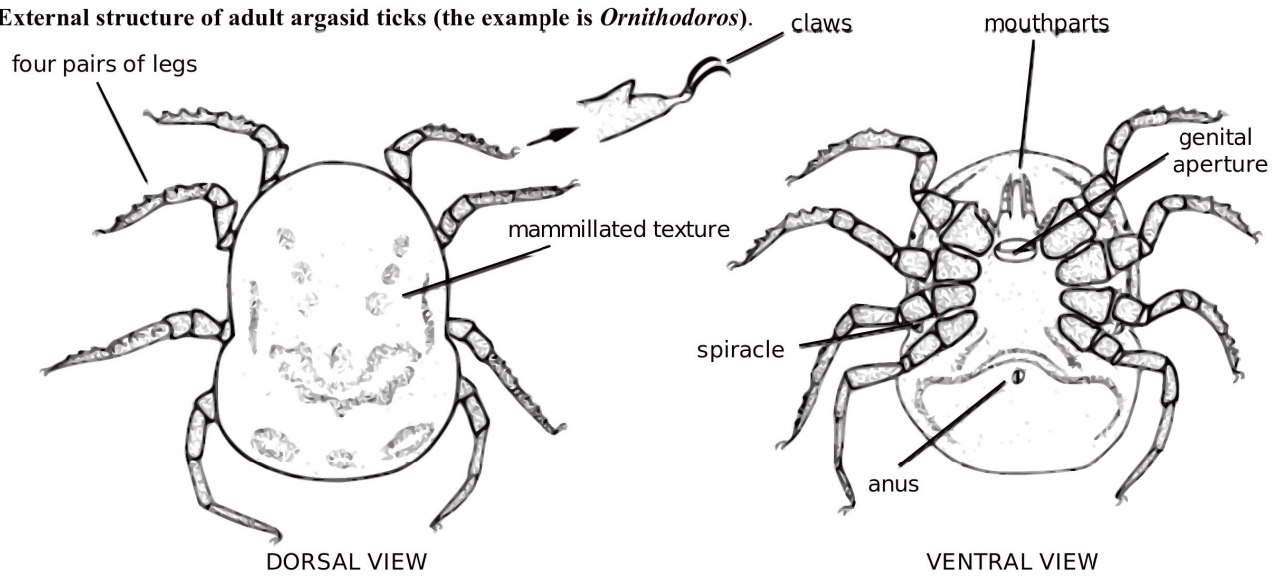


Figure i.4 | **Classification des Ixodida**

La classification ainsi que la phylogénie des tiques n'est pas vraiment résolue, il est difficile de préciser l'origine des tiques et de leur lignée évolutive. Par exemple, les sous-ordres *Ixodina* et *Argasina* sont très différents puisqu'ils ont évolué différemment durant le système géologique du Permien. On observe de nombreuses différences chez les représentants de ces différents sous-ordres, les *Argasina* ayant gardé des caractères de type primitif par rapport aux *Ixodina*. D'un point de vue morphologique, elles sont dépourvues de parties sclérifiées – d'où l'appellation « tiques molles » – et leur capitulum est positionné ventralement alors qu'il est antérieur chez les *Ixodina* (Figure i.5). On observe aussi des différences au niveau de la métamorphose des larves, elle est incomplète chez les *Argasina*, les pattes et le capitulum n'étant pas néoformés contrairement aux appendices des *Ixodina*.

External structure of adult argasid ticks (the example is *Ornithodoros*).



External structure of adult ixodid ticks (the example is *Hyalomma*).

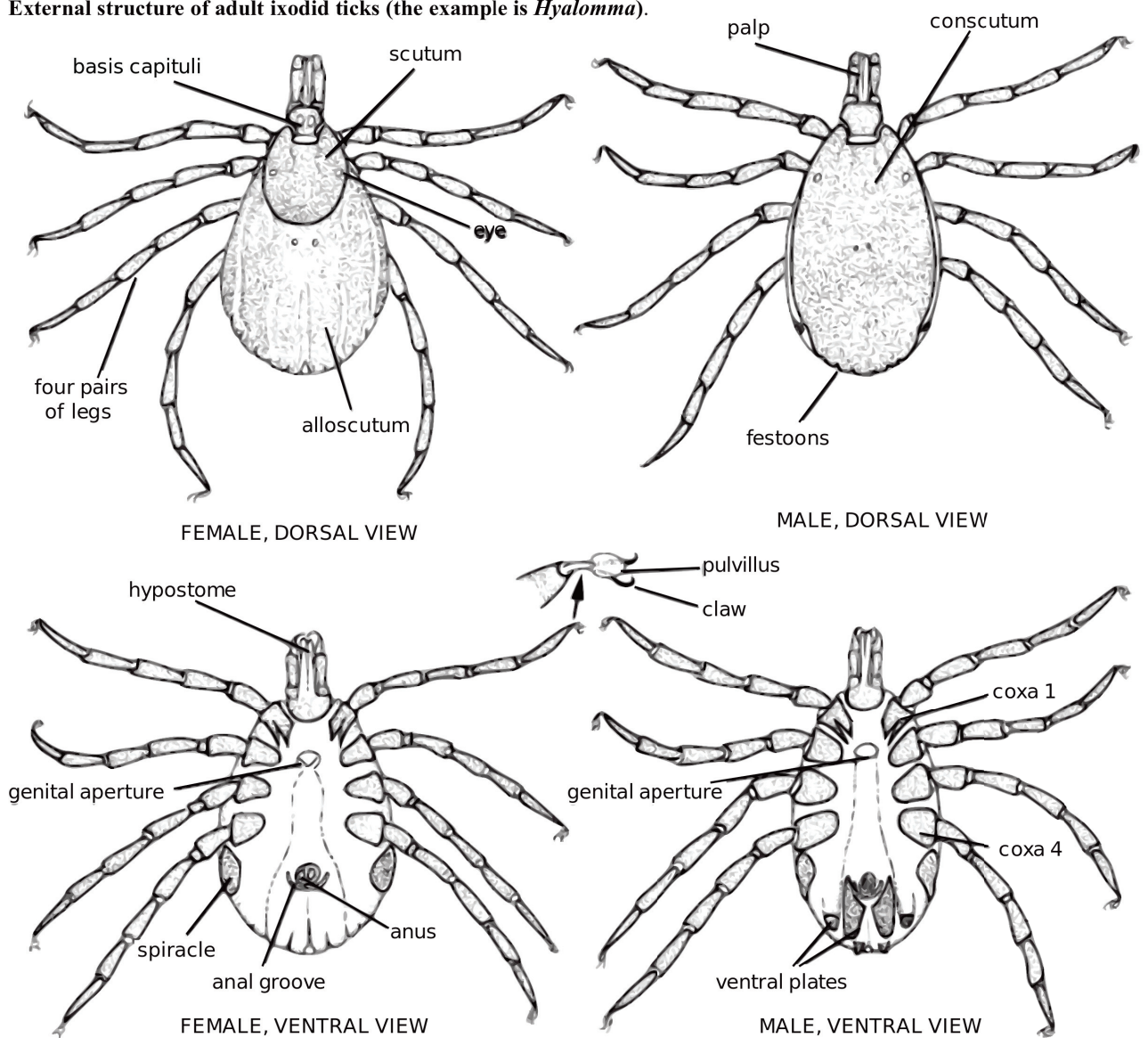


Figure i.5 | **Morphologie des Ixodida**
(Estrada-Peña, 2004)

b) Cycles de développement

Les tiques sont des arthropodes hématophages stricts : ce sont des ectoparasites qui se nourrissent du sang de leur hôte. Il existe trois phases de développement chez les Ixodida : les femelles pondent des œufs desquels éclosent les larves qui se métamorphosent en nymphes, puis en adultes. Chacune de ces métamorphoses se doit d'être précédée d'un repas sanguin et la ponte d'œufs n'est possible que chez les femelles gorgées. On note ainsi une alternance entre phases parasitaires sur hôte, généralement de courte durée, et phases libres au sol qui peuvent durer plusieurs mois.

Durant ces phases libres, les tiques vont rechercher un hôte à parasiter. Différentes stratégies sont alors employées en fonction des espèces de tiques étudiées. Dans un premier temps, différentes préférences trophiques peuvent être observées, allant de la spécificité parasitaire chez des espèces ne parasitant qu'une espèce d'hôte précise, de la sélectivité parasitaire chez les espèces se nourrissant sur certains ordres ou classes de vertébrés ou encore des espèces ubiquistes. Ensuite on peut noter différents comportements de chasse, certaines espèces de tiques sont endophiles et vont coloniser des abris spécifiques de l'hôte, notamment des nids d'oiseaux pour de nombreuses espèces du genre *Ornithodoros*. D'autres en revanche sont exophiles et recherchent leur hôte dans des biotopes ouverts. Ces dernières peuvent adopter un comportement passif, à l'affût, ou mener une recherche active de leur hôte.

La nutrition sur hôte est permise grâce aux organes du capitulum. Les palpes vont permettre d'identifier des sites de prédilection sur l'hôte où la peau est généralement plus fine. Ensuite la tique va pénétrer la peau de l'hôte grâce à des processus mécaniques, via l'action tranchante des chélicères et la propulsion de l'hypostome (Richter *et al.*, 2013), et aussi chimiques grâce à des enzymes salivaires lysant les tissus au niveau de la lésion. La rupture des capillaires sanguins va former une poche hémorragique qui va permettre l'alimentation de la tique par aspiration. Afin de consolider l'adhésion à l'hôte durant la piqûre, une substance est produite par les tiques et celle-ci durcit pour former « le ciment ». Il existe aussi des différences entre tiques molles et tiques dures durant cette phase de nutrition. Les tiques dures ne se nourrissent qu'une fois par stade et la durée de gorgement est de 4 à 5 jours. Ces dernières ont généralement des cycles triphasiques puisque chaque repas sanguin s'effectue sur un hôte différent, bien qu'il existe quelques espèces bi voire monophasiques. En revanche, les Argasina ont des cycles polyphasiques plus complexes et effectuent de nombreux repas sanguins, généralement courts, mais dont la durée peut être très variable, à la différence des Ixodina où le nombre et la durée des repas sont définis.

2) Microbiome

Le microbiome est l'ensemble des micro-organismes symbiotiques, qu'ils soient mutualistes, commensaux ou pathogènes, qui occupent différentes niches au sein d'un même organisme hôte. Les tiques hébergent de nombreux pathogènes capables d'induire des zoonoses et sont donc considérées comme d'importants vecteurs de maladies (Jongejan & Uilenberg, 2005). Beaucoup de recherches se concentrent sur l'étude de ces micro-organismes et la liste de ces derniers ne cesse d'augmenter. Ces micro-organismes ont généralement une transmission horizontale et le mode d'alimentation des tiques joue un rôle important dans leur acquisition et leur vectorisation. Balashov a montré en 1967 que, durant les repas sanguins, absorption de sang et émission de salive se succèdent et permettent la circulation de micro-organismes (Balashov, 1972). Ainsi le phénomène de co-feeding décrit pour la première fois chez les tiques (Jones *et al.*, 1987), permet l'échange de micro-organismes d'une tique à l'autre lors de repas sanguins. Cette notion de co-feeding doit ici être différenciée de la transmission horizontale classique car dans ce cas le symbiote se transmet rapidement via le sang des animaux parasités sans avoir à se reproduire chez l'hôte intermédiaire. Le co-feeding a d'abord été démontré pour de nombreux virus, mais il permet aussi la transmission des spirochètes *Borrelia*, responsables de borrélioses (maladie de Lyme) (Randolph *et al.*, 1996; Voordouw, 2015). L'alimentation exclusivement hématophage des tiques, couplée au fait qu'elles parasitent plusieurs hôtes au cours de leur vie conduit donc à la transmission de différents organismes : bactéries, protozoaires et virus (Benson *et al.*, 2004; Steiner *et al.*, 2008). Il a été montré que de nombreux pathogènes acquis au cours des repas sanguins étaient transmis d'un stade à l'autre au cours du développement des tiques, qui sont dès lors généralement infectées toute leur vie (Sonenshine, 1991). La mue est pourtant un processus complexe où l'on observe des phénomènes de lyse et de régénération tissulaire. Les mécanismes qui permettent à ces symbiotes de survivre à la mue, mais aussi de coloniser l'appareil digestif et les glandes salivaires, ne sont pas encore élucidés (Sonenshine, 1991; Balashov & Grigoryeva, 2003).

Si les tiques hébergent des micro-organismes infectieux (Schouls *et al.*, 1999; Mixson *et al.*, 2006), d'autres symbiotes sont fréquemment associés à ces hôtes. Comme tous les arthropodes, les tiques possèdent un microbiome riche et varié où toutes les interactions du continuum parasitisme-mutualisme sont représentées. Si de nombreux symbiotes de tiques sont apparentés à des pathogènes de vertébrés comme les bactéries *Rickettsia*, *Coxiella*-like endosymbiotique (*Coxiella*-LE) et *Francisella*-LE, la plupart d'entre eux semblent inoffensifs

pour des hôtes vertébrés (Cowdry, 1925; Mudrow, 1932; Burgdorfer *et al.*, 1973; Noda *et al.*, 1997; Clay *et al.*, 2008; Ahantarig *et al.*, 2013; Sassera *et al.*, 2013; Narasimhan & Fikrig, 2015; Duron *et al.*, 2017). Près d'une dizaine de bactéries à transmission maternelle ont été identifiées chez de nombreuses espèces de tiques au cours de la dernière décennie (Bonnet *et al.*, 2017). Le rôle de ces symbiotes pour leur hôte n'a pas été clairement établi mais certaines bactéries pourraient être importantes, voire nécessaires chez les tiques. En effet, le sang représente une alimentation déséquilibrée qui ne comporte pas de vitamine B. Chez la plupart des arthropodes hématophages strictes, des symbiotes nutritionnels synthétisent et fournissent ces vitamines et les cofacteurs associés (Akman *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2007; Hosokawa *et al.*, 2010; Nikoh *et al.*, 2014; Manzano-Marín *et al.*, 2015; Rio *et al.*, 2016). Il existe donc probablement des symbiotes chez les tiques assurant la production de vitamine B. Le fait que leur identité ne soit pas connue reflète le manque de connaissance sur les communautés de micro-organismes infectant ces arthropodes.

Pour tenter de décrire la diversité des espèces bactériennes composant ce microbiome le séquençage de régions hypervariables de la séquence génétique codant l'ARNr 16S ainsi que la génomique et la transcriptomique ont été utilisés (revues dans Narasimhan & Fikrig 2015). Si la plupart du temps l'ensemble du corps des tiques est extrait en vue de séquençage, certaines de ces études ont été menées sur des organes spécifiques préalablement disséqués et permettent d'avoir une idée de la localisation de certains symbiotes (*Figure i.6*). Si les tiques ne semblent pas posséder de bactériomes comme chez les insectes pour héberger les symbiotes primaires, cette localisation nous informe du rôle putatif que ces symbiotes peuvent avoir sur les traits de vie de leur hôte, mais aussi des interactions pouvant se produire entre eux (Narasimhan *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2014; Narasimhan & Fikrig, 2015).

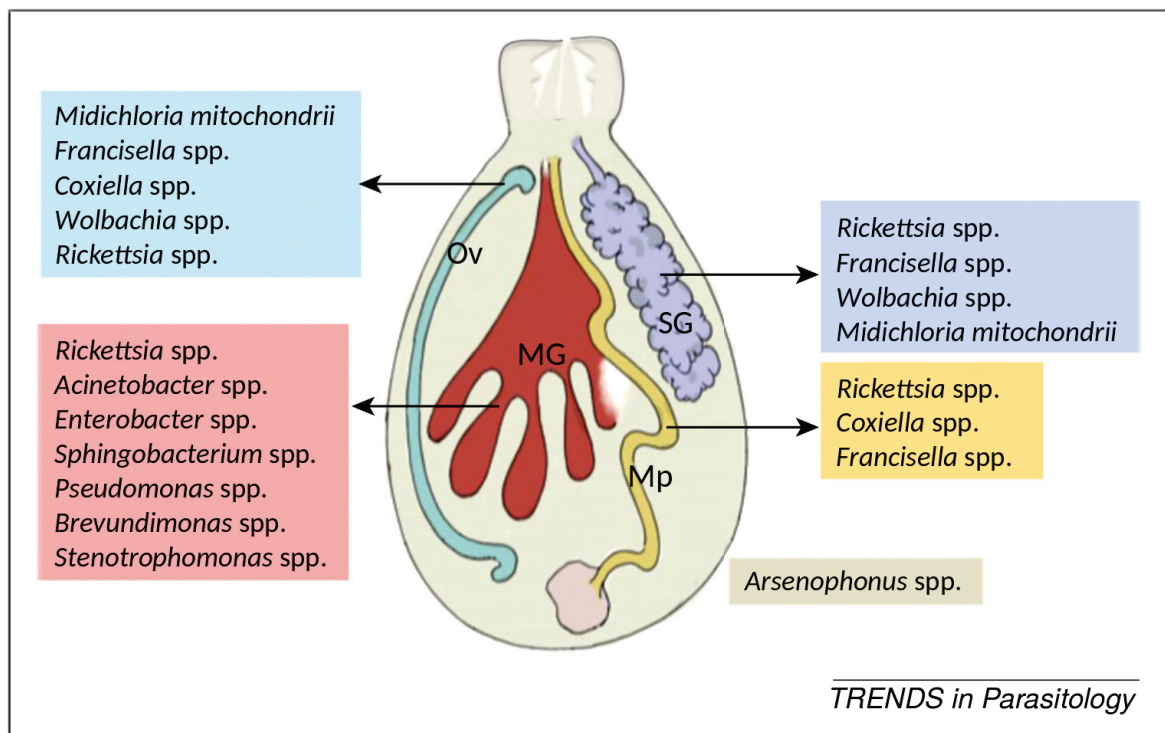


Figure i.6 | **Symbiotes communs de tiques et leurs localisation.**

Ov : Ovaire, MG : Intestin (Mid-Gut), Mp : Tube de Malphigi, SG : Glandes salivaires (Narasimhan et al. 2014)

Les tiques sont souvent co-infectées par plusieurs symbiotes ayant des stratégies symbiotiques s'étalant sur l'ensemble du continuum mutualisme-parasitisme. Ainsi des micro-organismes très différents sont présents simultanément chez des individus et interagissent avec leur hôte mais aussi entre eux (Clay et al., 2008; Andreotti et al., 2011; Carpi et al., 2011; Lalzar et al., 2012; Vayssier-Taussat et al., 2013; Narasimhan et al., 2014; Qiu et al., 2014; Williams-Newkirk et al., 2014; Bonnet et al., 2017; Duron et al., 2017). On sait que certains symbiotes empêchent la transmission de certains pathogènes. Par exemple, chez la tique *D. andersoni*, la présence de *Rickettsia peacockii* altère la transmission du pathogène *Rickettsia rickettsii*, responsable de fièvres boutonneuses (Burgdorfer et al. 1981). Le microbiote intestinal a aussi un rôle important dans la colonisation des tiques par la bactérie transmettant la maladie de Lyme, *Borrelia burgdorferi* (Narasimhan et al., 2014).

L'étude des symbiotes de tiques a déjà permis d'identifier des symbiotes hors du commun, comme "*Candidatus* *Midichloria mitochondrii*" (Sassera et al., 2006). Le rôle de ce symbiote, fixé chez son hôte *Ixodes ricinus*, n'est pas connu, même si la présence de gènes impliqués dans la synthèse de vitamines B dans son génome pourrait suggérer un rôle nutritionnel (Sassera et al., 2011). Mais ce symbiote a la particularité d'être la seule bactérie infectant les mitochondries connue à ce jour (Sassera et al., 2006). Cela montre l'incroyable diversité des interactions qu'il reste à décrire chez les tiques où l'étude de ces symbiotes s'avère nécessaire pour mieux comprendre la biologie de ces arthropodes et mieux appréhender la transmission des pathogènes qu'ils vectorisent.

III. Les bactéries du genre *Coxiella*

1) *Coxiella burnetii*

En 1937, Edouard Holbrook Derrick décrit pour la première fois les symptômes de la fièvre Q (Query fever) qui touche notamment certains employés de l'abattoir de Brisbane. Lorsque le sang des sujets, atteints principalement de fièvre, est injecté à des cochon-d'indes, ceux-ci développaient également des symptômes. Burnet a alors isolé l'agent pathogène dans la rate des cochons d'inde infectés et l'a décrit comme une bactérie *Rickettsia*-like. Davis et Cox du Rocky Mountain Laboratory aux États-Unis parviennent à cultiver cette bactérie sur des tissus embryonnaires de poulet en tentant d'isoler et de cultiver les *Rickettsia* de tiques afin d'étudier les rickettsioses qui leur sont associées (Davis & Cox, 1938). Il devient alors clair que cette bactérie isolée à partir d'une tique n'est pas une *Rickettsia* mais appartient à un genre nouveau. Pour honorer les personnes à l'origine de sa découverte, elle sera baptisée *Coxiella burnetii*.

Coxiella burnetii est une bactérie de type Gram négatif appartenant à l'ordre des Légionellales (Figure i.7) (Regnery & Mcdade, 1990; Maurin & Raoult, 1999).

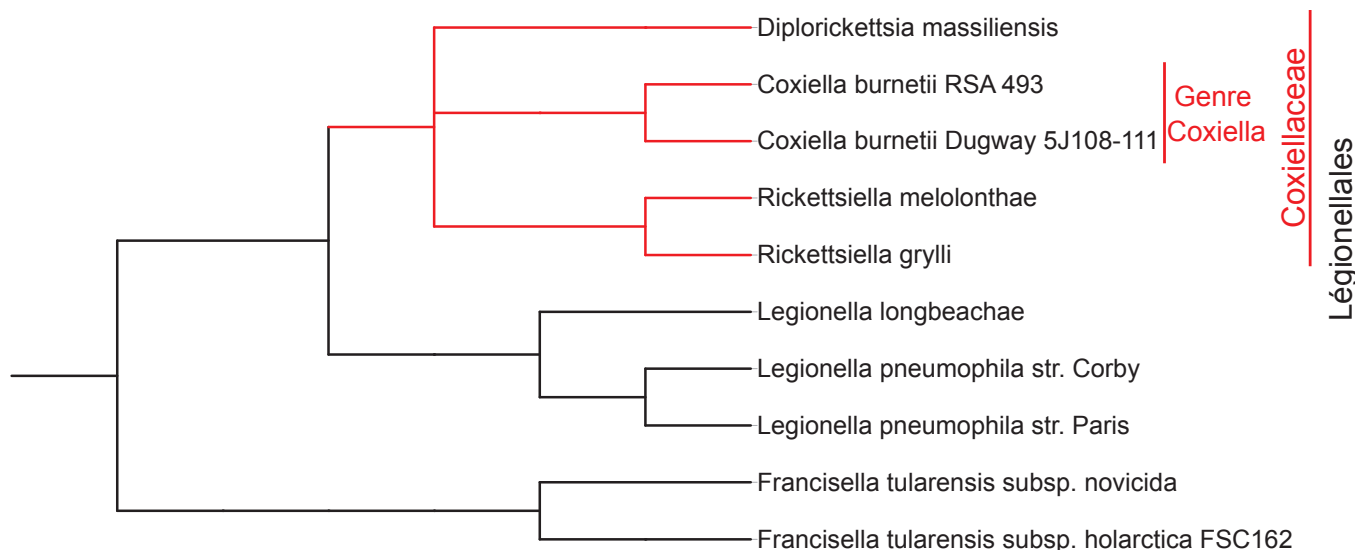


Figure i.7 | Cladogramme indiquant la position du genre *Coxiella* au sein des Légionellales.

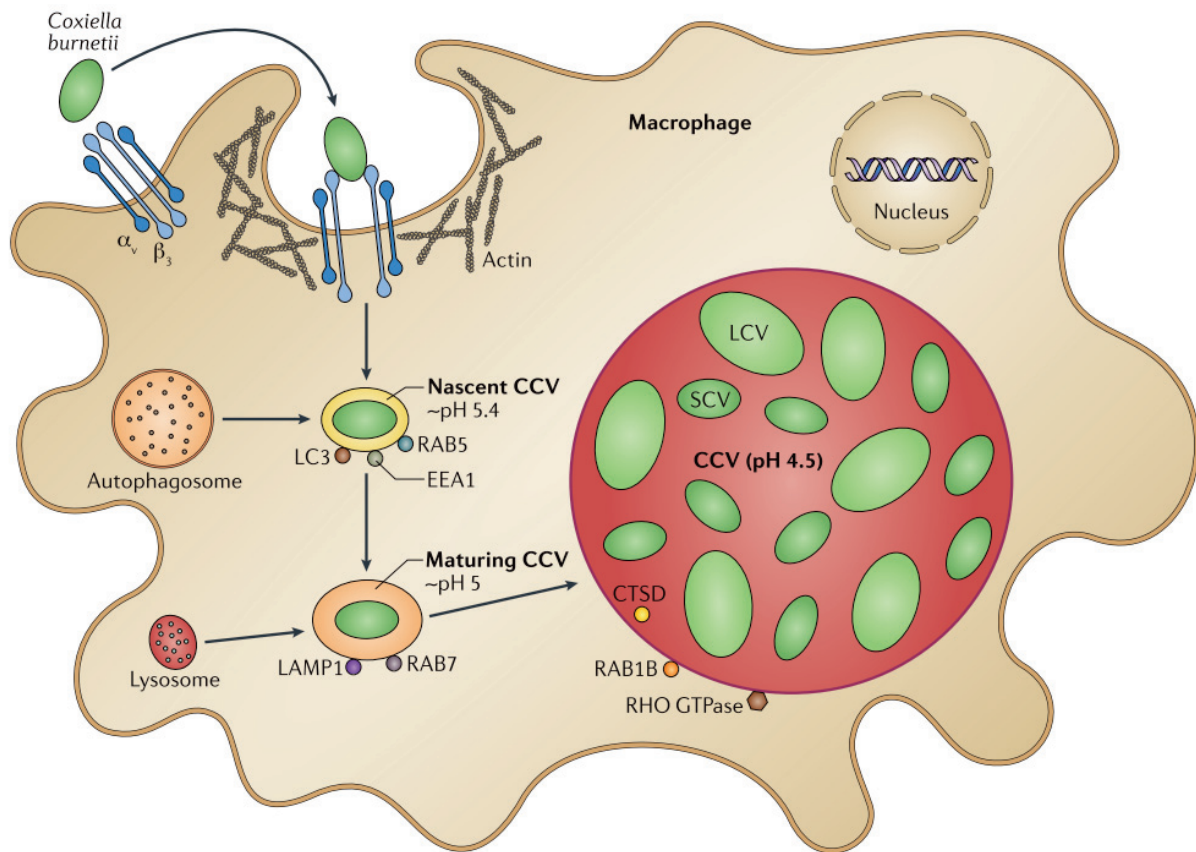
Elle est considérée comme l'une des bactéries les plus infectieuses, avec une ID50 (dose permettant d'infecter 50 % des sujets traités) d'une seule bactérie (Madariaga *et al.*, 2003). Bien qu'elle soit considérée comme intracellulaire stricte, elle possède un variant cellulaire capable de survivre de manière libre dans l'environnement. Ce variant est métaboliquement inactif mais est très résistant aux stress environnementaux, tels que les changements de température ou de pression osmotique (Coleman *et al.*, 2004, 2007). C'est

principalement sous cette forme quasi-sporulée que la bactérie infecte son hôte lors d'inhalation d'aérosols contaminés. De part ces caractéristiques *C. burnetii* est considérée comme une arme bactériologique et compte parmi les agents cultivés par les super-puissances au plus fort de la guerre froide (Madariaga *et al.*, 2003).

Chez l'homme, l'infection par *C. burnetii* est généralement facilement traitable grâce à l'utilisation combinée de plusieurs antibiotiques. La fièvre Q est caractérisée par des symptômes grippaux auxquels peuvent s'ajouter des pneumopathies atypiques dans sa phase dite « aiguë ». La phase chronique, qui apparaît plutôt chez des sujets immunodéprimés, peut évoluer en hépatite ou endocardite sévère et est à l'origine d'une mortalité significative (Maurin & Raoult, 1999).

C. burnetii a développé des mécanismes pour infecter et survivre à l'intérieur de ces cellules hôtes. Elle infecte principalement les macrophages alvéolaires en utilisant leur capacité de phagocytose. Les bactéries pathogènes qui empruntent cette voie utilisent généralement des stratégies empêchant la maturation des phagosomes. *C. burnetii* n'intervient pas dans ce phénomène et l'utilise plutôt à son avantage. L'acidification des phagolysosomes permet en effet un changement de variant cellulaire chez *C. burnetii*, ce qui la rend métaboliquement active. La bactérie va alors utiliser la maturation de ce compartiment pour créer une vésicule appelée « *Coxiella* containing vacuole » (CCV) dans laquelle elle pourra se répliquer tout en sécrétant des effecteurs dans la cellule hôte (van Schaik *et al.*, 2013). Pour cela elle dispose d'un système de sécrétion de type IV proche de celui utilisé par *Legionella pneumophila* (Seshadri *et al.*, 2003; Zamboni *et al.*, 2003; Zusman *et al.*, 2003). Les effecteurs sécrétés dans le cytoplasme vont détourner de nombreuses voies métaboliques cellulaires, ils vont par exemple inhiber l'apoptose de ces cellules et ainsi former une niche propice à la multiplication des bactéries. Le processus d'invasion de *Coxiella burnetii* et les manipulations génétiques de cet agent pathogène sont décrits dans l'encadré (Box i.1).

Grâce à ses caractéristiques si particulières, *Coxiella burnetii* est capable d'infecter un large spectre d'hôtes, et notamment de nombreuses espèces de vertébrés. Pendant longtemps le rôle des tiques dans la transmission de ce pathogène a été mis en avant (Madariaga *et al.*, 2003), pourtant la présence de *C. burnetii* est rare au sein de ces arthropodes (Duron *et al.*, 2015a; Duron *et al.*, 2015b). La transmission principale semble s'effectuer par aérosols de matières contaminées. Ainsi les animaux domestiques sont particulièrement exposés. Notamment les petits ruminants où les manifestations cliniques les plus fréquentes sont des avortements tardifs. De fait, cette bactérie a un impact en santé publique mais a aussi un impact économique important (Kampschreur *et al.*, 2014).



Box i.1 | Cycle de *Coxiella burnetii* au sein de ses cellules hôtes
(van Schaik et al., 2013)

1. *Coxiella burnetii* sous sa forme SCV s'accroche aux macrophage alvéolaires grâce à l'intégrine $\alpha_v\beta_3$ enclenchant sa phagocytose via un mécanisme actine dépendant.
2. Un phagosome va alors se former et constitue alors la CCV en devenir. Ce compartiment présente un pH acide ($\sim 5,4$). L'acidification est une caractéristique normale de cette réaction immunitaire innée.
On remarque la présence de protéines associées à des microtubules, les LC3. Ces protéines sont des marqueurs de l'autophagie et ne sont normalement pas retrouvées lors de la phagocytose. L'acquisition de ces protéines hôtes est donc dépendante d'effecteurs bactériens.
3. Entre 1h et 2h après son internalisation, le pH de la CCV continue de diminuer sous l'action d'enzymes lysosomiales. De nombreux pathogènes intracellulaires tentent d'empêcher ce phénomène pour subsister, mais dans le cas de *C. burnetii*, l'acidité semble entraîner la transition SCV \rightarrow LCV, ce qui rend la bactérie métaboliquement active.
4. Après 8h d'internalisation la CCV va croître jusqu'à occuper la plupart du compartiment cytoplasmique. *C. burnetii* va alors se répliquer tout en manipulant sa cellule hôte grâce à un système de sécrétion (dot/Icm) lui permettant de sécréter des effecteurs dans le cytoplasme de celle-ci. *C. burnetii* empêche de la sorte l'apoptose de cette cellule fortement impactée par cette infection. Elle va aussi profiter de certaines voies métaboliques de la cellule pour produire des membranes nécessaires à l'expansion de la CCV, mais aussi pour puiser les nutriments lui permettant de se répliquer rapidement.

2) *Coxiella*-like endosymbiotiques

Pendant longtemps *Coxiella burnetii* était considérée comme la seule représentante du genre *Coxiella*. Mais depuis l'utilisation intensive du séquençage de l'ARN 16S pour identifier et caractériser la diversité bactérienne, de nombreuses bactéries ayant des séquences proches de *C. burnetii* ont été observées.

Ainsi durant ces dernières années, de nombreuses bactéries '*Coxiella*-like' ont été découvertes, infectant différentes espèces de tiques où leur prévalence est généralement élevée (Mediannikov *et al.*, 2003; Klyachko *et al.*, 2007; Zhong *et al.*, 2007; Lalzar *et al.*, 2012, 2014; Liu *et al.*, 2013). En plus de ces prévalences importantes, des études ont révélé que ces symbiotes sont transmis de manière verticale de femelles à descendants, pouvant suggérer un rôle important sur les traits de vie de leur hôte (Clay *et al.*, 2008; Machado-Ferreira *et al.*, 2011; Lalzar *et al.*, 2014). Zhong *et al.* ont de plus montré que l'utilisation d'antibiotiques dirigés contre ces *Coxiella*-like endosymbiotiques (*Coxiella*-LE) entraînait une réduction de la valeur sélective chez la tique *Amblyomma americanum* (Zhong *et al.*, 2007). Les tiques ne possédant pas de bactériomes, la localisation de ces symbiotes ne permet pas de définir s'ils sont obligatoires ou facultatifs. Toutefois une étude a montré que ces bactéries colonisaient principalement les cellules des tubes de Malphigi (Lalzar *et al.*, 2014). La *Figure i.6* montre les images obtenues dans cette étude par microscopie confocale des organes de *R. turanicus* infectés par des *Coxiella*-LE. Les tubes de Malphigi sont des organes excréteurs permettant aux arthropodes de filtrer les déchets azotés. La présence de ces *Coxiella*-LE peut avoir un lien avec le recyclage de l'azote chez leur hôte. Toutefois la proximité de ces organes avec le tube digestif permet également d'envisager qu'il s'agit d'une symbiose nutritive.

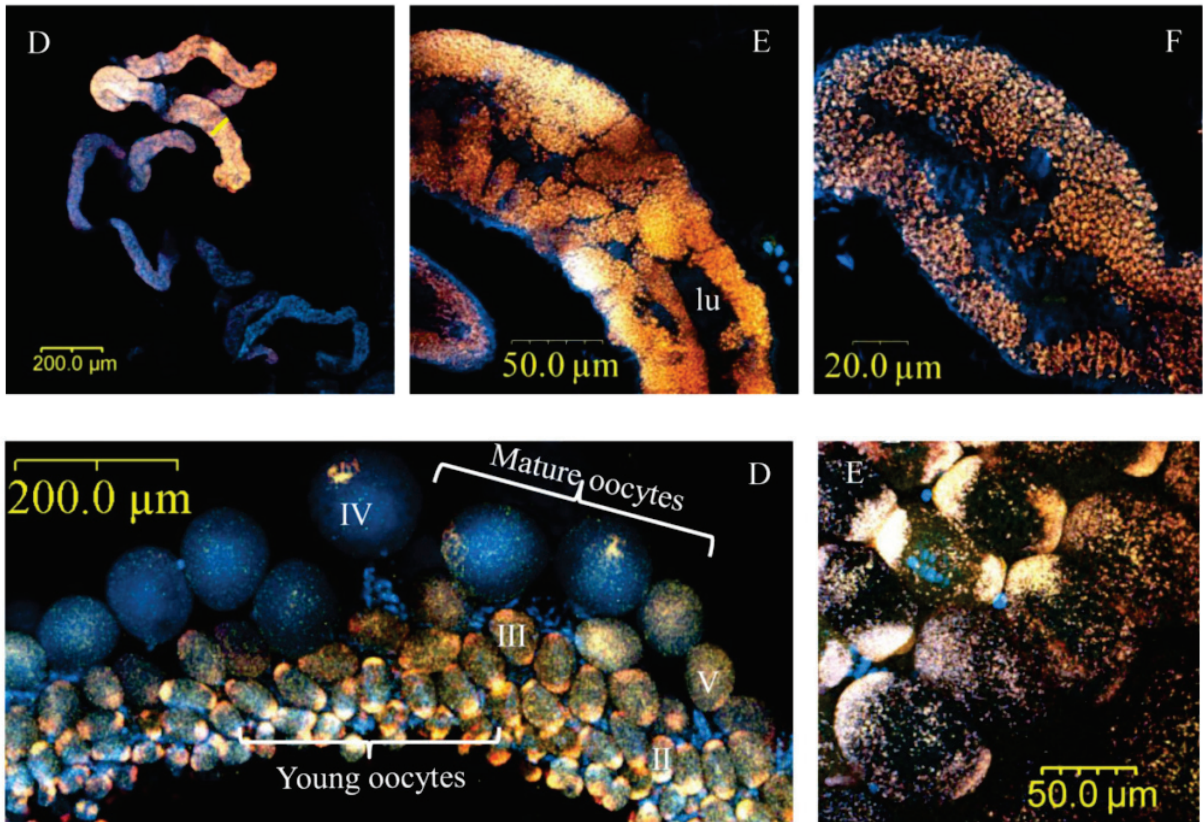


Figure i.8 | Localisation des *Coxiella*-LE chez *Rhipicepalus turanicus*
 en haut : dans les tubes de Malpighi
 en bas : dans les ovaires de femelles gorgées
 (Lalzar et. 2014)

Les tiques sont des hématophages strictes. Ce régime alimentaire pauvre en vitamine B devrait nécessiter une complémentation symbiotique. Pourtant aucun symbiote remplissant cette fonction n'a été identifié chez les tiques. Récemment le génome de la bactérie *Coxiella*-LE infectant l'espèce *Amblyomma americanum* (appelé CLEAA) a été séquencé et semble confirmer l'hypothèse que les *Coxiella*-LE pourraient jouer ce rôle (Smith et al., 2015). En effet, comme les génomes de symbiotes primaires, le génome de CLEAA est extrêmement réduit avec une taille de seulement 657kb, mais il a conservé toutes les voies nécessaires à la biosynthèse de vitamines B.

Si le génome de référence de *Coxiella burnetii* (RSA493) a été séquencé à partir d'une tique échantillonnée aux États-Unis (Davis & Cox, 1938) (près de Nine-mile, d'où l'utilisation de ce nom pour qualifier les souches de *Coxiella burnetii*), la présence de cette bactérie est rare chez ces arthropodes. Une phylogénie moléculaire du genre *Coxiella* réalisée préalablement à mon arrivée dans l'équipe montre la diversité de ces bactéries et l'importance

de les étudier (*Figure i.7*). La place de *C. burnetii* au sein d'endosymbiotes de tiques pose notamment la question de l'évolution de la virulence dans ce genre bactérien. Toutefois cette phylogénie, réalisée en comparant des séquences de gènes de l'ARNr 16S, n'est pas assez robuste pour établir l'histoire évolutive du genre *Coxiella*.

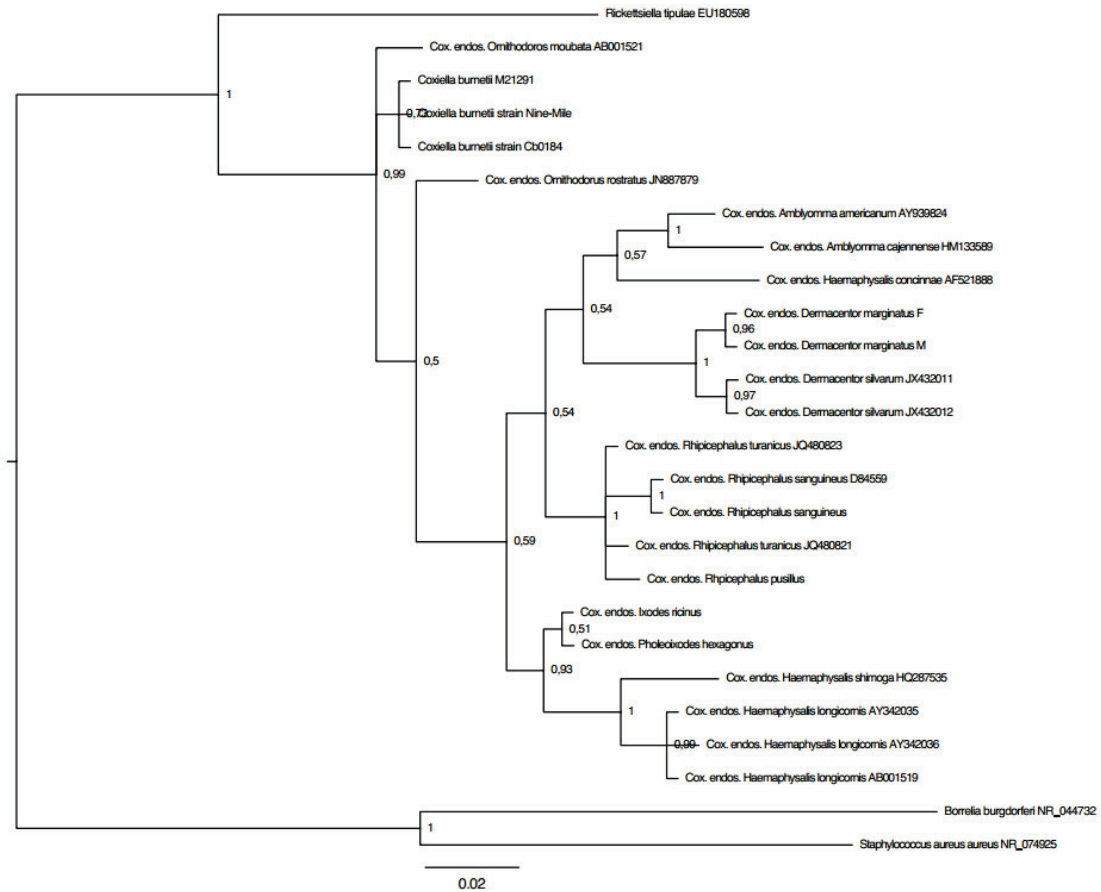


Figure i.7 | **Phylogénie 16S du genre *Coxiella***

IV. Plan de thèse et objectif général

Les interactions symbiotiques façonnent le monde du vivant. Des transitions dans la nature des associations – du parasitisme au mutualisme et réciproquement – ou même des changements de partenaires peuvent avoir des conséquences importantes. De tels événements peuvent, par exemple, conduire à l'émergence de nouveaux pathogènes, ce qui représente une menace pour la santé mais aussi pour l'économie.

Pour étudier ces transitions symbiotiques mon travail de thèse s'est focalisé sur l'étude des bactéries du genre *Coxiella*. Si *C. burnetii* est un agent pathogène bien connu car responsable d'une zoonose, la fièvre Q, d'autres bactéries apparentées ont récemment été découvertes et feraient aussi partie de ce genre bactérien. Ces « *Coxiella*-Like » endosymbiotiques de tiques (*Coxiella*-LE) semblent avoir des interactions mutualistes avec leurs hôtes arthropodes. Les *Coxiella*-LE sont, en effet, retrouvées en forte prévalence chez de nombreuses espèces de tiques et pourraient avoir un rôle nutritionnel pour leur hôte. Le genre *Coxiella* est ainsi un excellent modèle pour étudier les transitions symbiotiques car il regroupe des types d'interactions correspondant aux extrêmes du continuum mutualisme-parasitisme.

Les tiques sont, de plus, des arthropodes hématophages qui ont la capacité de vectoriser de nombreux agents pathogènes. Leur mode de vie permet ainsi le contact entre différents organismes et toutes les communautés de micro-organismes associées. Ces caractéristiques permettraient à ces arthropodes de faciliter les transitions symbiotiques de micro-organismes et justifient l'étude de leurs symbiotes.

L'objectif de mon travail de thèse a été de comprendre les relations qu'entretiennent les *Coxiella*-LE avec leur hôte tique, mais aussi d'étudier l'évolution de la virulence dans ce genre bactérien. Ces deux axes de travail avaient pour but de répondre à deux questions principales constituant mon projet de thèse : (i) quels rôles jouent les *Coxiella* endosymbiotiques dans la biologie des tiques, et (ii) Comment *C. burnetii* a-t-elle acquis son pouvoir pathogène?

Dans la première partie de ce manuscrit, nous allons nous intéresser à l'histoire évolutive du genre *Coxiella*. Pour cela, un premier chapitre s'intéresse à la phylogénie du genre. En effet, des phylogénies incluant des *Coxiella*-LE ont déjà été présentées par le passé, mais celles-ci n'étaient pas assez résolutes. Une phylogénie robuste peut ainsi nous éclairer sur les transitions évolutives ayant façonné ce genre bactérien.

Dans un deuxième chapitre, grâce au séquençage de deux nouveaux génomes de *Coxiella*-LE, une analyse de génomique comparative a été réalisée au sein du genre *Coxiella*. Cette analyse a pour but de montrer quels sont les gènes partagés par les *Coxiella* infectant ces arthropodes et impliqués dans la symbiose avec les tiques, ainsi que les gènes responsables de la virulence de *C. burnetii*.

La deuxième partie se concentre plus sur la relation symbiotique entre les *Coxiella*-LE et leur hôte tique. Pour cela l'impact de la co-infection entre *Coxiella* endosymbiotiques et d'autres bactéries facultatives pour leur hôte a été étudié au sein d'une population naturelle de tiques appartenant à l'espèce *Dermacentor marginatus*.

Enfin nous discuterons des points importants de ce manuscrit, en résumant le rôle des *Coxiella*-LE pour leur hôte tique et en analysant l'évolution de la virulence dans le genre *Coxiella*. Ces aspects étudiés dans le cas précis de la symbiose *Coxiella*-Tique, nous permettront ensuite de discuter des mécanismes impliqués dans les transitions symbiotiques. Pour cela l'impact du mode de transmission et le rôle des arthropodes seront évoqués.

Première partie :

Histoire évolutive du genre *Coxiella*

Chapitre I : Analyse Phylogénétique du genre *Coxiella*

Si les mécanismes permettant à *C. burnetii* d'infecter et de manipuler ses cellules hôtes sont largement étudiés, les origines de cette bactérie ne sont pas connues d'un point de vue évolutif. Si des bactéries très proches sont retrouvées chez des espèces de tiques, les relations entre ces *Coxiella*-LE et l'agent pathogène responsable de la fièvre Q restent à établir précisément.

Pour comprendre l'évolution du genre *Coxiella*, il est important de disposer d'une phylogénie robuste. En effet, la lecture d'un arbre phylogénétique permet de définir les liens de parenté entre différents organismes, et dans le cas des symbioses, il est aussi possible de détecter des indices sur la relation des deux partenaires en comparant les arbres phylogénétiques des symbiotes et des hôtes. Ainsi, une phylogénie du genre *Coxiella* serait un élément précieux pour étudier la relation entre les *Coxiella* endosymbiotiques de tiques et le pathogène *C. burnetii*, mais aussi pour comprendre la relation entre ces *Coxiella*-LE et leurs hôtes tiques. Si l'utilisation du séquençage de l'ARN 16S a permis l'identification de nombreuses *Coxiella*-LE chez les tiques, l'utilisation seule de ces séquences ne permet pas d'obtenir des arbres phylogénétiques robustes. Cette séquence est très conservée entre différentes espèces du même genre bactérien et, dans certains cas, ne permet pas d'atteindre le niveau de résolution nécessaire à la construction d'une phylogénie exploitable. Pour palier à ce problème, la solution est de créer un arbre phylogénétique issu de l'alignement de plusieurs séquences de gènes (Multi Locus Sequence Typing, MLST) (Baldo *et al.*, 2006; Leclercq & Kleespies, 2012). Les gènes sélectionnés doivent être des gènes de ménage, peu soumis aux transferts horizontaux et présents chez tous les organismes étudiés, mais aussi chez des organismes plus ou moins distants qui vont permettre de créer des groupes externes. Olivier Duron (UMR5290, Mivegec, Montpellier) a déjà réalisé plusieurs projets de ce type et a récemment intégré une équipe travaillant sur les tiques. Au démarrage de mon projet de thèse, il avait initié un travail pour réaliser la phylogénie du genre *Coxiella*. Son approche consistait à réunir le plus d'espèces de tiques possibles et grâce à de nombreux contacts à l'étranger, il a pu réunir une impressionnante collection d'espèces. Seulement quelques individus par espèces

étaient séquencés, tandis que de mon côté j'avais séquencé de nombreuses *Coxiella*-LE provenant d'espèces de tiques plus communes en France. Ainsi pour certaines espèces où la prévalence en *Coxiella*-LE est faible, comme pour les tiques *Ixodes ricinus*, j'ai pu obtenir des individus infectés et donc des séquences de *Coxiella*-LE à ajouter à la phylogénie. C'est ainsi que ces deux approches complémentaires ont permis une collaboration avec Olivier Duron sur l'analyse phylogénétique des *Coxiella*. Ce travail s'est concrétisé par une publication mettant en avant la diversité existante au sein du genre *Coxiella* (Duron et al. 2015, Annexe1), dans laquelle je suis co-auteur.

I. Diversité génétique chez les *Coxiella*-like endosymbiotiques de tiques

Afin de construire cette phylogénie du genre *Coxiella*, 916 tiques provenant de 58 espèces différentes ont été étudiées. Parmi les espèces de tiques utilisées, 36 appartiennent au sous-ordre Ixodina (communément appelé « tiques dures »), tandis que 22 sont des « tiques molles » appartenant donc à la famille des Argasidae.

La présence de bactéries *Coxiella*-LE chez ces différentes tiques a été recherchée par détection en PCR nichée d'un fragment de 539-542bp du gène *rpoB*. Pour définir ces primers l'utilisation des génomes des 15 souches de références de *C. burnetii* a été nécessaire. De cette manière, il a été démontré que les tiques sont couramment infectées par des organismes *Coxiella*-LE, puisque 70 % des espèces de tiques étudiées se sont avérées porteuses de ce genre de bactéries. De plus chez la plupart de ces espèces, la prévalence de ces bactéries est très forte (>90%). Ainsi l'infection de *Coxiella*-LE semble être quasiment fixée chez la plupart des espèces de tiques des genres *Rhipicephalus* et *Ornithodoros*. En revanche les *Coxiella*-LE sont rarement retrouvées au sein des tiques du genre *Ixodes* et leur prévalence y est extrêmement variable.

Pour caractériser la diversité génétique au sein de ces bactéries, Duron *et al.* ont développé une méthode de MLST basée sur 5 gènes conservés chez les bactéries : *rpoB*, 16S ARNr, 23S ARNr, *GroEL* et *dnaK*. Ces 5 gènes ont été correctement amplifiés à partir de 71 bactéries *Coxiella*-LE provenant de 36 espèces de tiques. Pour 5 autres espèces de tiques, seuls 3 à 4 de ces gènes ont été correctement amplifiés. Les résultats montrent une importante diversité génétique au sein de ces bactéries avec un nombre d'allèles compris entre 33 à 40

pour chaque gène. Cette forte diversité contraste avec la faible variabilité observée entre les souches de *C. burnetii* (Tableau 1.1). De plus chaque espèce de tique étudiée est infectée par un génotype spécifique ou par plusieurs génotypes très proches, ce qui semble indiquer que les *Coxiella*-LE sont hôtes spécifiques.

Locus	Function	L	Strains	N _i	P _{nsi}	N _a	P _s	A _d	π	D
16S rRNA	Small ribosomal subunit	1066	<i>Coxiella</i> -like organisms	85	93.0–100	40	262	0.985	0.038	39.960
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.7–100	4	4	0.552	0.001	1.224
23S rRNA	Large ribosomal subunit	496	<i>Coxiella</i> -like organisms	82	84.2–100	34	177	0.978	0.079	39.393
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.4–100	2	2	0.133	0.001	0.267
GroEL	Chaperone protein GROEL	550	<i>Coxiella</i> -like organisms	82	68.7–100	37	292	0.982	0.179	98.527
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.4–100	5	5	0.562	0.002	0.895
rpoB	DNA-directed RNA polymerase beta chain	474	<i>Coxiella</i> -like organisms	85	68.7–100	38	250	0.981	0.205	97.136
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.3–100	4	4	0.467	0.001	0.648
dnaK	Chaperone protein DNAK	423	<i>Coxiella</i> -like organisms	74	69.6–100	33	227	0.979	0.177	75.789
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.8–100	3	1	0.362	0.001	0.381
Full concatenated data set		3009	<i>Coxiella</i> -like organisms	71	81.8–100	36	1139	0.984	0.115	346.990
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.6–100	7	16	0.781	0.001	2.933

Tableau 1.1 | Estimation de la diversité génétique pour 85 souches de *Coxiella*-LE et 15 souches références de *C. burnetii*

Analyses basées sur les séquences nucléotidique de 5 gènes de ménage. L, longueur de la séquence (en bp); N_i, nombre de souches étudiées; P_{nsi}, homologie des séquences nucléotidiques appariées (%); N_a, nombre d'allèles ; P_s, nombre de sites polymorphiques ; A_d, diversité allélique, π diversité nucléotidique ; D, nombre moyen de nucléotides différents entre les séquences

II. L'ancêtre de *C. burnetii* serait une bactérie endosymbiotique de tique

Un alignement de séquences de plus de 3000bp issues de la concaténation des 5 séquences codant pour les gènes étudiés a permis l'analyse phylogénétique du genre *Coxiella*. Des arbres phylogénétiques ont été créés en utilisant la méthode de maximum de vraisemblance avec 1000 répliquats pour les bootstraps afin d'obtenir des résultats robustes (bootstrap >90) ainsi qu'un réseau phylogénétique. Ce réseau est basé sur l'alignement de séquences provenant de 71 souches de *Coxiella* endosymbiotiques de tiques, 15 souches de *Coxiella burnetii* ainsi que d'autres séquences bactériennes, notamment des séquences de *Rickettsiella* issues des tiques étudiées. Des tests de recombinaison ont montré que les bactéries *Coxiella* et *Rickettsiella* de cette étude ne semblent pas partager une structure clonale mais ont vraisemblablement fait l'expérience d'échanges génétiques. La construction d'un réseau phylogénétique a permis d'intégrer ces éléments de recombinaison au sein de la reconstruction phylogénétique.

Les résultats obtenus montrent clairement que le genre *Coxiella* est divisé en 4 clades bien définis (*Figure 1.1*). Chaque clade représente un groupe de génotypes présents dans 5 à 15 espèces de tiques. Le positionnement des génotypes de *Coxiella* correspondant à une espèce spécifique de tique (numéros dans *Figure 1.1*) témoigne d'une structure complexe, indiquant une histoire évolutive à la fois impactée par la co-divergence et des transferts horizontaux. Par exemple, toutes les bactéries *Coxiella*-LE infectant les 12 espèces de tiques du genre *Rhipicephalus* étudiées se regroupent dans le clade C et il en va de même pour les *Coxiella*-LE des tiques du genre *Ixodes* qui se regroupent toutes dans le clade B. Pourtant, certaines bactéries *Coxiella*-LE infectant des espèces de tiques apparentées ne se regroupent pas forcément dans le même clade. Par exemple, les bactéries infectant les tiques du genre *Ornithodoros* sont retrouvées dans les clades A, B et C ce qui suggère des transferts horizontaux de ces symbiotes entre différentes espèces de tiques.

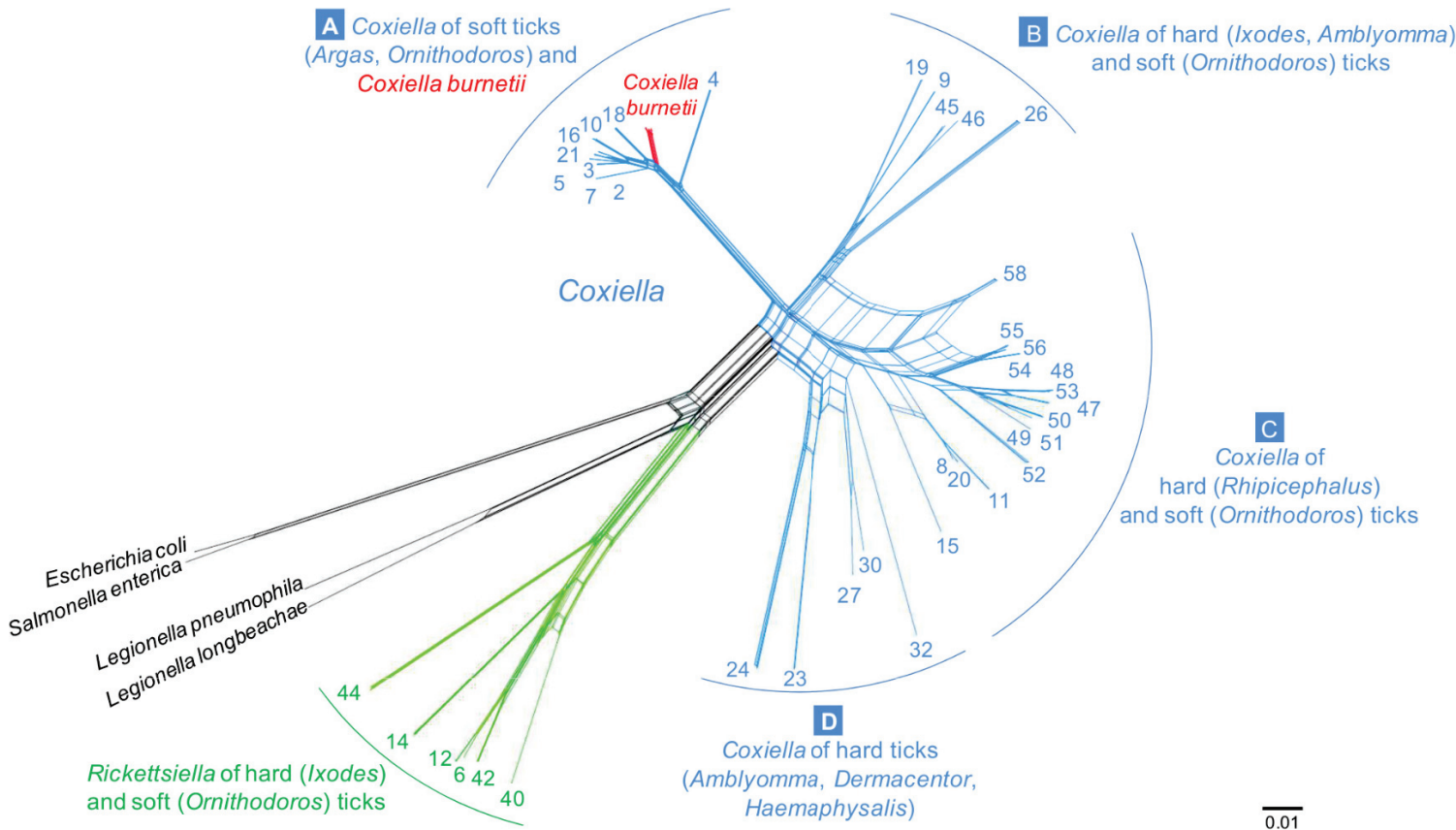


Figure 1.1 | Réseau phylogénétique des *Coxiella*

Quatre clades de *Coxiella* sont annotés de A à D. Chaque numéro correspond à une espèce de tique. En Bleu – *Coxiella*-LE; en Rouge – *C. burnetii* ; en Vert – *Rickettsiella* ; en Noir – autres bactéries. Les unités de l'échelle correspondent à des substitutions/site.

(Duron et al., 2015)

Enfin, la présence de tous les génotypes de *C. burnetii* au sein d'un groupe monophylétique émergeant dans le clade A avec d'autres *Coxiella*-LE est des plus intéressante. Le fait de retrouver cette bactérie virulente dans un clade de bactéries endosymbiotiques de tiques remet en cause une émergence précoce de la pathogénie dans le genre *Coxiella*. En effet, le principe de parcimonie nous pousse à croire que l'ancêtre commun de toutes ces bactéries était un symbiote de tique et que la virulence de *C. burnetii* aurait émergée récemment.

Discussion

Dans ce premier chapitre, une phylogénie robuste des bactéries du genre *Coxiella* a été réalisée. Cette analyse confirme dans un premier temps que les bactéries retrouvées au sein des tiques et regroupées sous le nom de *Coxiella*-LE appartiennent bien au genre *Coxiella*. On observe ainsi une grande diversité génétique dans un genre où seules des souches de *Coxiella burnetii* avaient été formellement décrites. Les *Coxiella*-LE caractérisées ici semblent toutes spécifiques d'une espèce de tiques et sont toutes génétiquement différentes de *Coxiella burnetii*. Les *Coxiella*-LE sont capables de se transmettre verticalement au sein des populations de tiques infectées (Clay *et al.*, 2008; Machado-Ferreira *et al.*, 2011; Lalzar *et al.*, 2014), ce qui conforte l'idée qu'elles sont des endosymbiotes spécifiques de tiques. Les résultats obtenus semblent renforcer l'hypothèse d'un rôle nutritionnel des organismes *Coxiella*-LE pour leurs hôtes. Chez certains groupes de tiques, notamment celles appartenant au genre *Rhipicephalus*, on observe ainsi une présence systématique de symbiotes *Coxiella*-LE qui sont fixés chez leur espèce hôte. Pourtant cette caractéristique n'est pas partagée par les tiques du genre *Ixodes* où les prévalences en *Coxiella*-LE sont généralement faibles. Ainsi, si ces symbiotes pourraient être obligatoires pour certaines espèces de tiques, ils sont dispensables dans d'autres cas. Si les bactéries *Coxiella*-LE sont réellement responsables de la supplémentation en vitamines B chez certaines espèces de tiques, d'autres symbiotes doivent remplir ce rôle dans les espèces où ces bactéries ne sont pas fixées. De récents travaux montrent qu'une dizaine de symbiotes à transmission maternelle sont couramment retrouvés chez les tiques (Bonnet *et al.*, 2017; Duron *et al.*, 2017). Parmi eux, des bactéries proches de la bactérie pathogène *Francisella tularensis* semblent aussi être importantes chez les espèces de tiques infectées et pourraient donc jouer un rôle nutritionnel.

Le rôle des *Coxiella*-LE doit encore être formellement décrit. Cependant à l'échelle de certains genres de tiques de la co-cladogénèse entre ces bactéries et leurs hôtes a été observée, ce qui témoigne d'une relation intime entre ces deux partenaires symbiotiques (Duron *et al.*, 2017). Si les *Coxiella*-LE sont en effet des symbiotes primaires, leur phylogénie révèle alors une histoire évolutive très dynamique avec de nombreux transferts horizontaux, soit un patron très différent de celui observé pour d'autres symbiotes primaires comme *Buchnera*.

La position de *C. burnetii* au sein de la phylogénie des *Coxiella* indique que cette dernière a émergé au sein du clade A (*Coxiella*-LE de tiques molles) et donc au sein de bactéries symbiotiques de tiques. Cette position est cohérente avec une émergence unique et récente de ce pathogène, comme la faible diversité génétique entre les souches de *C. burnetii* par rapport à d'autres pathogènes intracellulaires, permettait de le supposer (Seshadri *et al.*, 2003). D'après cette phylogénie, les associations entre les bactéries du genre *Coxiella* avec les tiques semblent, en effet, beaucoup plus anciennes et intimes qu'avec des hôtes vertébrés.

Cette étude soulève d'importantes questions : comment une bactérie endosymbiotique de tique a-t-elle, au cours de son évolution, acquis les capacités d'infecter des cellules de vertébrés menant à l'émergence de *C. burnetii*, un pathogène extrêmement infectieux responsable d'épidémie de fièvre Q, partout dans le monde ? Comment de telles transitions peuvent se produire et quels sont les risques que d'autres pathogènes de vertébrés émergent au sein des *Coxiella* endosymbiotiques de tiques ?

L'utilisation de la génomique comparative semble un bon moyen de comprendre ces transitions ainsi que les mécanismes sous-jacents. Seulement, peu de génomes ont été séquencés. Outre différentes souches de *C. burnetii*, seuls deux génomes de *Coxiella*-LE sont connus et possèdent des caractéristiques très différentes (Gottlieb *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015). Pour mieux comprendre les relations de ces symbiotes avec leur hôte, mais aussi pour étudier l'évolution de la virulence dans ce genre bactérien, le séquençage de nouveaux génomes est donc nécessaire.

Chapitre II : Génomique comparative des bactéries du genre *Coxiella*

Afin de comprendre l'évolution des bactéries appartenant au genre *Coxiella*, des analyses de génomique comparative sont nécessaires. Si aucun génome de *Coxiella*-LE n'était disponible au début de ma thèse, deux génomes de *Coxiella*-LE ont été séquencés depuis, et présentent des caractéristiques bien différentes. La *Coxiella*-LE de la tique *Amblyomma americanum* (CLEAA) possède un génome extrêmement réduit avec seulement 0,6Mb, alors que le génome de la *Coxiella*-LE de la tique *Rhipicephalus turanicus* (CRt) est trois fois plus grand et a une taille proche de celle des génomes de *C. burnetii*. Ces deux génomes possèdent en revanche les voies de biosynthèse de la vitamine B (Gottlieb *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015). Afin de mieux comprendre la relation qu'entretiennent ces bactéries avec leur hôte, mais aussi pour comprendre l'évolution de la virulence dans ce clade de bactéries endosymbiotiques, nous avons séquencé deux autres génomes de *Coxiella*-LE. Le premier est le génome de la *Coxiella*-Like Endosymbiotique de la tique *Dermacentor marginatus* (CLEdM), qui appartient au même clade que CLEAA d'après la phylogénie du genre (Duron *et al.*, 2015a). Ce génome sera utile pour comprendre l'érosion génomique dans le genre *Coxiella*. Le second génome séquencé est celui de la *Coxiella*-LE de la tique *Ornithodoros maritimus* (CLEOmar). Cette bactérie étant très proche phylogénétiquement de *C. burnetii* (clade A), l'étude de son génome sera utile pour comprendre l'évolution de la virulence dans le genre *Coxiella*.

Cette analyse a permis de caractériser les fonctions nécessaires à la symbiose des *Coxiella*-LE avec les tiques en identifiant des gènes conservés chez l'ensemble de ces bactéries. La comparaison de ces génomes avec ceux connus de *C. burnetii* avait aussi pour objectif d'identifier les gènes responsables de l'apparition de la virulence au sein du genre *Coxiella*. En fait, l'histoire évolutive du genre *Coxiella* s'est avérée plus complexe qu'attendue. Si la phylogénie du genre *Coxiella* semblait indiquer un ancêtre commun endosymbiotique, la découverte de gènes associés à la virulence de *C. burnetii* fonctionnels ou à l'état de pseudogènes, chez différentes *Coxiella*-LE, remet en cause cette hypothèse.

Article :

Evolutionary history of the genus *Coxiella* : Phylogeny and Genomic tell different stories about the emergence of pathogenicity

Olivier Morel^{1*}, Olivier Duron², Lisa Klasson³, Valérie Noël², Adil El Filali¹, Hélène Henri¹,
Karen McCoy², Christine Chevillon², Lionel Zenner¹ and Fabrice Vavre¹

¹Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive (LBBE), Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5558) - Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

²Laboratoire MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5290) – Institut pour la Recherche et le Développement (UR224) – Université de Montpellier, Montpellier, France

³Molecular Evolution, Department of Cell and Molecular Biology, Uppsala University, Sweden

Abstract :

Coxiella burnetii, the responsible agent of Q fever, causes acute and chronic infections in many vertebrate species. Recently, *Coxiella*-Like Endosymbionts (*Coxiella*-LE) have been discovered in many tick species, and phylogenetic analyses suggest that *C. burnetii* has recently emerged among these tick endosymbionts, raising the question of the evolutionary history of this bacterial genus and notably of the emergence of pathogeny. *Coxiella*-LE seem specialized to their tick hosts, where they could behave as nutritional symbionts by providing them B vitamins and cofactors absent from their blood-restricted diet, as suggested by the presence of these biosynthetic pathways in the only two genomes of *Coxiella*-LE sequenced to date. Here, we sequenced two novel *Coxiella*-LE complete genomes belonging to different clades of *Coxiella*: a *Coxiella*-LE from *Dermacentor marginatus* (CLEDM) and another from *Ornithodoros maritimus* ticks (CLEOmar), the closest relative of *C. burnetii* sequenced to date. All *Coxiella* genomes have conserved the genes involved in B vitamins biosynthesis, reinforcing the hypothesis that *Coxiella*-LE have a nutritional role in ticks. Strikingly, some of these genomes, and notably CLEOmar, still possess genes and/or pseudogenes linked to virulence in *C. burnetii*, contradicting the hypothesis of a recent emergence of virulence in *C. burnetii*. These results open the possibility that extinct or extant pathogenic *Coxiella* are missing to reconcile phylogenetic and genomic approaches and rather support repeated evolution towards mutualism in ticks.

Keywords : *Coxiella*, ticks, symbiosis, Genome reduction, virulence.

INTRODUCTION

With the exception of New Zealand, Q fever is a zoonosis occurring worldwide and responsible for outbreaks, usually on livestock, with important economic issues (Kampschreur *et al.*, 2014). Livestocks, especially goats and sheeps, are the primary host reservoir for human infections (Madariaga *et al.*, 2003). In its acute form, Q fever ranges from an asymptomatic to an abrupt flu-like illness that can be accompanied by fever and atypical pneumonia. Chronic Q fever occurs generally in immune-depressed patients and has a significant morbidity since it often leads to endocarditis (Madariaga *et al.*, 2003; van Schaik *et al.*, 2013). *Coxiella burnetii*, a gamma proteobacterium of the order Legionellales, is the causative agent of this zoonosis (Regnery & Mcdade, 1990; Maurin & Raoult, 1999). *C. burnetii* is an intracellular bacterium, but can persist for long periods in the environment owing to its small-cell variant (SCV) that enables it to infect its hosts through inhalation (Coleman *et al.*, 2004, 2007). This bacterium is extremely infectious and has developed various mechanisms to invade and subvert its host cells.

Ticks, one of the main vectors of infectious diseases among arthropods, were thought to transmit *C. burnetii*. Indeed the reference strain isolated by Harold Cox and Gordon Davis originated from a *Dermacentor andersoni* wood tick collected from the Nine Mile valley in Montana (Davis & Cox, 1938). However, since *C. burnetii* has rarely been found in ticks, they are no more considered to play a role in Q-fever outbreaks. On the other hand, in the last decade, bacteria showing high homology with *C. burnetii* have been identified within ticks and classified as *Coxiella*-like endosymbionts (*Coxiella*-LE) (Mediannikov *et al.*, 2003; Klyachko *et al.*, 2007; Lalar *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013). These endosymbionts are diverse

and infect more than two third of the tick species (Duron *et al.*, 2015). They are found in high prevalence in some species where they are vertically transmitted, by infecting the cytoplasm of oocytes during egg maturation (Lalzar *et al.*, 2014).

The phylogeny of the genus *Coxiella* shows an unexpected level of diversification compared to *C. burnetii*. *Coxiella*-LE are distributed among 4 clads and each *Coxiella*-LE seem specific of its host tick species (Duron *et al.*, 2015) Co-cladogenesis is even detected between some *Coxiella* endosymbionts and their hosts in some ticks genera. However, incongruence between *Coxiella* and tick phylogenies also suggest horizontal transfers. For example, *Coxiella*-LE from some clades can infect both hard and soft ticks, which are two distinct sub-orders of Ixodida. According to this phylogeny, *C. burnetii* form a monophyletic group within the A clade, which suggests that its ancestor was a tick endosymbiont and that vertebrate infection and pathogeny recently emerged among this genus (Duron *et al.*, 2015). Experimental tests also suggest that *Coxiella*-LE are not able to replicate in vertebrate host cells, and cannot replicate in the axenic medium developed for *C. burnetii* growth (Duron *et al.*, 2015).

While the effect of *Coxiella*-LE in ticks is not formally proven, different arguments suggest that they play an important role in the tick species they infect. First, one study revealed an impact on the host fitness when these symbionts are depleted by antibiotics (Zhong *et al.*, 2007). Second, ticks are obligate blood feeders, and like every strictly hematophagous arthropod, they should rely on symbionts to compensate their unbalanced diet for B vitamins (Nogge, 1981; Aksoy, 1995; Akman *et al.*, 2002; Allen *et al.*, 2007; Hosokawa *et al.*, 2010; Nikoh *et al.*, 2014; Manzano-Marín *et al.*, 2015). The recently published genome of the *Coxiella*-like endosymbiont of the tick *Amblyomma americanum* (CLEAA) supports this idea (Smith *et al.*, 2015). CLEAA has typical characteristics of obligate arthropod endosymbionts:

a very streamlined genome (0.6 Mb), highly AT_biased, whose gene repertoire is enriched for some specific pathways, and notably those involved in B vitamins synthesis. To date only one other *Coxiella*-LE genome has been sequenced (Gottlieb *et al.*, 2015). This *Coxiella*-LE lives within the tick *Rhipicephalus turanicus* (CRt), and like CLEAA it displays a 100 % prevalence in its host and is maternally transmitted (Lalzar *et al.*, 2014). The study of its genome revealed that, as CLEAA, it encodes all the genes involved in B vitamins synthesis . However, its size (1.7Mb) and GC % (38.2%) are different from the CLEAA genome and does not exhibit such high level of degradation than CLEAA. .

In order to get further insights on the evolutionary history of the genus *Coxiella*, and notably on the various reductive trajectories taken by *Coxiella*-LE genomes and the emergence of pathogenicity, two other *Coxiella*-LE genomes were sequenced and are analyzed in this study. One *Coxiella*-LE infects *Dermacentor marginatus* hard ticks (CLEdM). It is closely related to CLEAA and may give insights on the processes involved in genome degradation in *Coxiella* genomes. The other is a symbiont of the soft tick *Ornithodoros maritimus* (CLEOmar). It belongs to the A Clade of *Coxiella* and the analysis of its genome may shed light on the emergence of virulence in this genus.

MATERIALS AND METHODS

***Coxiella* DNA Extraction for genome sequencing**

Dermacentor marginatus hard ticks were collected by the “drag-flag” method in fields near Poleymieux, France, whereas *Ornithodoros maritimus* soft ticks were sampled in bird nests in Medes island, Spain. Both tick species were kept alive at 20°C and 80% humidity until further

use. Malpighian tubules and gonads, the organs where density of *Coxiella*-LE is the highest, were dissected from at least 15 ticks per species. Following protocols of Gottlieb *et al.* (2015), the dissected tissues from 5 ticks were then pooled in a sterile 1.5ml tube containing 100µl sterile double distilled H₂O and homogenized. Each homogenate was diluted in 100mL of sterile double distilled H₂O and incubated at 20°C for 1h. Filtration through a sterile gauze pad and a Minisart 5-mm filter (Sartorius AG, Gottingen, Germany) had been performed for each in order to remove host nuclei. The filtrate was then centrifuged for 15min at 20,000 x g at 4°C, and the supernatant was discarded. The remaining pellet was used for subsequent genomic DNA (gDNA) according to the manufacturer's instructions (Dneasy Blood and tissue Kit, Qiagen). For each pool Qubit dosage was done to insure that a sufficient DNA quantity was available for sequencing . In order to confirm the quality of the enrichment procedure, qPCR assays were performed as in Morel *et al.* 2017, (submitted). *Coxiella*-LE densities were determined by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) analysis.

Library Construction and Sequencing

The Genotoul DNA Services Facility platform at Castanet-Tolosan (France) performed the construction of gDNA libraries and sequencing. For each species, extracted gDNA (200ng) was processed for sequencing using the TruSeq Nano DNA Library Prep Kit (Illumina) according to the manufacturer's instructions. Libraries were subsequently sequenced on an Illumina HiSeq2000 instrument using the HiSeq SBS v3 kit (Illumina). A total of 30Gb of 2x100 bp paired-end sequence data was obtained.

Assembly

Illumina reads were trimmed using UrQt (Modolo & Lerat, 2015) and assembled into contigs with SPAdes (Bankevich *et al.*, 2012) (St. Petersburg, Russia) and AbySS softwares (Simpson *et al.* 2009), to create a draft genome sequence. For the genome of *Coxiella*-LE from *D. marginatus*, the few final gaps were closed by PCR. PCR products were cloned and sequenced as previously described (Lalzar *et al.*, 2012). Numerous contigs were still not correctly assembled for the *Coxiella*-LE genome of *O. maritimus* due to the massive presence of duplicated regions and pseudogenes.

The complete genome of *Coxiella* sp. CLEDm and CLEOmar are deposited in GenBank under accession number

Annotation

Automated genome annotation was first done using the BASys web server (Van Domselaar *et al.*, 2005). Then a pipeline created in the DIYA framework Ellegaard *et al.* (2013) was created to run the annotation, including gene calling by Prodigal (Hyatt *et al.* 2010), tRNA prediction by tRNAscan-SE (Lowe and Eddy 1997), rRNA prediction by RNAmmer (Lagesen *et al.* 2007), and determination of pseudogenes with GenePrimp (Pati *et al.* 2010) as described in Gottlieb *et al.* (2015). BLASTp was used to search all putative protein-encoding genes against the Uniprot database and pfam-scan was used to determine the presence of conserved protein domains found in PFAM (Bateman *et al.* 2004). The genome browser Artemis permitted the visualization and the manual curation of the data (Rutherford *et al.* 2000). In addition, after manual curation, the protein-coding genes were used for metabolic analysis by KAAS (Moriya *et al.* 2007) and BLASTp was used to identify Clusters of Orthologous Groups (COG) categories. Nucleotide sequences of pseudogenes were analyzed in a similar

way but using BLASTx.

Phylogenetic Reconstruction

Clusters of the annotated proteins from the sequenced genomes were clustered together using Silix with 7 other *Coxiella* proteomes and 2 outgroups from Coxiellacea with default parameters (Miele *et al.*, 2011). The 250 single copy orthologous proteins found in all clustered genomes were aligned using CLC and sites with more than 50% gaps were removed after the concatenation of each individual alignments. A species tree was constructed from the concatenated alignment using the maximum-likelihood method and 1,000 bootstrap replicates.

RESULTS AND DISCUSSION

Genomic features and phylogeny

The genomes of the *Coxiella*-LE infecting *O. maritimus* and *D. marginatus* were sequenced to approximately 400X coverage with 100-bp paired-end Illumina reads. After assembly and PCR contigs rearrangement, the CLEDm genome resulted in a circular genome of 901,206bp with 659 predicted protein-coding genes and 10 putative pseudogenes (Table 1). Regarding the CLEOmar genome, we were not able to reconstruct a circular genome given the high number of repeated regions and pseudogenes. Even though the 112 contigs still have to be rearranged to obtain a complete genome, all the coding sequences seems exploitable. Indeed its whole genome size is coherent with our expectations, and is similar to *C. burnetii* genomes already sequenced, which are the closest relatives. More importantly, all 205 genes found in all the proteobacteria (Lerat *et al.*, 2003) are present in the contigs obtained. This genome has

experienced a lot of duplications due to transposase activity, but according to the contigs coverage, the size of CLEOmar genome could reach 1.83Mbp and contain 976 predicted protein-coding genes and at least 608 pseudogenes (table 1), showing an important ongoing degradation process in this genome.

A phylogeny, based on the concatenation of the sequences of 250 single-copy orthologs found in all *Coxiella* genomes was realized (Fig. 1). This phylogeny is congruent with the one published by Duron *et al.* (2015) and shows that CLEDm and CLEAA on the one hand and CLEOmar and *C. burnetii* on the other hand form monophyletic groups, corresponding respectively to the D and A clades of *Coxiella*. This phylogeny suggests that the common ancestor of all *Coxiella* was already a tick endosymbiont as already suggested by Duron *et al.* (2015) using more *Coxiella*-LE using MLST. However, the different degrees of genome reduction is then puzzling. Indeed, for all major primary symbionts known so far, the reductive process has generally been extremely rapid during evolution leading to a genomic stasis following the reductive process. Some genomes of *Coxiella*-LE, like CLEAA and CLEDm that belong to the D clad, have typical genomic features of these nutritional endosymbionts of insects where long term associations lead generally to highly reduced, AT-biased genomes (McCutcheon & Moran, 2011). On the contrary other *Coxiella*-LE of ticks still have genomes as big as *C. burnetii*. This is the case for Crt that belongs to the C clade, and CLEDm from the A clade. These genomes are however seeded by mobile elements such as transposases and a lot of pseudogenes, which is typical of recent associations between host and endosymbionts. The different genomes of *Coxiella* thus clearly had different evolution. This could be either due to the fact that the reductive process has taken different routes owing, for example, to different losses of genes involved in the DNA repair machinery as suggested by Gottlieb *et al.* (2015), or that the different clades of *Coxiella*-LE had different histories of

association with their hosts. Interestingly, co-phylogeny analyses between *Coxiella* and their host ticks showed mixed patterns, with some clear signs of co-cladogenesis within some tick genera like *Rhipicephalus* suggesting strict maternal transmission, but also evidenced signs of horizontal transmission between tick species for other clads (Duron *et al.*, 2017). Combined with the different features of genomic evolution within the *Coxiella* genus, this could indicate that endosymbiosis with ticks has evolved several times.

Evolution of gene repertoires in the *Coxiella* genus

An analysis of the distribution of protein clusters has been performed on all *Coxiella* genomes sequenced to date (Fig. 2).

460 protein clusters are conserved in all the *Coxiella* proteomes studied out of a total of XX protein clusters. This proportion of protein clusters shared among all the *Coxiella* is very low considering that all these bacteria are close relatives. Analysis of the distribution of the Cluster of Orthologs (COG) show that these common orthologs are mainly involved in basic cellular processes such as translation and transcription (J) (Fig.3). Regarding the protein specific clusters to each *Coxiella* species, the most reduced genomes have, as expected, a few of them, with respectively 9 and 52 clusters for CLEAA and CLEDm. All of them are annotated as hypothetical proteins. CRt and CLEOmar have respectively 94 and 119 specific protein clusters, while *C. burnetii* harbors 800 specific protein clusters (Fig.2). These proteins may be involved in *C. burnetii* virulence and could give insights on of the mechanisms involved in its pathogenicity. Unfortunately, the majority of the specific proteins are not assigned in specific COG categories (R, S, X) and could not give us insights on the general functions specifically expressed by *C. burnetii* (Fig.3). Importantly, out of these 800 specific

proteins of *C. burnetii*, 420 are identified as pseudogenes in the CLEOmar genome, indicating that at least half of these specific proteins were ancestrally present at least in the A clade of *Coxiella*. Given the ongoing reductive process in CLEDm, this proportion could be much higher as some genes may have been lost from this genome since its divergence with *C. burnetii*. This result suggests that the main differences between CLEDm and *C. burnetii* are not due to specific acquisitions through horizontal gene transfer (HGT) by *C. burnetii*, but rather by loss or pseudogenization of genes in CLEDm, which question the ancestral lifestyle of *Coxiella*. In order to further investigate this question, specific pathways were scrutinized in more details. But most genes related to functions such as cell motility and secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism are pseudogenized or absent in *Coxiella* endosymbiont of ticks.

DNA replication and repair systems

The dynamics of genome degradation depends on the fate of genes involved in DNA replication, and more importantly in repair systems (REF). Some of the differences observed for these pathways in the *Coxiella* genomes studied here could explain the variable features of these genomes. Indeed, *C. burnetii* genomes possess more genes involved in replication, recombination and repair (COG L category, fig. 4) than CLEOmar and CRt, while CLEAA and CLEDm have the fewest number in this category. For example, genes encoding the proteins that initiate DNA replication (DnaA) and its regulator (Hda) (Mott & Berger, 2007) are missing in CLEAA and CLEDm, but are present in the other genomes. Loss of *dnaA* gene is common in endosymbionts of insect including *Baumannia*, *Blattabacterium*, *Carsonella*, *Sulcia* and *Wigglesworthia* (Akman *et al.*, 2002; Nakabachi *et al.*, 2006; López-

Sánchez *et al.*, 2009). Previously, it was even hypothesized that the loss of *dnaA* was required in stable symbiosis to enable direct control of symbiont replication by the host (Gil *et al.*, 2003). This implies that these *Coxiella* symbionts are not able anymore to initiate independently their own replication, involving maybe a control from the host tick, but that other *Coxiella*-LE have kept this ability. Furthermore, mismatch repair system (*mutSL*) (Schofield & Hsieh, 2003) and the nucleotide excision repair (*uvrABCD*) (Kisker *et al.*, 2013) have been lost in these small *Coxiella* genomes. Gottlieb *et al.* suggested that the loss of DNA repair mechanisms could be involved in the faster genomic evolution of CLEAA compared to CRt (Gottlieb *et al.*, 2015). Indeed, the loss of the mismatch repair system encoded by *mutSL* has a strong impact on the genome reduction and is thought to increase 50-fold the rate of deletions (Nilsson *et al.*, 2005). Our results also indicate a loss of these mechanisms in highly reduced *Coxiella*-LE genomes, as CLEDm has lost these genes while CLEOmar has kept them.

B vitamin biosynthesis

Coxiella-LE are suspected to play an important role in tick biology by providing B vitamins and co-factors that are absent from the blood, as in other obligate blood-feeder arthropods (Manzano-Marín *et al.*, 2015). While the genomes of *Coxiella*-LE exhibit strong signals of past or current degradation, all of them have kept most genes involved in the pathways involved in B vitamins and associated co-factors biosynthesis (figure 4). The CRt genome has however lost genes required for Thiamine (B₁) and Nicotinic acid (B₃), but it still possess all the genes involved in the other pathways. The conservation of these genes, especially in extremely reduced genomes such as CLEAA and CLEDm, seem to confirm the hypothesis of

a key nutritional role of *Coxiella*-LE in their host ticks. Interestingly, in tick species where *Coxiella*-LE are absent, other symbionts could play the same role, and notably *Francisella*-LE. First, *Coxiella* and *Francisella* are mostly exclusive, i.e. species infected by *Coxiella* are not infected by *Francisella* and reciprocally (Bonnet *et al.*, 2017; Duron *et al.*, 2017) Second, recently sequenced genomes of *Francisella*-LE possess the genes to synthesize B vitamins and co-factors, as *Coxiella*-LE, . While reinforcing the idea that ticks require nutritional complementation by endosymbionts, this pattern also highlights the dynamic nature of tick-endosymbionts for this nutritional function.

Genes encoding for B vitamin pathways and cofactors are also conserved in the sequenced genomes of *C. burnetii* . *C. burnetii* and CLEDm even possess, contrary to the other *Coxiella*-LE genomes, a functional *panD* gene that allows the synthesis of pantothenate (B₅) using aspartate (L-Asp) (Fig.4). Conservation of these genes in *C. burnetii* do not imply that the *Coxiella* ancestor was a nutritional symbiont. These pathways are indeed found in numerous bacteria and biotin synthesis is even known to be critical for virulence in some human pathogens such as *Francisella tularensis* and *Mycobacterium tuberculosis* (Woong Park *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2014). Furthermore a recent study blocking biotin biosynthesis inhibits the growth of *C. burnetii* in its axenic medium (Moses *et al.*, 2017). Thus, genomes of pathogenic bacteria of vertebrates encode even more proteins involved in B vitamins biosynthesis than the *Coxiella* endosymbionts of tick or other nutritional symbiont of blood-feeder arthropods.

Dot/Icm system of secretion

To investigate the emergence of pathogen in the genus *Coxiella*, some mechanisms known to be involved in *C. burnetii* virulence were analyzed in more details. One of these is the Dot/Icm secretion system, which is essential for the survival of *C. burnetii* in its host cells (van Schaik *et al.*, 2013). Also used by Legionella, this type 4 secretion system (T4SS) enables the secretion of effectors in the cell cytoplasm to subvert some host pathways (Fields *et al.*, 2002). None of the four genomes of *Coxiella-LE* endosymbiont of ticks has a functional T4SS, showing that it is not essential for tick endosymbionts to interact with their host. However, whereas there is no trace of the 23 genes required for a functional T4SS in the genomes of CLEAA and CLEDm, 16 pseudogenes of this T4SS are found in the CRt genome and relics of most of them are found in the genome of CLEOmar. One has even an intact sequence making it potentially functional. These results clearly demonstrate that the T4SS was ancestrally present in the genus *Coxiella*. As the T4SS machinery seems to rapidly deteriorate in tick endosymbionts, it makes it possible that transition towards a mutualistic way of life in ticks is recent and that it may have occurred repeatedly.

Resistance toward acidification

During its internalization in host cells through phagocytosis, *C. burnetii* uses the T4SS to subvert cells mechanisms transforming the phagosome into a *Coxiella* Containing Vacuole that allows it to survive and replicate. During this process the pH inside the CCV is very low since lysosomal activity is not impeded by *Coxiella* unlike other intracellular pathogens. In fact, a Na⁺/H⁺ antiporter seems to enable the pH homeostasis and survival of *C. burnetii* within the acidic CCV (Seshadri *et al.*, 2003). As *Coxiella-LE* do not possess a functional T4SS, their ability to form a CCV is improbable. *Coxiella-LE* seems rather to reside in a

host derived compartment (Lalzar *et al.*, 2014), like other obligate mutualistic bacteria (Moran & Bennett, 2014) and are not thought to be adapted to the acidic environment of the CCV. In *C. burnetii*, the Na⁺/H⁺ antiporter is encoded by six genes, *shaABCDEFG*, that have probably been acquired by HGT since they are not found in other Legionellales. Instead of the *sha* genes, the same genomic region in CRt and CLEAA encodes another Na⁺/H⁺ antiporter (Gottlieb *et al.*, 2015), the antiporter NhaA which works in high salinity and alkaline pH (Padan *et al.*, 1989). Interestingly, the CLEOmar genome, which is a closer relative of *C. burnetii*, also harbors the *sha* genes. Some of them are however pseudogenized, but at least *shaB* and *shaG* still have a functional sequences. This indicates that *sha* genes were at least acquired before the divergence between CLEOmar and *C. burnetii* (Fig.6), demonstrating that genes that are important for the infection cycle of *C. burnetii* in vertebrate cells pre-dated the capture of host ticks by *Coxiella*-LE.

SCV/LCV transition

Another specificity of *C. burnetii* compared to the other *Coxiella*-LE is its capacity to form different cellular variants. The Large Cellular Variant (LCV) is the active form of the bacteria and the Small Cellular Variant (SCV) is a sporulated form enabling the persistence of the bacteria in the environment by resisting to numerous environmental stress, as heat or desiccation. The process involved in these transition are not clearly understood, but by looking at the differential gene expression during the developmental cycle of *C. burnetii*, 'stage-specific' proteins referred as LCVHi/Lo or SCVHi/Lo have been identified (Minnick & Raghavan, 2011). Most of these proteins are involved in other cellular functions and are only over-expressed in stage transition. Some proteins like ScvA (Small cell variant protein A) are

thought to be important in the transition from LCV to SCV. Interestingly, most of the genes encoding for proteins described in Minnick & Raghavan are present or pseudogenized in the genome of CLEOmar, suggesting again that the ancestor of CLEOmar and *C. burnetii* was able to form a SCV.

Horizontal gene acquisitions

Recent data indicate that *C. burnetii* have also acquired some genes from non-relative bacteria which may increase its intracellular fitness and thus increase its virulence. Large number of horizontally derived genes were described in this study, including those for the synthesis of LPS, fatty acids, heme, and biotin that augment the physiological capability of *C. burnetii* (Moses *et al.*, 2017). But once again most of these genes are also present in the CLEOmar and CRt genomes and their acquisition by horizontal transfer should then be older than previously thought.

CONCLUSION

In this study two other genomes from *Coxiella*-like endosymbionts of ticks have been sequenced and analyzed. While the composition of these genomes confirms that *Coxiella*-LE might be involved in mutualistic interactions with their tick hosts by providing B vitamin and co-factors, they question the unique origin of tick endosymbiosis and the recent emergence of pathogenicity in *C. burnetii*.

The different genomic features observed in the two sequenced genomes confirm the different evolutionary fates of *Coxiella* genomes. Like CLEAA, CLEDm has an extremely reduced

genome (0.6 Mb) whereas CLEOmar, like CRt, has a bigger genome (~1.8Mb) seeded by pseudogenes and mobile elements. One possible explanation for this pattern is that *Coxiella*-LE of ticks have a unique origin but different rates of evolution, with some having experienced a massive genomic erosion like primary symbiont of insects, whereas others are still undergoing this process. Loss of DNA repair mechanism could explain these variations, as only the smallest genomes have lost some specific genes of the repair machinery. Another potential explanation is that domestication of *Coxiella*-LE by ticks has occurred repeatedly, and that time of association with ticks differ from one *Coxiella* clad to the other. This hypothesis seems contradictory with the phylogeny of *Coxiella* that suggest that the ancestor of *Coxiella*-LE was a tick endosymbiont and that virulence emerged in *C. burnetii*. However, different elements makes this scenario plausible. First, contrary to classical obligate symbionts of arthropods, there are evidence for horizontal transmission of *Coxiella*-LE between tick species. Second, genome analyses of obligate symbionts of insects generally show a rapid degradation of genomes followed by a genomic stasis, which is clearly not what is observed in *Coxiella*. Third, and more importantly, some remnants of genes and pathways involved specifically in the virulence of *C. burnetii* are present in some *Coxiella*-LE genomes, and notably CLEOmar, the closest genome sequenced to date of *C. burnetii*. This suggests that this *Coxiella* has only recently lost its pathogenic lifestyle, but also question the origin of this infection. Was it already a tick endosymbiont, or a pathogen of an unknown source? Another *Coxiella*, *C. Cheraxi*, is responsible of a crayfish disease and is positioned basally in the phylogeny of *Coxiella* (Tan & Owens, 2000; Cooper *et al.*, 2007). Recently, other *Coxiella*-like bacteria have been described as bird pathogens, but no sequence is available. Are there other *Coxiella* hosts/reservoirs that still have to be discovered? What type of relationships do this *Coxiella* entertain with their host? These are still open questions, but

could help resolve the apparent paradox between the phylogeny, which suggest a recent emergence of virulence in *C. burnetii*, and the genomic content of some *Coxiella*-LE genomes that rather suggest a recent loss of virulence and potentially recurrent transitions to mutualism in tick hosts.

Whatever the answers to these questions, comparison between *C. burnetii* and its close relative CLEOmar highlighted numerous genes specific to *C. burnetii*. While most of them do not have clear functions, they are potential candidates for factors allowing *C. burnetii* to infect vertebrate cells.

Table 1 | Genome Features of *Coxiella burnetii* RSA493 (Cb), *Coxiella* of *Rhipicephalus turanicus* (CRt), *Coxiella* of *Amblyomma americanum* (CLEAA), *Coxiella* of *Dermacentor marginatus* (CLEdM) and *Coxiella* of *Ornithodoros maritimus* (CLEOmar)

Genome	Size (Mb)	Genes	Pseudogenes	%GC	# Contigs
<i>C. burnetii</i> RSA493	1.99	2.094	83	42.6	1
CRt	1.7	912	675	38.2	1
CLEAA	0.66	551	10	34.6	1
CLEdM	0.9	659	10	35.1	1

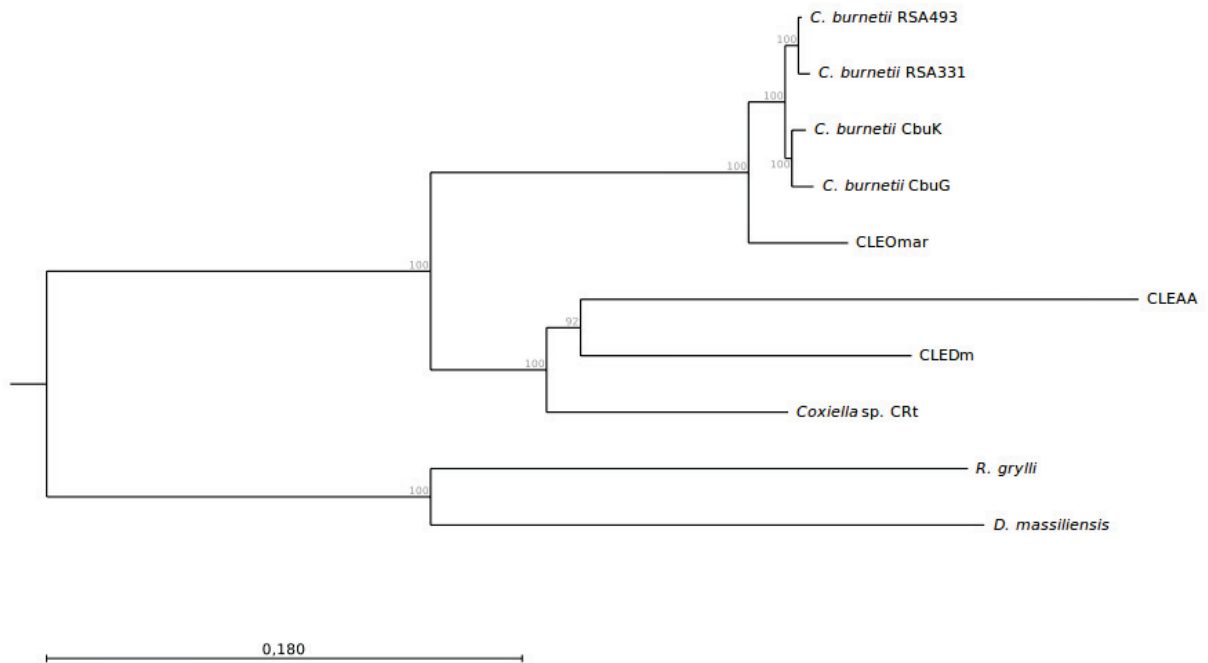


Fig.1 | Phylogenetic relationship and protein clusters of 10 genomes from the Coxiellales. The phylogenetic tree was inferred using maximum likelihood from a concatenated alignment of 250 single copy orthologous genes. The numbers on each node represent the support of 1,000 bootstrap replicates.

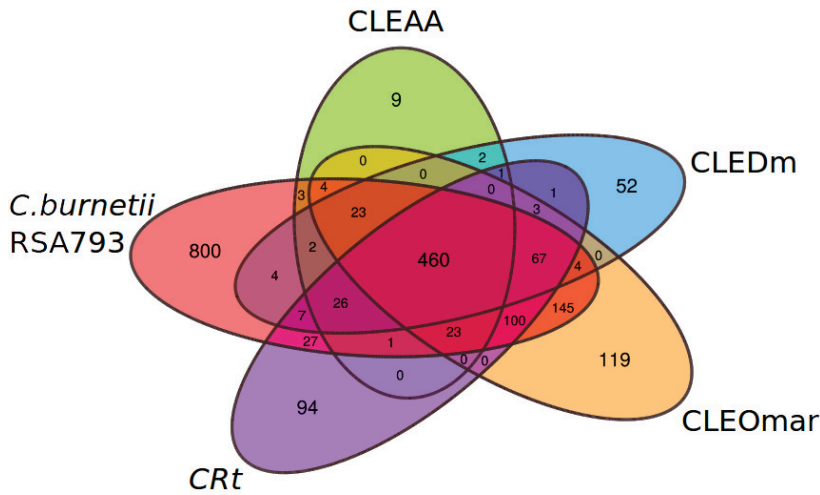


Fig.2 | Venn diagram depicting numbers of protein clusters in five specified genomes of *Coxiella*

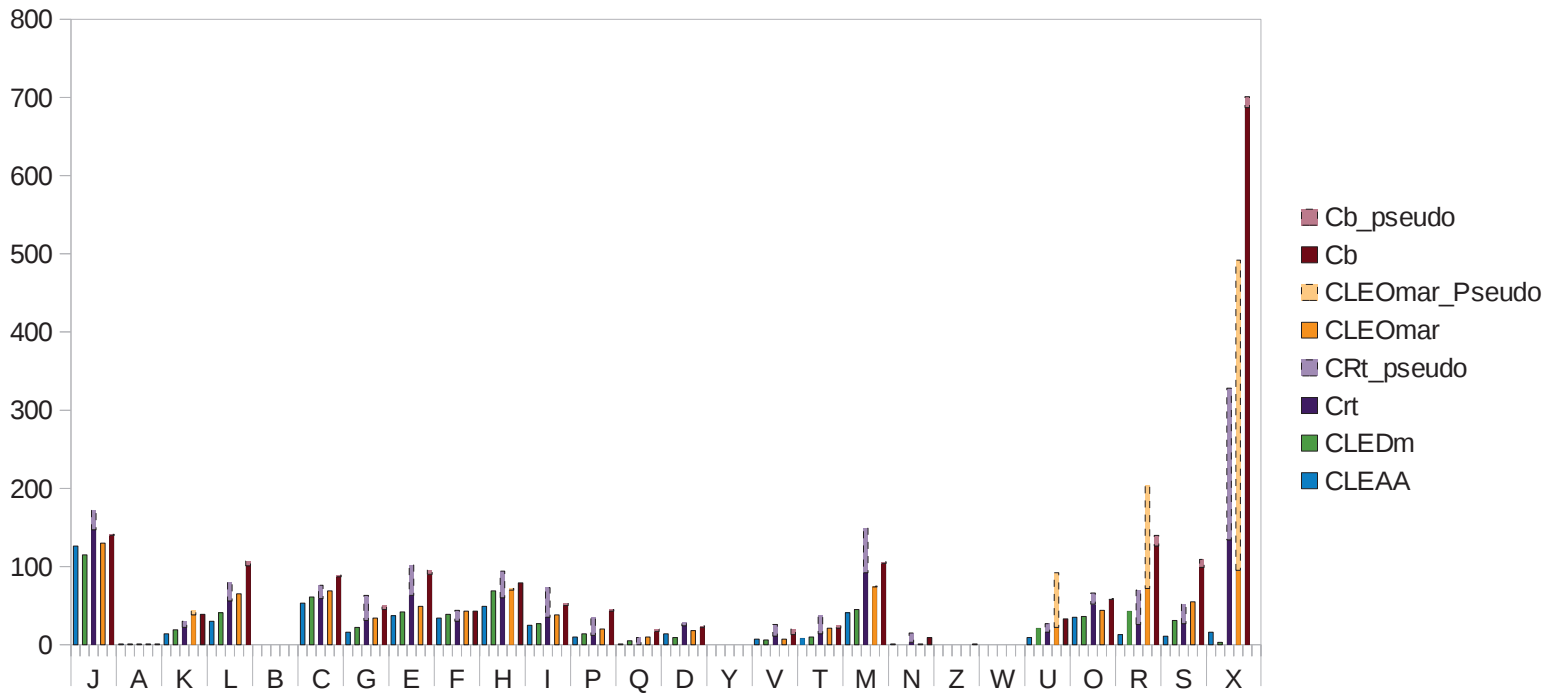


Fig. 3 | A comparison between COG assignment for coding genes and pseudogenes found in *Coxiella* genome.

A: RNA processing and modification; J: translation, ribosomal structure and biogenesis; K: transcription; **L: replication, recombination, and repair**; C: energy production and conversion; **G: carbohydrate transport and metabolism**; **E: amino acid metabolism and transport**; F: nucleotide transport and metabolism; H: coenzyme transport and metabolism; I: lipid transport and metabolism; **P: inorganic ion transport and metabolism**; Q: secondary metabolites biosynthesis, transport, and catabolism; D: cell cycle control, cell division; V: defense mechanisms; T: signal transduction mechanisms; **M: cell wall/membrane biogenesis**; **N: cell motility**; U: intracellular trafficking; O: posttranslational modification, protein turnover, and chaperones; **R: general function predicted only**; **S: function unknown**; **X: not assigned**.

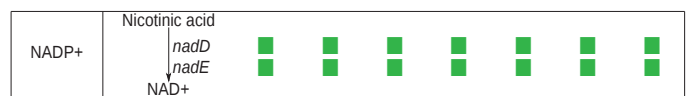
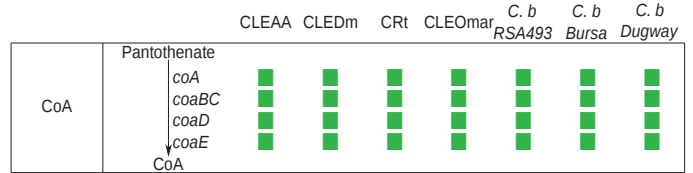
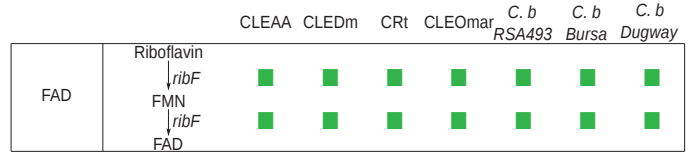
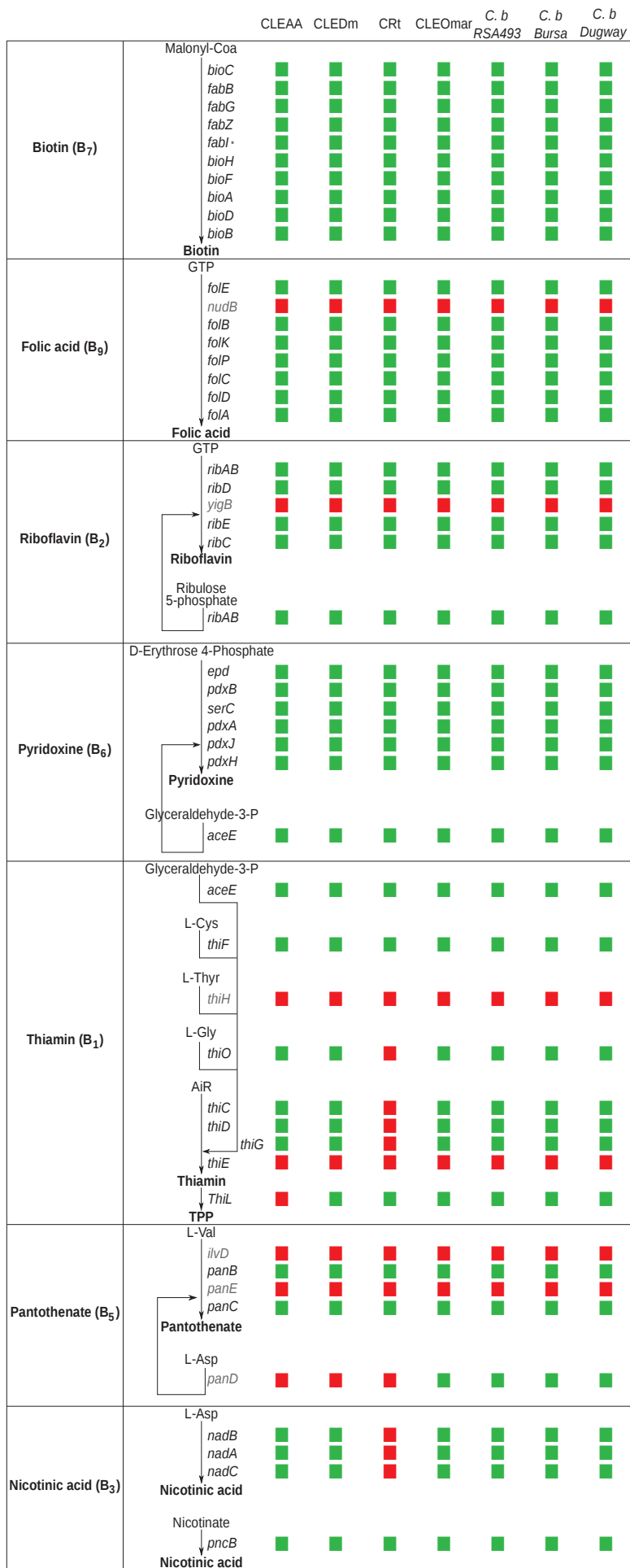


Fig. 4 | Biosynthetic pathways for b vitamins and cofactors Coxiella genome.

green : functional gene, red : missing genes or pseudogenised. gene written in gray are generally not found in symbiont providing b vitamins of hematophagous host

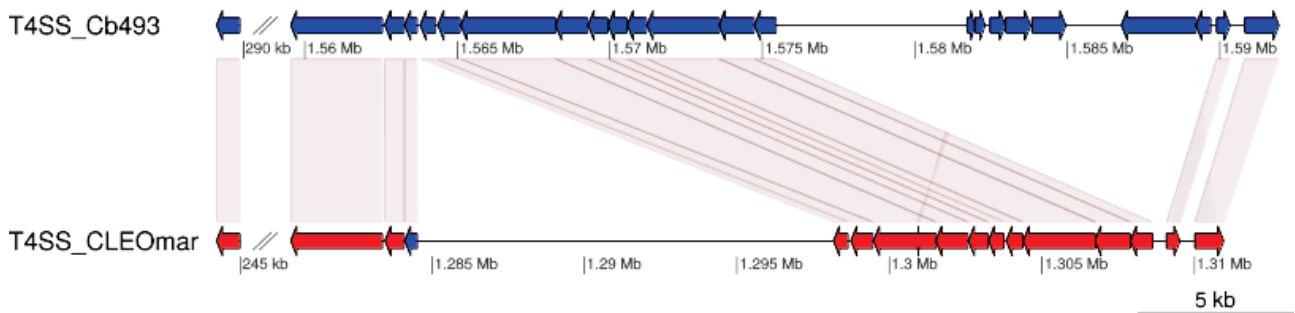


Fig. 5 | Comparison between *C. burnetii* and CLEOmar of genomic regions involved Dot/Icm system of secretion biosynthesis in *C. burnetii*.

Blue arrows depict protein-coding genes and red arrows represent pseudogenes.

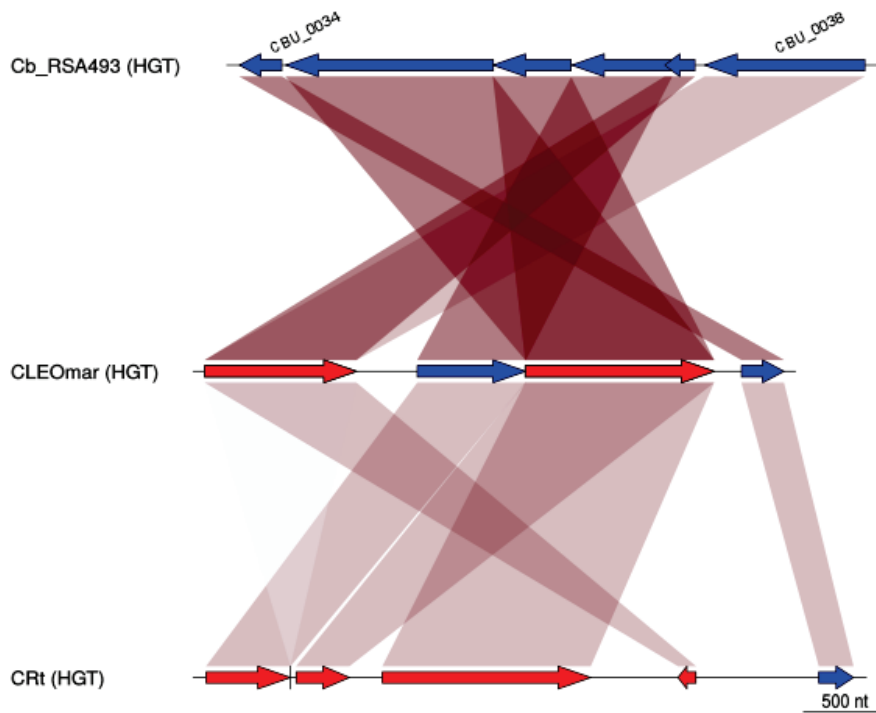


Fig.6 | Comparison between region acquired by horizontal transfert present in *C. burnetii*, CLEOmar and CRt

Blue arrows depict protein-coding genes and red arrows represent pseudogenes.

- Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., *et al.* 2002. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat. Genet.* **32**: 402–407.
- Aksoy, S. 1995. *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., Taxa Consisting of the Mycetocyte-Associated, Primary Endosymbionts of Tsetse Flies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 848–851.
- Allen, J.M., Reed, D.L., Perotti, M.A. & Braig, H.R. 2007. Evolutionary relationships of “*Candidatus riesia* spp.,” endosymbiotic Enterobacteriaceae living within hematophagous primate lice. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1659–1664. American Society for Microbiology.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., *et al.* 2012. SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* **19**: 455–477.
- Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A.M. & Duron, O. 2017. The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 1–14.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Cockrell, D.C., Voth, D.E., Howe, D., Mead, D.J., *et al.* 2007. Proteome and Antigen Profiling of *Coxiella burnetii* Developmental Forms. *Infect. Immun.* **75**: 290–298.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Howe, D., Mead, D.J. & Heinzen, R. a. 2004. Temporal Analysis of *Coxiella burnetii* Morphological Differentiation. *J. Bacteriol.* **186**: 7344–7352.
- Cooper, A., Layton, R., Owens, L., Ketheesan, N. & Govan, B. 2007. Evidence for the classification of a crayfish pathogen as a member of the genus *Coxiella*. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**: 558–563.
- Davis, G.E. & Cox, H.R. 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Public Health Rep.* **53**: 2259–2282.
- Duron, O., Binetruy, F., Noël, V., Cremaschi, J., McCoy, K.D., Arnathau, C., *et al.* 2017. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol. Ecol.* **26**: 2905–2921.
- Duron, O., Noël, V., McCoy, K.D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., *et al.* 2015. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLOS Pathog.* **11**: e1004892.
- Fields, B., Benson, R. & Besser, R. 2002. Legionella and Legionnaires’s disease: 25 years of investigation. *J. Clin. Microbiol.* **15**: 506–526. Am Soc Microbiol.

- Gil, R., Silva, F.J., Zientz, E., Delmotte, F., Gonzalez-Candelas, F., Latorre, A., *et al.* 2003. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 9388–9393.
- Gottlieb, Y., Lalar, I. & Klasson, L. 2015. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol. Evol.* **7**: 1779–1796.
- Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.-Y.X.-Y. & Fukatsu, T. 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 769–774.
- Kampschreur, L.M., Delsing, C.E., Groenwold, R.H.H., Wegdam-Blans, M.C.A., Bleeker-Rovers, C.P., de Jager-Leclercq, M.G.L., *et al.* 2014. Chronic Q Fever in the Netherlands 5 Years after the Start of the Q Fever Epidemic: Results from the Dutch Chronic Q Fever Database. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 1637–1643.
- Kisker, C., Kuper, J. & Van Houten, B. 2013. Prokaryotic nucleotide excision repair. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **5**: a012591–a012591.
- Klyachko, O., Stein, B.D., Grindle, N., Clay, K. & Fuqua, C. 2007. Localization and visualization of a *Coxiella*-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6584–6594.
- Lalar, I., Friedmann, Y. & Gottlieb, Y. 2014. Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environ. Microbiol.* **16**: 3657–3668.
- Lalar, I., Harrus, S., Mumcuoglu, K.Y. & Gottlieb, Y. 2012. Composition and Seasonal Variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 4110–4116.
- Lerat, E., Daubin, V. & Moran, N.A. 2003. From gene trees to organismal phylogeny in prokaryotes: The case of the γ -Proteobacteria. *PLoS Biol.* **1**: e19.
- Liu, L., Li, L., Liu, J., Hu, Y., Liu, Z., Guo, L., *et al.* 2013. Coinfection of *Dermacentor silvarum* olenev (Acari: Ixodidae) by *Coxiella*-like, *Arsenophonus*-like, and *Rickettsia*-like symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 2450–2454.
- López-Sánchez, M.J., Neef, A., Peretó, J., Patiño-Navarrete, R., Pignatelli, M., Latorre, A., *et al.* 2009. Evolutionary Convergence and Nitrogen Metabolism in *Blattabacterium* strain Bge, Primary Endosymbiont of the Cockroach *Blattella germanica*. *PLoS Genet.* **5**: e1000721.
- Madariaga, M.G., Rezai, K., Trenholme, G.M. & Weinstein, R.A. 2003. Q fever: A biological weapon in your backyard.
- Manzano-Marín, A., Ocegüera-Figueroa, A., Latorre, A., Jiménez-García, L.F. & Moya, A.

2015. Solving a Bloody Mess: B-Vitamin Independent Metabolic Convergence among Gammaproteobacterial Obligate Endosymbionts from Blood-Feeding Arthropods and the Leech *Haementeria officinalis*. *Genome Biol. Evol.* **7**: 2871–2884.
- Maurin, M. & Raoult, D. 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 518–553.
- McCutcheon, J.P. & Moran, N. a. 2011. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 13–26. Nature Publishing Group.
- Mediannikov, O., Ivanov, L., Nishikawa, M., Saito, R., Sidelnikov, Y.N., Zdanovskaya, N.I., *et al.* 2003. Molecular Evidence of *Coxiella* -like Microorganism Harbored by *Haemaphysalis concinnae* Ticks in the Russian Far East. *Ann. N.Y. Acad. Sci* **990**: 226–228.
- Minnick, M.F. & Raghavan, R. 2011. Genetics of *Coxiella burnetii* : on the path of specialization. *Future Microbiol.* **6**: 1297–1314.
- Modolo, L. & Lerat, E. 2015. UrQt: an efficient software for the Unsupervised Quality trimming of NGS data. *BMC Bioinformatics* **16**: 137.
- Moran, N.A. & Bennett, G.M. 2014. The Tiniest Tiny Genomes. *Annu. Rev. Microbiol.* **68**: 195–215.
- Moses, A.S., Millar, J.A., Bonazzi, M., Beare, P.A. & Raghavan, R. 2017. Horizontally Acquired Biosynthesis Genes Boost *Coxiella burnetii*'s Physiology. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 1–9.
- Mott, M.L. & Berger, J.M. 2007. DNA replication initiation: mechanisms and regulation in bacteria. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**: 343–354.
- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H.E., Moran, N.A., *et al.* 2006. The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science (80-.)*. **314**: 267.
- Nikoh, N., Hosokawa, T., Moriyama, M., Oshima, K., Hattori, M. & Fukatsu, T. 2014. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 10257–10262.
- Nilsson, A.I., Koskiniemi, S., Eriksson, S., Kugelberg, E., Hinton, J.C.D. & Andersson, D.I. 2005. Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 12112–12116.
- Nogge, G. 1981. Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in haematophagous arthropods. *Parasitology* **82**: 101–104. cambridge univ press 40 west 20th street, new york, ny 10011-4211.
- Padan, E., Maisler, N., Taglicht, D., Karpel, R. & Schuldiner, S. 1989. Deletion of ant in *Escherichia coli* reveals its function in adaptation to high salinity and an alternative

- Na⁺/H⁺ antiporter system(s). *J. Biol. Chem.* **264**: 20297–20302.
- Regnery, R.L. & Mcdade, J.E. 1990. Coxiella-Burnetii Q Fever a potential microbial contaminant of the environment. In: *ASTM Special Technical Publication*, pp. 115–133. ASTM International.
- Schofield, M.J. & Hsieh, P. 2003. DNA Mismatch Repair: Molecular Mechanisms and Biological Function. *Annu. Rev. Microbiol.* **57**: 579–608.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., *et al.* 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 5455–5460.
- Smith, T.A., Driscoll, T., Gillespie, J.J. & Raghavan, R. 2015. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biol. Evol.* **7**: 831–838.
- Tan, C.K. & Owens, L. 2000. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a *Rickettsia*, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Organ.* **41**: 115–122.
- Van Domselaar, G.H., Stothard, P., Shrivastava, S., Cruz, J.A., Guo, A., Dong, X., *et al.* 2005. BASys: a web server for automated bacterial genome annotation. *Nucleic Acids Res.* **33**: W455–W459.
- van Schaik, E.J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M.M. & Samuel, J.E. 2013. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 561–73.
- Zhong, J., Jasinskas, A. & Barbour, A.G. 2007. Antibiotic Treatment of the Tick Vector *Amblyomma americanum* Reduced Reproductive Fitness. *PLoS One* **2**: e405.

Discussion

Dans cette étude, deux nouveaux génomes issus de *Coxiella*-LE ont été séquencés. Ces derniers confirment que les génomes de *Coxiella*-LE ont des caractéristiques très différentes. Comme CLEAA (Smith *et al.*, 2015), CLEDM a un génome extrêmement réduit (0,6 Mb) alors que CLEOmar a un génome plus grand (~ 1,8 Mb) marqué par la présence de nombreux pseudogènes et éléments mobiles. Cela implique que différents niveaux de réduction génomiques s'appliquent sur ces génomes : certains ont subi une érosion génomique massive, comme la plupart des symbiotes primaires d'insectes, alors que d'autres génomes semblent seulement soumis aux premières phases de ce processus.

Malgré ces différences notables, tous les génomes étudiés possèdent les gènes impliqués dans la synthèse de vitamines B et des cofacteurs associés. Ceci, notamment pour les génomes très réduits, semble confirmer le rôle nutritionnel des bactéries *Coxiella*-LE chez leurs hôtes tiques. Les *Coxiella*-LE seraient dès lors des symbiotes obligatoires chez les espèces de tiques qu'elles infectent, ce qui expliquerait les fortes incidences et prévalences associées chez les tiques (Duron *et al.*, 2015a). Si toutes les *Coxiella*-LE partagent le même type d'interaction mutualiste avec les tiques, comment expliquer alors les différentes caractéristiques de leur génome ?

Sous l'hypothèse d'un ancêtre commun endosymbiote de tique, les différentes propriétés génomiques de ces bactéries s'expliqueraient par une vitesse d'érosion différente entre ces génomes. Gottlieb *et al.* (2015) ont ainsi suggéré que la perte différentielle des mécanismes de réparation de l'ADN pourrait expliquer ce phénomène dans le genre *Coxiella*. Les génomes fortement réduits ont en effet tous perdu les gènes impliqués dans ces phénomènes alors que CRt et CLEOmar les ont, en partie, conservés.

Pourtant, d'autres éléments viennent contredire cette hypothèse d'un ancêtre endosymbiotique de tique. En particulier, on retrouve chez CLEOmar, proche phylogénétiquement de *C. burnetii*, mais aussi chez CRt, de nombreux gènes fonctionnels ou des pseudogènes impliqués dans la virulence chez *C. burnetii*. Ce phénomène suggère plutôt des transitions répétées de la pathogénie au mutualisme, remettant en cause une émergence récente de la virulence chez cette dernière. Si cette hypothèse est correcte, alors les différentes caractéristiques génomiques des *Coxiella*-LE pourraient s'expliquer par une transition plus ou moins récente vers le mode endosymbiotique de tique. L'histoire évolutive du genre *Coxiella* semble donc riche en transitions et est donc plus complexe qu'envisagée. Par ailleurs, au vu

de la phylogénie des *Coxiella*, mais également de la répartition des symbiotes chez les tiques, la capture de nouveaux hôtes tiques par *Coxiella* semble fréquente, tout comme les remplacements de symbiotes. Cependant certaines espèces de tiques ne sont pas (ou peu) infectés par *Coxiella*, suggérant la présence d'autres symbiotes capables de synthétiser les vitamines B dans certaines espèces, et notamment des bactéries du genre *Francisella* (Duron *et al.*, 2015a, Duron *et al.* 2017). Dans ce contexte très dynamique, où les symbiotes produisant des vitamines B pourraient fréquemment entrer en compétition, il est possible d'envisager que les bactéries ayant conservé des répertoires géniques importants associés à une certaine plasticité de leur génome puissent être favorisées.

Comme les bactéries du genre *Francisella* infectant les tiques, les *Coxiella* pourraient donc avoir pour ancêtre un, et plus probablement plusieurs, pathogène(s) d'origine lointaine. Les résultats de cet article pose alors la question de l'existence de réservoirs de pathogènes inconnus ou éteints dans le genre *Coxiella*. Des cas d'infections par une bactérie du genre *Coxiella*, *C. cheraxii* ont ainsi été répertoriés chez des écrevisses *C. cheraxi* (Tan & Owens, 2000; Cooper *et al.*, 2007). Cette bactérie serait toutefois basale et ne permettrait pas d'expliquer de multiples transitions vers le mutualisme. Des *Coxiella*, très proches des *Coxiella*-LE de tiques sur la base de la séquence de leur ARNr16S, ont également été détectées chez des oiseaux (Shivaprasad *et al.*, 2008; Vapniarsky *et al.*, 2012). La question étant de savoir s'il s'agit d'infections opportunistes à partir de symbiotes de tiques ou bien de réels réservoirs de pathogènes.

Nos connaissances sur les bactéries du genre *Coxiella* sont encore limitées, mais cette analyse génomique a montré que ces bactéries possèdent des capacités intéressantes. L'étude des bactéries du genre *Coxiella* peut être un bon modèle pour comprendre les mécanismes sous-jacents aux transitions évolutives. En plus des aspects évolutifs, de telles connaissances pourraient alors permettre de mieux comprendre et de prévenir l'émergence de nouveaux pathogènes.

Quoiqu'il en soit, cette étude apporte des éléments importants sur l'histoire du genre *Coxiella* et souligne à la fois l'importance de les rechercher de manière plus systématique dans des hôtes divers, mais également de poursuivre les efforts de séquençage des *Coxiella*-LE pour affiner les scénarii sur le nombre et la nature des transitions de mode de vie chez ces bactéries.

Seconde partie :

**Interaction des *Coxiella*-LE avec d'autres
bactéries symbiotiques de tiques :**

Impact des Co-infections

Chapitre III : Impact des co-infections chez les tiques *D. marginatus*

La capacité des tiques à vectoriser des micro-organismes pathogènes n'est plus à démontrer. Ainsi *Borrelia burgdorferi*, l'agent responsable de la maladie de Lyme, mais aussi de nombreuses bactéries du genre *Rickettsia* responsables de rickettsioses sont couramment associées à ces arthropodes hématophages (Burgdorfer *et al.*, 1981a, 1982; Parola *et al.*, 2013). Pourtant les tiques sont aussi fréquemment infectées par des bactéries symbiotiques qui ne semblent pas impliquées dans des zoonoses et semblent spécifiques de leurs hôtes tiques.

Au moins 10 genres de bactéries sont reportés comme étant des symbiotes à transmission maternelle chez les tiques (Bonnet *et al.*, 2017). Ces bactéries ne sont pas autant étudiées que les pathogènes transmis par les tiques. Pourtant elles peuvent avoir un rôle important pour la biologie de leur hôte et interférer avec la réplication et la transmission d'autres symbiotes chez les tiques. Si le rôle de ces bactéries symbiotiques est encore peu connu, les interactions entre ces symbiotes le sont encore moins.

En effet, nous avons vu en introduction que les co-infections peuvent avoir des conséquences importantes sur la valeur adaptative de l'hôte. Le phénotype des symbiotes peut varier en fonction des symbiotes associés mais aussi du génotype de l'hôte. Les tiques sont connues pour être infectées par de nombreux symbiotes et pourtant l'impact de ces co-infections sur ces organismes n'est pas connu. Par exemple, les individus de l'espèce *Dermacentor marginatus* sont fréquemment infectés par des bactéries *Coxiella-LE*, *Rickettsia* et aussi *Spiroplasma* (Sanogo *et al.*, 2003; Mediannikov *et al.*, 2008; Hornok *et al.*, 2010; Duron *et al.*, 2015a). La prévalence de ces bactéries est relativement élevée dans les populations de cette espèce de tique et certains individus se révèlent être triplement infectés. Pour étudier l'impact de ces co-infections, des individus ont été prélevés dans leur habitat naturel. Un trait de vie, la taille d'un segment de patte permettant d'estimer la taille totale de la tique, a été mesuré pour chaque adulte en fonction de son statut d'infection. Ensuite pour évaluer les interactions entre ces symbiotes, leur transmission et leur densité relative ont été mesurées chez des larves issues de la ponte de femelles aux statuts d'infection différents.

Article :

High cost associated with multiple infections by endosymbiont in *Dermacentor marginatus* ticks.

Olivier Morel^{1,2*}, Hélène Henri¹, Olivier Duron³, Fabrice Vavre¹ and Lionel Zenner^{1,2}

¹Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive (LBBE), Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5558) - Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France

²VetAgro Sup, Veterinary Campus of Lyon, University of Lyon, Department of Parasitology, Marcy-Etoile, France

³Laboratoire MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs : Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5290) – Institut pour la Recherche et le Développement (UR224) – Université de Montpellier, Montpellier, France

Abstract

Ticks are important vectors of vertebrate pathogens. These hematophagous arthropods have a worldwide distribution and are a major issue for the health of humans and other animals. However ticks do not only carry pathogens, but also host other symbiotic microorganisms. At least 10 distinct genera of maternally inherited bacteria have been reported in ticks and multiple infections frequently occur. Effects of these multiple infections at individual level are still not well described, despite their possible consequences on their host biology and on pathogen transmission. *Dermacentor marginatus* is a hard tick where three bacterial endosymbionts have been detected: *Coxiella*-Like Endosymbionts (*Coxiella*-LE), *Rickettsia* and *Spiroplasma*. We found that these symbionts reach relatively high prevalence in *D. marginatus* and that about two thirds of the individuals are multiply infected by at least two of them, 13% of individuals being triply infected. We observe that multiply infected *D. marginatus* adult ticks, notably in case of triple infections with all the studied symbionts, are significantly smaller than the ones only infected by *Coxiella*-LE bacteria. These results raise the question of the maintenance of these multiple infections at such a high prevalence despite their cost and the low rate of vertical transmission of some symbionts. Frequent horizontal transmission at the individual level may be one way used by some symbionts for transmission, which could explain their virulence.

Keywords: *Coxiella*-LE, *Rickettsia*, *Spiroplasma*, coinfection, ticks, transmission

INTRODUCTION

Maternally transmitted symbionts are frequent in arthropods (*ie* from mother to offspring hosts) and typically play a role in their host fitness. Some of these symbionts have a nutritional role and are obligatory for hosts to compensate their unbalanced diet (Douglas, 1998). This is the case in strictly hematophagous arthropods that rely on symbiotic bacteria to synthesize B vitamins absent from the blood (Allen *et al.*, 2007; Rio *et al.*, 2012). Other symbionts are dispensable, but confer fitness benefits to their host in particular environmental conditions (*ie.* resistance to natural enemies, heat stress...) (Tsuchida, 2004; Scarborough, 2005; Moran *et al.*, 2008; Su *et al.*, 2013; Donald *et al.*, 2016). Finally, to be maintained in their host population some maternally transmitted symbionts could alter their host reproduction. Different strategies, which could affect the sex ratio of their host or impede the reproduction between infected and non-infected individuals (*ie.* cytoplasmic incompatibility), have been selected during the evolution of these reproductive parasites in order to enhance their own transmission (Hurst and Jiggins, 2000; Duron *et al.*, 2008; Engelstädter and Hurst, 2009). Interestingly multiple infections within a same host are commonly described and could lead to intra-host competition or, on the contrary, cooperation between these symbionts. The nature of these interactions could then vary in function of each symbiont and lead to different phenotypes. Multiple infections could be associated with higher costs for the host (Mouton *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2006) but co-infections could also be beneficial for the host, in others cases, which include complementation between different symbionts to synthesize essential metabolic. Studying symbiosis in arthropods raise the question of the maintenance of these multiple infection.

In ticks, at least 10 distinct genera of maternally inherited bacteria have been reported (Duron *et al.*, 2017), but their role in tick biology remains mostly unknown. If these symbionts attracted less attention than tick-borne pathogens, they are equally important due to their potential impact on tick biology and pathogen transmission. Ticks are particularly studied as they host a greater variety of microbes than any other blood-feeding arthropod group and are the major source of zoonotic diseases in temperate regions (Telford and Goethert, 2004; Jongejan and Uilenberg, 2005). The high diversity of symbionts reported in ticks results in frequent infection by pathogens (Burgdorfer *et al.*, 1982; Schouls *et al.*, 1999; Piesman and Dennis, 2005; Mixson *et al.*, 2006; Tonbak *et al.*, 2006; Nicholson *et al.*, 2010) but also by numerous maternally transmitted symbionts (up to 6 for some tick species) (Duron *et al.*, 2017). This results in important interactions between all members of these symbiotic communities (Clay *et al.*, 2008; Andreotti *et al.*, 2011; Carpi *et al.*, 2011; Lalar *et al.*, 2012; Vayssier-Taussat *et al.*, 2013; Qiu *et al.*, 2014; Williams-Newkirk *et al.*, 2014; Narasimhan and Fikrig, 2015) which may have complex effects on the host and can also interfere with pathogen transmission, making the study of these communities an important avenue (Ferrari and Vavre, 2011). In any case all these symbionts are involved with their tick hosts in long term associations whose effect may vary along a mutualism-parasitism continuum (Bonnet *et al.*, 2017).

Among endosymbionts frequently detected in ticks, bacteria showing strong homology with *Coxiella burnetii*, the agent of the Q fever disease, have been discovered in high prevalence within tick populations of various species (Mediannikov *et al.*, 2003; Klyachko *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013; Lalar *et al.*, 2014; Duron *et al.*, 2015). *Coxiella*-like endosymbionts of ticks (*Coxiella*-LE) seem not involved in zoonosis unlike their relative *C. burnetii* (Heinzen *et al.*, 1999). *Coxiella*-LE are the most widespread tick symbionts and

their specific localization and high rate of vertical transmission may indicate a biological importance for ticks (Klyachko *et al.*, 2007; Lalzar *et al.*, 2014; Duron *et al.*, 2015). Genome sequencing of *Coxiella*-LE from different ticks species have revealed that each *Coxiella*-LE, even ones those have experienced an important genomic shrinkage, possess the genes encoding pathways for B vitamins biosynthesis (Gottlieb *et al.*, 2015; Smith *et al.*, 2015). Ticks being obligate blood-feeders, they should host nutritional symbionts for B vitamins provisioning. Experiment involving antibiotics to reduce the abundance of *Coxiella*-LE in given ticks species seems to confirm the nutritional role of the *Coxiella*-LE, since the fitness of ticks individuals without these bacteria is severely impacted (Zhong *et al.*, 2007; Guizzo *et al.*, 2017). Thus, Guizzo *et al.* (2017) even observed a stop in the development of *R. microplus* larva with reduced *Coxiella* Endosymbiont of *R. microplus* (CERM) abundance. *Coxiella*-LE are then obligatory symbionts of ticks however they are apparently specific to a given tick species resulting in a high diversity in this genus and are dispensable in some ticks species (Duron *et al.*, 2015). This may indicate frequent host capture which is really uncommon in nutritional symbiont.

Like *Coxiella*-LE, evolutionary relationships between pathogens and tick symbionts are also noticeable since they are often phylogenetically related (Perlman *et al.*, 2006; Weinert *et al.*, 2009; Sjödin *et al.*, 2012; Duron *et al.*, 2015). This raise the question of the evolutionary history of all these bacterial genus but also the kind of interactions between relatives within the same host ticks. Thus some mutualistic symbionts could have a defensive role against related virulent species. Burgdorfer *et al.* already reported that the presence of *Rickettsia peacockii*, a maternally-inherited symbiont, prevents transovarial transmission of the spotted fever agent, *Rickettsia rickettsii* (Burgdorfer *et al.*, 1981).

To underline the impact of co-infections on tick biology, we focused on a natural tick

population of *Dermacentor marginatus*. *Dermacentor* are common ticks in Europe that are easily found in fields and forests. They are hard ticks (Ixodidae) known to transmit human diseases, but they are also infected by other symbionts. *D. marginatus* is indeed commonly infected by *Coxiella-LE*, *Rickettsia* spp. and *Spiroplasma* spp. (Sanogo *et al.*, 2003; Mediannikov *et al.*, 2008; Hornok *et al.*, 2010; Duron *et al.*, 2015, 2017; Bonnet *et al.*, 2017). All these bacteria are found in high prevalence in *D. marginatus* populations and seem maternally inherited endosymbionts (Bonnet *et al.*, 2013; Duron *et al.*, 2017). In order to study these co-infections, *D. marginatus* individuals were sampled in their natural habitat during three years. We characterized the infection status of these individuals, and analyzed the potential effect of the composition of the symbiotic community on tick size and individual symbiont density. This could underline an important cost associated with multiple infections in *D. marginatus* ticks. We also measured the rate of vertical transmission of the different symbionts. Interestingly multiply infected ticks are significantly smaller than single infected ones which make the maintenance of these co-infection at such rate hard to explain. Our results do not evidence direct interactions between symbionts, but highlight frequent horizontal transmission of some maternal transmitted symbiont.

MATERIAL AND METHODS

Tick collection

A total of 275 adults hard ticks were collected in the same field in Poleymieux-au-Mont-d'Or, near Lyon in France (Rhône Department). This site was selected according to the indications of veterinary practitioners due to the abundance of ticks. Drag sampling has been performed in 4 delimited areas at field borders, each corresponding approximately of a dozen of

transects of 10 meters. Flagging was conducted in the afternoon from 15:00 to 18:00 in the spring (April and May) for two years. All samples were preserved in 70% ethanol at room temperature until use. Identification was realized under binocular lens (Leica, EZ4D) using a taxonomic key (Perez-Eid and Gilot, 1998).

Adult ticks feeding on the cattle grazing in the study field were also sampled directly on their bovine hosts. They were cautiously removed and kept alive. After identification, engorged females of *D. marginatus* were put in an incubator at 20°C and 80% humidity until they laid eggs. After egg hatching, larvae and engorged females, were preserved in 70% ethanol at room temperature until use.

Phenotypic trait

We measured the length of the patella of the 4th pair of the leg for each unfed adult tick. This measure is an estimation for the size of the whole individual that is often used as a proxy of fitness. Before DNA extraction, individuals were measured under an Axioimager Z1 microscope (Zeiss) with the 20X objective and AxioVision software (v4.8.1.0) was used to capture images and measure the trait.

Detection and quantification of symbionts

Adult ticks

To determine the infection status of each adult tick, DNA was individually extracted using the

NucleoSpin® Tissu Kit (Macherey-Nagel) following manufacturer instructions. DNA template quality was systematically verified by PCR amplification of the tick 18S ribosomal RNA gene (18S rRNA). Tick DNA samples were then tested for *Coxiella*, *Rickettsia* and *Spiroplasma* bacteria by PCR assay using primers from previous studies targeting the *rpoB* gene of each bacterial genus (Table 1) (Bi *et al.*, 2008; Heres and Lightner, 2010; Paddock *et al.*, 2010). PCR products were then sequenced, sequences have been aligned and compared with available sequences of *rpoB* gene of relative of each bacterium studied with CLC Main Workbench 7.6.4 Version (Qiagen). Only an unique genotype have been detected for each bacteria studied in our samples, so thanks to these sequences alignment specific primers have been design to improve the detection of these symbionts (Table1). Each PCR run was performed in 25µL volume and the reaction mix was composed of 1 × DreamTaq Green Buffer (Fermentas), 200 µM dNTP (Thermo Scientific™), 200 nM primers, 0.5 IU DreamTaq DNA polymerase (Thermo Scientific™) and 2 µL of the previous DNA extract. PCR was performed using the thermocycler C1000 (Bio-Rad, CA). Thermal cycling conditions were 1 min at 95°C; a total of 35 cycles of 30 sec at 95°C, 1 min at 57°C, 1 min 30 sec at 72°C; and a final extension of 10 min at 72°C. Results of PCR were visualized by electrophoresis using 1% agarose gel. To check the specificity of each PCR reaction, some positive PCR products were purified and sequenced (Biofidal)

Larvae and engorged females

To test for the infection status of tick larvae from different batches, DNA was individually extracted using the NucleoSpin® Tissue XS Kit (Macherey-Nagel) following manufacturer instructions. In order to work with such a small amount of DNA, qPCR assays were

developed. Quantitative PCR primers targeting the *rpoB* gene were designed with CLC Main Workbench 7.6.4 Version (Qiagen) with the help of genomes already sequenced.

For each fragment, a standard curve was constructed using the purified PCR product generated for each specific primer pair. Single reactions were prepared in duplicate for each sample along with each serial dilution using the SYBR® Green qPCR ReadyMix™ (Sigma-Aldrich). Each reaction consisted of 10 µl, containing 2 µl of DNA and 0.2 µM of each primer.

All thermal cycling and detection were performed using a CFX-96 thermocycler (Bio-Rad, CA) employing a thermal profile of 98 °C for 2 min followed by 45 cycles of 95 °C for 10 s, 63 °C for 20s and 72 °C for 20s.

For each reaction the Normalized Relative Quantity (NRQ) has been calculated using tick 18S rRNA of each template as reference gene, according to Pfaffl *et al.* (Pfaffl, 2001) Calibrators were also used to check for differences between runs and no such differences were detected.

Statistical analyses

Differences in bacterial diversity between sexes, sites in the field and years have been tested using Fisher's exact tests (Raymond & Rousset 1995). Infection status were represented using the MONDRIAN package in R (<https://github.com/aurisiber/Mondrian>).

Size measures from samples legs were subjected to Shapiro-Wilk tests to check normality. Comparisons between the length of each patella from *D. marginatus* adult tick, sex, sampling

and infection status were performed using a two-way analysis of variance (ANOVA). Same test were then performed on males and females separately and Tukey's post hoc tests for pairwise comparison were then used in this model to compare the different infection status. To consider the effect of each egg laying on larvae density generalized linear mixed model fit by maximum likelihood (gamma family) was also used. All the analysis were performed with R 3.2.2 version (R Core Team, 2013).

RESULTS

Prevalence of symbionts and multiple infections in *D. marginatus*

Among the 275 adult hard ticks collected in the field by flagging, three tick species were identified, *Dermacentor marginatus*, *Dermacentor reticulatus* and *Ixodes ricinus*. Ticks belonging to *D. marginatus* represented two thirds of the sampling and 107 *D. marginatus* adults have been studied in detail. All individuals were tested by PCR and found positive for the *Coxiella*-like endosymbiont of *D. marginatus* (CLEdM). *Spiroplasma* spp. and *Rickettsia* spp. bacteria were also frequently found in these samples. Sequences of some PCR products indicated that the *Spiroplasma* spp. in *D. marginatus* is closely related to *S. ixodetis*. *Rickettsia* sequences matched perfectly with *Rickettsia slovaca* sequences deposited in Genbank. Primers were designed to detect specifically these bacteria and used to determine the infection status for all tested ticks. Unlike CLEdM, *Spiroplasma* and *Rickettsia* were not fixed. They infect respectively 55.14% (N=59) and 23.36% (N=25) of the population. There are also numerous cases of co-infection with 14.01% (N=15) of hosts multiply infected by *Coxiella*-LE, *Spiroplasma* and *Rickettsia* bacteria (Fig. 1). Sex, years and sampling zone of ticks did not impact the rate of infection for each symbiont (Fisher's exact test, $p=0.54$ for

sex, $p= 0.563$ for years, and $p= 0.3944$ for sampling). The observed distribution of infections was similar to the expected distribution based on independence between symbionts (Chi2 test, $\chi^2=0,26630$, $ddl=4$, $p>0,98$), thus revealing no interaction between symbionts for adult infection status.

Impact of co-infection on individual ticks

As expected, a significant difference in the patella length was detected when comparing ticks from different sexes (ANOVA, $F_{1,88} = 6.37$, $p= 0.0143$). Unfed males were bigger than females with a mean value for this leg segment of $870.16 \pm 95.07\mu\text{m}$ (N=48) and $830.68 \pm 74.88\mu\text{m}$ (N=59), respectively. While years and zones of sampling had no impact, the infection status affected tick size (ANOVA, $F_{3,93} = 11.137$, $p= 6.84e-06$).

Females had a mean value of $868.14 \pm 62.2\mu\text{m}$ when only infected by *Coxiella*-LE (N=51). This value reach $829.135 \pm 56.11\mu\text{m}$ (N=8) and $820.34 \pm 77.07\mu\text{m}$ (N=22) in case of a co-infection with *Rickettsia* and *Spiroplasma*, respectively (Fig. 2a). When females were infected by all these three bacteria (N=8) the mean value of their leg segment significantly dropped to $761.04 \pm 66.43\mu\text{m}$ ($p= 2.06e-3$)(Fig. 2a). Triple infection thus had a strong impact on the female tick size with a reduction of more than 10% compared to females singly infected by *Coxiella*-LE. Unfed males only infected by *Coxiella*-LE had a mean value for the segment studied of $934.16 \pm 65.34\mu\text{m}$ (N=41). In case of co-infection with *Spiroplasma* this value reach $873.64 \pm 86.32\mu\text{m}$, (N=24) and dropped to $774.61 \pm 13.44\mu\text{m}$ (N=2, $p=0.04$) (Fig. 2b) in case of a co-infection with *Rickettsia*. The segment is also significantly reduced for males infected by all bacteria, with a mean value of $777.21 \pm 60.12\mu\text{m}$ (N=7), compared to males only infected by *Coxiella* ($p=8.38e-4$) (Fig. 2b). Thus, in males, as in females, a strong cost is

associated with multiple infections in *D. marginatus*.

Impact of co-infections on transmission and density of symbionts

Seven engorged *D. marginatus* females were kept alive after sampling on their bovine host until they laid eggs. All of them were positive for *Coxiella* and *Spiroplasma*, but only 5 out of 7 were infected with *Rickettsia*. After emergence, the infection status of some larvae from each batch was determined to estimate the rate of maternal transmission (Fig. 3). The rate of vertical transmission reached more than 80 % for *Coxiella*-LE, but was lower for *Spiroplasma* and *Rickettsia*, with an average of 27% for both symbionts. However, important variations were present between families. For instance, all larvae were infected by *Spiroplasma* in some families (L1), whereas in others only 8.33% of the larvae were positive for this symbiont (L8) (Fig. 3). Opposite results were found when looking at the vertical transmission rate of *Rickettsia* for these two different families.

qPCR assays developed to determine the infection status of larvae also gave specific information about density of each symbionts within new-born larvae. Equivalent density of *Coxiella*-LE were also found in single or multi infected ticks (Generalized linear mixed model, t value=0.352, $p= 0.7252$) (Fig. 4) Other symbionts are also equally present in singles or multiply infected hosts but, due to low sampling size, the impact of the batching on the infection status could not have been tested. Symbionts density in larvae does not seem impacted by the infection status (ANOVA, $F_{3,31}= 0.1153$, $p= 0.9505$ for *Rickettsia*; $F_{3,38}= 0.2307$, $p= 0.8744$ for *Spiroplasma*).

DISCUSSION

Ticks have been extensively studied for their ability to vector pathogens. However, during the last decade, many studies have made it clear that ticks do not only host pathogens. These non-pathogenic symbionts have to be studied too as they could impact tick biology or interact with transmission of pathogens (Bonnet *et al.*, 2017).

Results obtained from individuals collected two different years show that *D. marginatus* are frequently infected by *Coxiella*-LE, *Rickettsia* and *Spiroplasma* symbionts. *Coxiella*-LE infection has reached fixation in the population tested for adults, supporting the idea of a potential role of these bacteria for their tick hosts (Mediannikov *et al.*, 2003; Jasinskas *et al.*, 2007; Klyachko *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2013). On the contrary, *Spiroplasma* and *Rickettsia* were found at intermediate prevalence, infecting respectively more than $\frac{2}{3}$ and nearly $\frac{1}{4}$ of the population. Pathogenic potential of tick-borne *Spiroplasma* has not been determined, but they are considered as 'potential zoonotic bacterium' due to their abundant occurrence in the salivary glands of some tick species (Taroura *et al.*, 2005). *Rickettsia rpoB* sequences amplified in the tick DNA templates correspond perfectly with *Rickettsia slovaca*, which is considered as a pathogen responsible for a syndrome characterized by scalp eschars and neck lymphadenopathy following tick bites, call the "SENLAT" (Angelakis *et al.*, 2010). These bacteria have already been frequently reported associated with *Dermacentor* ticks in Europe (Parola *et al.*, 2013). If *Spiroplasma* and *Rickettsia* found in *D. marginatus* ticks could be potential tick-borne pathogens, their high prevalence and their vertical transmission make them endosymbionts of ticks above all. It is then interesting to measure their impact on the ticks and to study the interaction between the symbiotic bacteria, since most individuals do

not only harbor *Coxiella*-LE and that more than 13% of the individuals are infected by all three bacteria.

In this study we managed to observe a significant decrease in size in multiply-infected *D. marginatus*. Triply infected ticks have a 10% lower size than the ones only infected by *Coxiella*-LE. Such observation is striking on individuals sampled in the field, as many environmental factors are not controlled. Co-infections could have both an impact on symbiotic communities and on the host (Ferrari and Vavre, 2011). But even on well-known insect models, as aphids, their associated phenotype are not always described and are sometimes hard to explain (Mclean *et al.*, 2017).

Generally insect's body size is positively correlated with their fitness, examples in hymenopteran parasitoids show that bigger individuals have better reproductive success (Kazmer and Luck, 1995; West *et al.*, 1996). In arachnids size and morphology are also important for the fitness, since decrease in leg length negatively impact the ability of individuals to hunt their prey or to flee their predators (Dor and Hénaut, 2013; McGinley *et al.*, 2013). Our results seems to indicate high costs associated with multiple infections in *D. marginatus* ticks, however it would be important to test the causality of the infection status on the ticks fitness in laboratory condition with breeding methods. In fact, nothing could refute the reverse hypothesis which would be that a decrease in ticks fitness could enhance their probability to be multiply infected.

In anyways these result raise the question of the maintenance of these symbionts in co-infections in such high prevalence in *D. marginatus* ticks.

High cost associated with multiple infection have already been described in other arthropods

it could result of a intra-host competition between symbionts and may impact the benefits provided by some of these micro-organisms. For example, decrease in *Coxiella*-LE abundance, could affect the ability of this symbiont to provide B vitamins to the tick (Guizzo *et al.*, 2017). However, we could not detect any direct interaction among symbionts on their respective density. Another possibility is that *Spiroplasma* and/or *Rickettsia* are virulent. Interestingly, in function of the sex, different patterns were observed. In particular, males *D. marginatus* infected by CLEDM and *Rickettsia* are as small as triply infected ones, while in females triply infected individuals were the most affected by infection. Male-specific virulence of *Rickettsia* could be explained by the fact that virulence must be better controlled in females when maternal transmission occurs. Our results indeed show that vertical transmission does occur for all three symbionts from mother to larvae, but at very different rates. Results show that vertical transmission is high, but still incomplete for *Coxiella*-LE in *D. marginatus*. The rate of transmission calculated here (80%) is lower than the ones calculated in other studies (>99%). Different rates of vertical transmission among *Coxiella*-LE depending on their relationship with their tick hosts are possible but biases in our study could also explain the lower ratio. In order to detect symbionts in larval DNA templates, specific quantitative PCR assays have been developed. This method is more sensitive than normal PCR assays, especially for small quantities of DNA (Heid *et al.*, 1996; Smith and Osborn, 2009). However, most studies on transmission of *Coxiella*-LE in tick hosts have been conducted in laboratory conditions. On the contrary, ticks were sampled in their natural environment and it is possible that engorged female had not achieved a complete oogenesis since their blood meal was interrupted. *Coxiella*-LE are known to infect tick eggs during their maturation (Lalzar *et al.*, 2014), and interruption of blood meal in female ticks could have impacted the transmission of symbionts. This is even more plausible that despite only the

most engorged females were chosen to lay eggs, only half of them (7/15) produced a significant batch of eggs. If transmission to larvae is indeed incomplete, the fact that *Coxiella*-LE was found fixed in adults could reveal important transtadial selection for individuals infected by *Coxiella*-LE, as expected if this symbiont provides B vitamins to the tick. As opposed to the relatively high rate of vertical transmission for *Coxiella*-LE, the rates of maternal transmission were low for *Spiroplasma* and *Rickettsia* symbionts, reaching respectively 27%.

Given the high cost of multiple infections and the low maternal transmission of *Spiroplasma* and *Rickettsia*, we can wonder how these symbionts and multiple infections are maintained in *D. marginatus*. Under strict vertical transmission, symbionts should either provide benefits to their host, or manipulate their reproduction to be maintained in host populations (Ferrari and Vavre, 2011). None of these hypotheses appears plausible. First; the benefit provided would have to be very high to compensate for the high cost and the low transmission rate. Second, prevalence of these symbionts are similar in both sexes, excluding manipulation of sex-ratio by the symbionts. Finally, given the low frequency of the symbionts, cytoplasmic incompatibility would be an insufficient driving force to maintain infection.

A most likely hypothesis is thus that other ways than maternal transmission are used by *Spiroplasma* and *Rickettsia*. These symbionts are able to colonize ticks salivary glands (Taroura *et al.*, 2005; Narasimhan and Fikrig, 2015), which could facilitate horizontal transmission during a blood meal. Seroprevalences of *R. slovaca* are commonly reported in domestic ruminants suggesting its circulation within mammalian hosts (Fuente, 2008; Ortuño *et al.*, 2012; Ahantarig *et al.*, 2013). Co-feeding could also occur as described for many tick-borne pathogens, like the causative agent of Lyme disease, *Borrelia burgdorferi* (Randolph *et al.*, 1996; Voordouw, 2015). Interestingly, this hypothesis could also explain the high cost

associated with multiple infections. Indeed, while vertical transmission tend to align the interests of hosts and symbionts, horizontal transmission may select for a level of virulence that optimize the transmission of the symbionts. In any case, these results suggest that horizontal transmission of endosymbionts may actually play a major role on the epidemiology of symbionts and not only at the evolutionary scale. Other examples have recently demonstrated cases of horizontal transmission in other biological models such as *Wolbachia* and *Rickettsia* in whiteflies through plants (Brownlie and Johnson, 2009; Li *et al.*, 2017). Mixture of vertical and horizontal transmission may favor rapid transitions in the symbiont way of life in the arthropod host (from mutualism to parasitism), but also in the vertebrate host. This mode of transmission alter the classic vision of the symbiosis since different selection apply on the different ways of transmission. It thus raises the question of defining which organism between the arthropod and the vertebrate is the main host for the symbiont, the vector and/or the reservoir.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are most grateful to Marie-Thérèse Poirel for her technical assistance. This work was supported by grants of Vetagro-sup and was performed within the framework of the LEGCOXINET Ecofect LabEx of Université de Lyon..

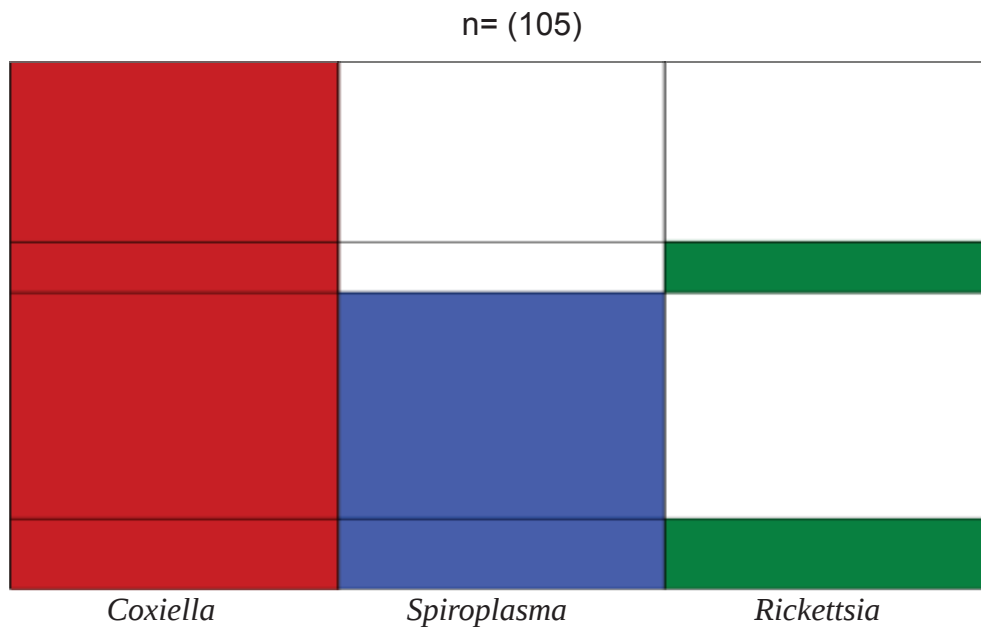


Fig 1. Infection status of wild-caught adults *Dermacentor marginatus*
 Coloured bar : Prevalence of a given endosymbiont within the population.
 Red – *Coxiella*, Blue – *Spiroplasma* and Green – *Rickettsia*
 Horizontal lines (combinations of different colours) : Percentage of individuals sharing the same endosymbiotic community

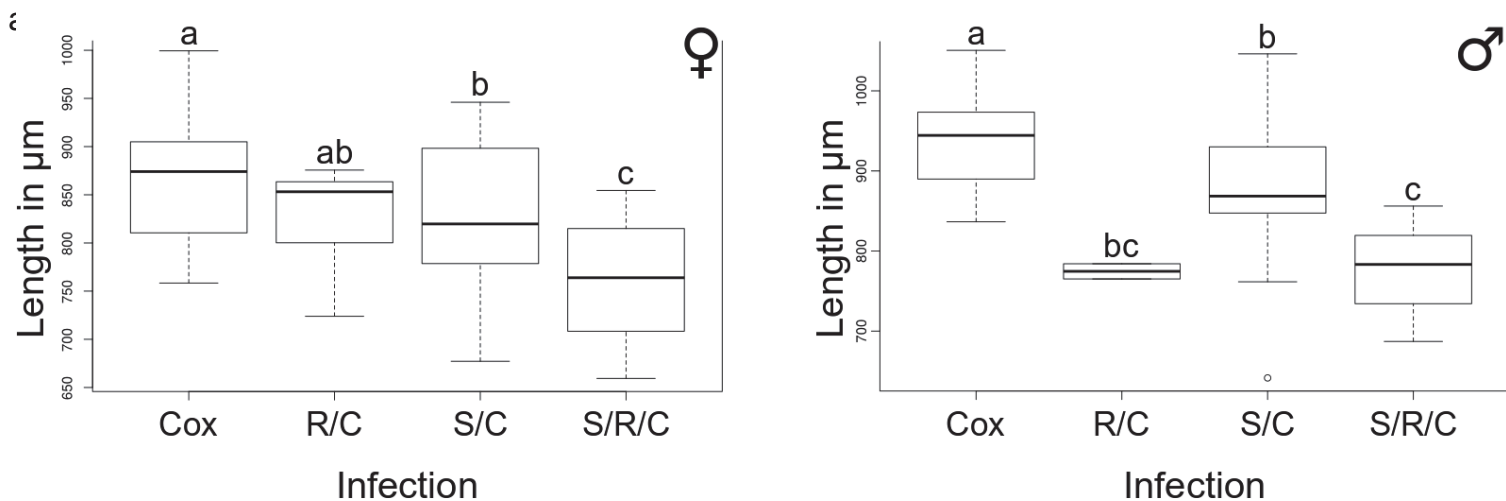


Fig 2. Correlation between the patella length and the infection status.
 (a) Measure for female *D. marginatus* and (b) Measure for male *D. marginatus*
 Infection status vary from mono infected by *Coxiella* (Cox), infected by *Rickettsia* and *Coxiella* (R/C), infected by *Spiroplasma* and *Coxiella* (S/C) to infected by all these symbionts S/R/C
 Different letters denote significant differences at the $p < 0.05$ level using Tukey's post hoc tests for pairwise comparison.

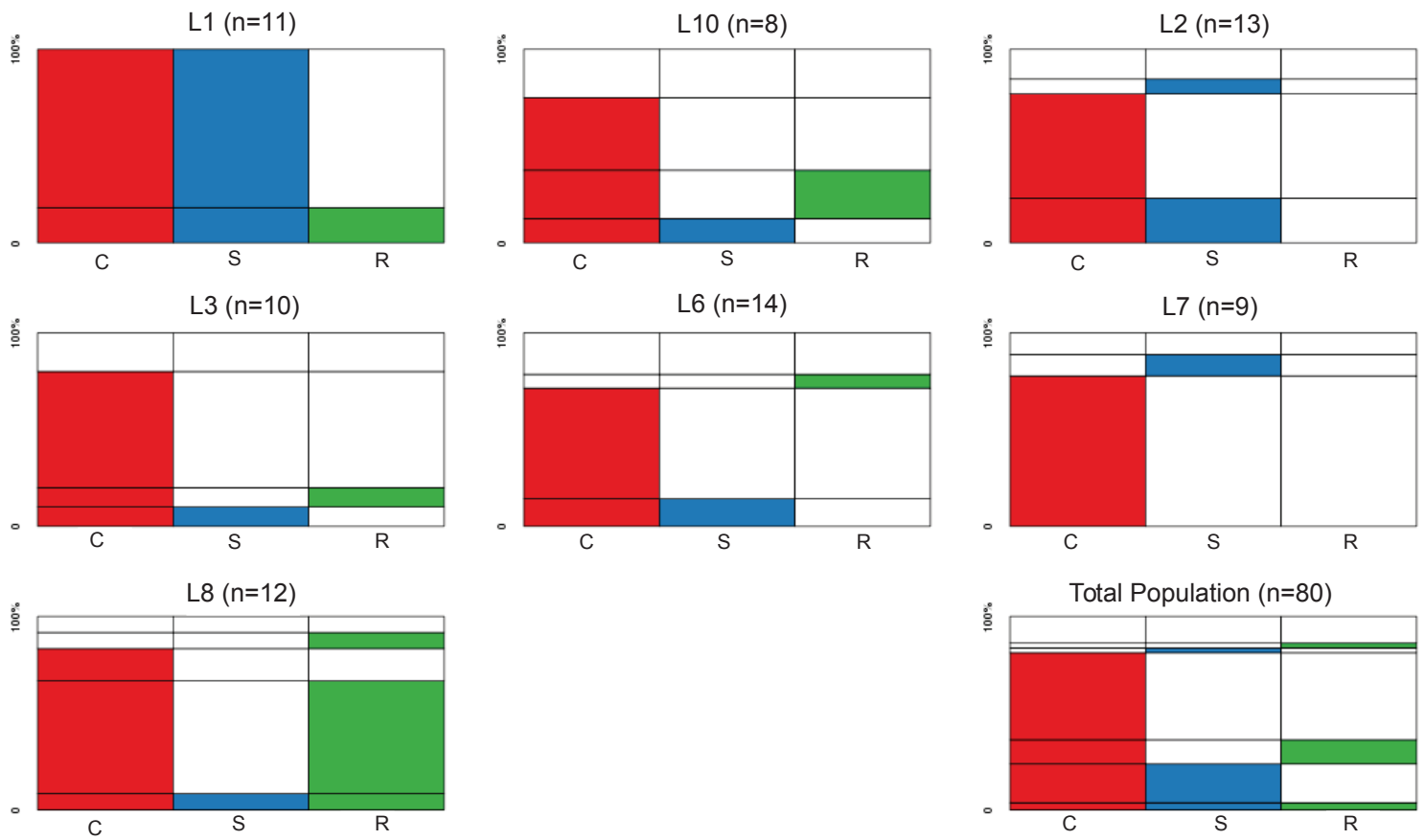


Fig 3. Infection status observed in *Dermacentor marginatus* larvae.

Each diagram corresponds to the offspring of a single mother

Red – *Coxiella*-LE, Blue – *Spiroplasma*, Green – *Rickettsia*

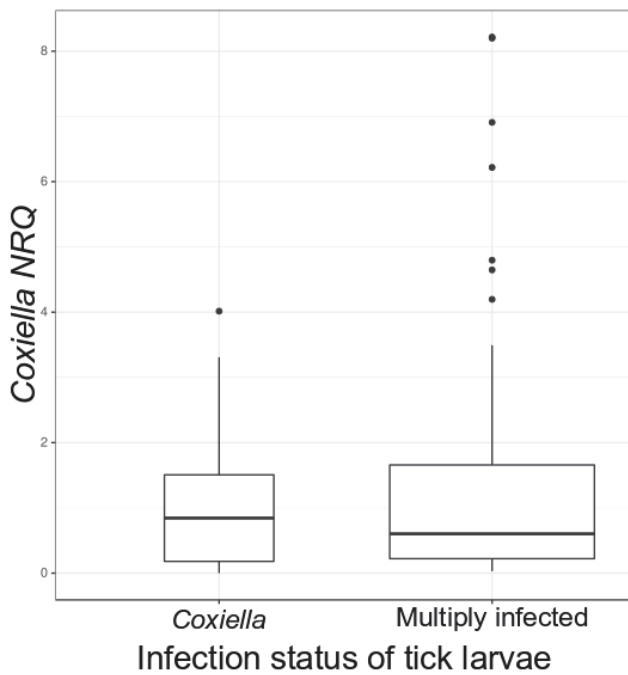


Fig 4. *Coxiella* NRQ measured in tick larvae infected or not by other symbiont(s)

Organisms	Name	Sequence	Origin	Tm	
<i>Coxiellaceae</i>	Cox_rpoB_F2	GGGCGNCAYGGWAAYAAAGGSGT	(Duron et al. 2017)	56°C	PCR
	Cox_rpoB_R1	CACCRAAHC GTTGACCRCCAAATTG			
<i>Coxiella</i> -LE	Cox_tick_16S_F1	CGTAGGAATCTACCTTRTAGWGG	(Duron et al. 2017)	56°C	
	Cox_tick_16S_R2	GCCTACCCGCTTCTGGTACAATT			
<i>Rickettsia</i>	rpoB-Fav	CGTGTTGAAGGCGGTAATT	(Paddock et al. 2010)	58°C	
	rpoB-Rav	AAGAAAGCCACAAGCACGTT			
<i>Spiroplasma</i>	16F1	CTAATACATGCAAGTCGAACG	(Bi et al. 2008)	65°C	
	16R1	TTGCTGATTCGCGATTACTAG			
<i>Spiroplasma</i>	rpoF1	TGCGTAGTAATCAAGGAACTTCA	(Heres et al. 2010)	56°C	
	rpoR	GCTCAHACTTCCATTTCHCCAAA	(Bi et al. 2008)		
CLEDM	Cox_Dmarginatus_16S_F	AAATGACTTGGTGCCTTCGG	this study	58°C	
	Cox_Dmarginatus_16S_R	TCCAGCTTCATGGAGTCGAG			
<i>Spiroplasma</i>	16S_Spiro_ixo_F	AACTTCTACGGAAGGCAGCA	this study	58°C	
	16S_Spiro_ixo_R	TTCCACCGCTACACATGAAA			
<i>Rickettsia</i>	rpoB_Rslov_F	CGGATAACGGTCAAATTGCT	this study	58°C	
	rpoB_Rslov_R	GGCGATTCACTTTTTGGTGT			
<i>D. marginatus</i>	q18S_F2	AGCTCGTAGTTGGATCTCAGT	this study	58°C	
	q18S_R2	GAATTCACCTCTAGCGCCG			
<i>Rickettsia</i>	rpoB_Rick_slo_F	GGCAGGAAGACACGGAAATAA	this study	62°C	qPCR
	rpoB_Rick_slo_R	CGGAAGACCTAGAGGGTTAAGA			
<i>Spiroplasma</i>	rpoB_Spiro_Ixo_F	GGCTGGAAGACACGGAAATAA	this study	62°C	
	rpoB_Spiro_Ixo_R	TCCGCGATGGTACTCCTAAT			
CLEDM	rpoB_CoxDmar_F	GAATATCGGAGAGGGTGCATTAG	this study	62°C	
	rpoB_CoxDmar_R	CTGGGTTTCACCTTAGGAGTT			
<i>D. marginatus</i>	18S_tick_Dmarg_F	CGCACGAAACAGAGCAATAAC	this study	62°C	
	18S_tick_Dmarg_R	CCCTATCCCAATCACGAAAGAA			

Table 1. Primers used in this study

REFERENCES

- Ahantarig, A., Trinachartvanit, W., Baimai, V. & Grubhoffer, L. 2013. Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens).
- Allen, J.M., Reed, D.L., Perotti, M.A. & Braig, H.R. 2007. Evolutionary relationships of “*Candidatus riesia* spp.,” endosymbiotic Enterobacteriaceae living within hematophagous primate lice. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1659–1664. American Society for Microbiology.
- Anderson, J.F. & Magnarelli, L.A. 2008. Biology of Ticks. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **22**: 195–215.
- Andreotti, R., Pérez de León, A.A., Dowd, S.E., Guerrero, F.D., Bendele, K.G. & Scoles, G.A. 2011. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol.* **11**: 6.
- Angelakis, E., Pulcini, C., Waton, J., Imbert, P., Socolovschi, C., Edouard, S., *et al.* 2010. Scalp Eschar and Neck Lymphadenopathy Caused by *Bartonella henselae* after Tick Bite. *Clin. Infect. Dis.* **50**: 549–551.
- Bi, K., Huang, H., Gu, W., Wang, J. & Wang, W. 2008. Phylogenetic analysis of *Spiroplasma*s from three freshwater crustaceans (*Eriocheir sinensis*, *Procambarus clarkia* and *Penaeus vannamei*) in China. *J. Invertebr. Pathol.* **99**: 57–65.
- Bonnet, S., de la Fuente, J., Nicolle, P., Liu, X., Madani, N., Blanchard, B., *et al.* 2013. Prevalence of Tick-Borne Pathogens in Adult *Dermacentor* spp. Ticks from Nine Collection Sites in France. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **13**: 226–236.
- Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A.M. & Duron, O. 2017. The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 1–14.
- Brown, J.H., Marquet, P.A. & Taper, M.L. 1993. Evolution of Body Size: Consequences of an Energetic Definition of Fitness. *Am. Nat.* **142**: 573–584.
- Brownlie, J.C. & Johnson, K.N. 2009. Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* **17**: 348–354.
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L. & Davis, E.G. and J.P. 1982. Lyme Disease – A Tick-Borne Spirochetosis? *Science (80-)*. **216**: 1317–1319.
- Burgdorfer, W., Brinton, L.P. & Hughes, L.E. 1973. Isolation and characterization of symbiotes from the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *J. Invertebr. Pathol.* **22**: 424–434.
- Burgdorfer, W., Hayes, S.F. & Mavros, A.J. 1981. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor*

- andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: *Rickettsiae and rickettsial diseases*, pp. 585–594.
- Carpi, G., Cagnacci, F., Wittekindt, N.E., Zhao, F., Qi, J., Tomsho, L.P., *et al.* 2011. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One* **6**: e25604.
- Clay, K., Klyachko, O., Grindler, N., Civitello, D., Oleske, D. & Fuqua, C. 2008. Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Mol. Ecol.* **17**: 4371–4381.
- Cowdry, E. V. 1925. A group of microorganisms transmitted hereditarily in ticks and apparently unassociated with disease. *J. Exp. Med.* **41**: 817–830.
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B. & Otranto, D. 2012. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* **28**: 437–446. Elsevier Ltd.
- Donald, K.J., Clarke, H. V, Mitchell, C., Cornwell, R.M., Hubbard, S.F. & Karley, A.J. 2016. Protection of Pea Aphids Associated with Coinfecting Bacterial Symbionts Persists During Superparasitism by a Braconid Wasp. *Microb. Ecol.* **71**: 1–4.
- Douglas, A.E. 1998. Nutritional Interactions in Insect-Microbial Symbioses: Aphids and Their Symbiotic Bacteria *Buchnera*. *Annu. Rev. Entomol.* **43**: 17–37.
- Duron, O., Binetruy, F., Noël, V., Cremaschi, J., McCoy, K.D., Arnathau, C., *et al.* 2017. Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol. Ecol.* **26**: 2905–2921.
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstädter, J., *et al.* 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol.* **6**: 27.
- Duron, O., Noël, V., McCoy, K.D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., *et al.* 2015. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLOS Pathog.* **11**: e1004892.
- Engelstädter, J. & Hurst, G.D.D. 2009. The Ecology and Evolution of Microbes that Manipulate Host Reproduction. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **40**: 127–149.
- Ferrari, J. & Vavre, F. 2011. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biological Sci.* **366**: 1389–1400.
- Fuente, J. de la. 2008. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Front. Biosci.* **Volume**: 6938.
- Gottlieb, Y., Lalzar, I. & Klasson, L. 2015. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol. Evol.* **7**: 1779–1796.

- Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J. & Williams, P.M. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res.* **6**: 986–994.
- Heinzen, R.A., Hackstadt, T. & Samuel, J.E. 1999. Developmental biology of *Coxiella burnetii*. *Trends Microbiol.* **7**: 149–154.
- Heres, A. & Lightner, D. V. 2010. Phylogenetic analysis of the pathogenic bacteria *Spiroplasma penaei* based on multilocus sequence analysis. *J. Invertebr. Pathol.* **103**: 30–35. Elsevier Inc.
- Heyman, P., Cochez, C., Hofhuis, A., van der Giessen, J., Sprong, H., Porter, S.R., *et al.* 2010. A clear and present danger: tick-borne diseases in Europe. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* **8**: 33–50.
- Hornok, S., Meli, M.L., Perreten, A., Farkas, R., Willi, B., Beugnet, F., *et al.* 2010. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Vet. Microbiol.* **140**: 98–104.
- Hurst, G. & Jiggins, F.M. 2000. Male-Killing Bacteria in Insects: Mechanisms, Incidence, and Implications. *Emerg. Infect. Dis.* **6**: 329–336.
- Jasinskas, A., Zhong, J. & Barbour, A.G. 2007. Highly prevalent *Coxiella* sp. bacterium in the tick vector *Amblyomma americanum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 334–336.
- Jongejan, F. & Uilenbenberg, G. 2005. The global importance of ticks.
- Klyachko, O., Stein, B.D., Grindle, N., Clay, K. & Fuqua, C. 2007. Localization and visualization of a *Coxiella*-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6584–6594.
- Lalzar, I., Friedmann, Y. & Gottlieb, Y. 2014. Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environ. Microbiol.* **16**: 3657–3668.
- Lalzar, I., Harrus, S., Mumcuoglu, K.Y. & Gottlieb, Y. 2012. Composition and Seasonal Variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 4110–4116.
- Li, S.-J., Ahmed, M.Z., Lv, N., Shi, P.-Q., Wang, X.-M., Huang, J.-L., *et al.* 2017. Plantmediated horizontal transmission of *Wolbachia* between whiteflies. *ISME J.* **11**: 1019–1028. Nature Publishing Group.
- Liu, L., Li, L., Liu, J., Hu, Y., Liu, Z., Guo, L., *et al.* 2013. Coinfection of *Dermacentor silvarum olenov* (Acari: Ixodidae) by *Coxiella*-like, *Arsenophonus*-like, and *Rickettsia*-like symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 2450–2454.
- Mediannikov, O., Ivanov, L., Nishikawa, M., Saito, R., Sidelnikov, Y.N., Zdanovskaya, N.I., *et al.* 2003. Molecular Evidence of *Coxiella*-like Microorganism Harbored by

- Haemaphysalis concinnae* Ticks in the Russian Far East. *Ann. N.Y. Acad. Sci* **990**: 226–228.
- Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., Drancourt, M., Roux, V., Rydkina, E., *et al.* 2008. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group *Rickettsia* associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1635–1639.
- Mixson, T.R., Campbell, S.R., Gill, J.S., Ginsberg, H.S., Reichard, M. V, Schulze, T.L., *et al.* 2006. Prevalence of *Ehrlichia*, *Borrelia*, and Rickettsial agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from nine states. *J. Med. Entomol.* **43**: 1261–1268.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P. & Nakabachi, A. 2008. Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 165–190.
- Mudrow, E. 1932. Über die intrazellulären Symbionten der Zecken. *Zeitschrift für Parasitenkd.* **5**: 138–183.
- Narasimhan, S. & Fikrig, E. 2015. Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol.* **31**: 315–323.
- Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., Zhao, Y.O., Heisig, J., Pan, J., *et al.* 2014. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host Microbe* **15**: 58–71.
- Nicholson, W.L., Allen, K.E., McQuiston, J.H., Breitschwerdt, E.B. & Little, S.E. 2010. The increasing recognition of rickettsial pathogens in dogs and people. *Trends Parasitol.* **26**: 205–212. Elsevier Ltd.
- Noda, H., Munderloh, U.G. & Kurtti, T.J. 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3926–32. American Society for Microbiology.
- Ortuño, A., Pons, I., Quesada, M., Lario, S., Anton, E., Gil, A., *et al.* 2012. Evaluation of the Presence of *Rickettsia slovaca* Infection in Domestic Ruminants in Catalonia, Northeastern Spain. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **12**: 1019–1022.
- Paddock, C.D., Fournier, P.E., Sumner, J.W., Goddard, J., Elshenawy, Y., Metcalfe, M.G., *et al.* 2010. Isolation of *Rickettsia parkeri* and identification of a novel spotted fever group *Rickettsia* sp. from Gulf Coast ticks (*Amblyomma maculatum*) in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 2689–2696.
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., *et al.* 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**: 657–702.

- Perez-Eid, C. & Gilot, B. 1998. Les tiques : cycles, habitats, hôtes, rôle pathogène, lutte. *Médecine Mal. Infect.* **28**: 335–343.
- Pfaffl, M.W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res.* **29**: 16–21. Oxford Univ Press.
- Piesman, J.F. & Dennis, D.T. 2005. Overview of Tick-Borne Infections of Humans. In: *Tick-Borne Diseases of Humans*, pp. 3–11. American Society of Microbiology.
- Qiu, Y., Nakao, R., Ohnuma, A., Kawamori, F. & Sugimoto, C. 2014. Microbial population analysis of the salivary glands of ticks; a possible strategy for the surveillance of bacterial pathogens. *PLoS One* **9**: 1–11.
- R Core Team, R.A. language and environment for statistical computing. 2013. R: A language and environment for statistical computing.
- Randolph, S.E., Gern, L. & Nuttall, P.A. 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. Today* **12**: 472–479.
- Rio, R.V.M., Symula, R.E., Wang, J., Lohs, C., Wu, Y. neng, Snyder, A.K., *et al.* 2012. Insight into the Transmission Biology and Species-Specific Functional Capabilities of Tsetse (Diptera: Glossinidae) Obligate Symbiont *Wigglesworthia*. *MBio* **3**: 1–13. American Society for Microbiology.
- Rizzoli, A., Silaghi, C., Obiegala, A., Rudolf, I., Hubálek Z., Földvári, G., *et al.* 2014. *Ixodes ricinus* and Its Transmitted Pathogens in Urban and Peri-Urban Areas in Europe: New Hazards and Relevance for Public Health. *Front. Public Heal.* **2**: 251.
- Sanogo, Y.O., Davoust, B., Parola, P., Camicas, J.L., Brouqui, P. & Raoult, D. 2003. Prevalence of *Rickettsia* spp. in *Dermacentor marginatus* ticks removed from game pigs (*Sus scrofa*) in southern France. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **990**: 191–195.
- Sassera, D., Epis, S., Pajoro, M. & Bandi, C. 2013. Microbial symbiosis and the control of vector-borne pathogens in tsetse flies, human lice, and triatomine bugs. *Pathog. Glob. Health* **107**: 285–292.
- Scarborough, C.L. 2005. Aphid Protected from Pathogen by Endosymbiont. *Science (80-.)*. **310**: 1781–1781. American Association for the Advancement of Science.
- Schouls, L.M., Van De Pol, I., Rijpkema, S.G. & Schot, C.S. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2215–22. American Society for Microbiology.
- Smith, C.J. & Osborn, A.M. 2009. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol. Ecol.* **67**: 6–20.
- Smith, T.A., Driscoll, T., Gillespie, J.J. & Raghavan, R. 2015. A *Coxiella*-like endosymbiont

- a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biol. Evol.* **7**: 831–838.
- Su, Q., Zhou, X. & Zhang, Y. 2013. Symbiont-mediated functions in insect hosts. *Commun. Integr. Biol.* **6**: e23804.
- Taroura, S., Shimada, Y., Sakata, Y., Miyama, T., Hiraoka, H., Watanabe, M., *et al.* 2005. Detection of DNA of “*Candidatus Mycoplasma haemominutum*” and *Spiroplasma* sp. in unfed ticks collected from vegetation in Japan. *J. Vet. Med. Sci.* **67**: 1277–9.
- Telford, S.R. & Goethert, H.K. 2004. Emerging tick-borne infections: rediscovered and better characterized, or truly “new”? *Parasitology* **129**: S301–S327.
- Tonbak, S., Aktas, M., Altay, K., Azkur, A.K., Kalkan, A., Bolat, Y., *et al.* 2006. Crimean-Congo Hemorrhagic Fever Virus: Genetic Analysis and Tick Survey in Turkey. *J. Clin. Microbiol.* **44**: 4120–4124.
- Tsuchida, T. 2004. Host Plant Specialization Governed by Facultative Symbiont. *Science* (80-.). **303**: 1989–1989. American Association for the Advancement of Science.
- van Schaik, E.J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M.M. & Samuel, J.E. 2013. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 561–73.
- Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Michelet, L., Devillers, E., Bonnet, S., Cheval, J., *et al.* 2013. Next Generation Sequencing Uncovers Unexpected Bacterial Pathogens in Ticks in Western Europe. *PLoS One* **8**: e81439.
- Voordouw, M.J. 2015. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* **142**: 290–302.
- Williams-Newkirk, A.J., Rowe, L.A., Mixson-Hayden, T.R. & Dasch, G.A. 2014. Characterization of the Bacterial Communities of Life Stages of Free Living Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). *PLoS One* **9**: e102130.
- Zhong, J., Jasinskas, A. & Barbour, A.G. 2007. Antibiotic Treatment of the Tick Vector *Amblyomma americanum* Reduced Reproductive Fitness. *PLoS One* **2**: e405.

Discussion

Les résultats obtenus à partir d'individus recueillis au cours de trois années montrent que les tiques *D. marginatus* sont fréquemment infectées par les symbiotes *Coxiella*-LE, *Rickettsia* et *Spiroplasma*. L'infection par *Coxiella*-LE a atteint la fixation chez les adultes dans cette population, soutenant l'idée d'un rôle nutritionnel de ces bactéries pour leurs hôtes. Au contraire, *Spiroplasma* et *Rickettsia* sont associés à des prévalences intermédiaires, infectant respectivement plus de $\frac{2}{3}$ et près d' $\frac{1}{4}$ de la population. Ainsi, il est fréquent de retrouver des infections multiples chez les tiques *D. marginatus* et plus de 13 % des individus échantillonnés dans cette étude étaient infectés par ces trois symbiotes simultanément. Ces infections multiples ont un impact important sur la taille des tiques. Chez les femelles, les tiques triplement infectées ont ainsi une taille 10% plus petite que celles seulement infectées par les *Coxiella*-LE. Une telle observation est frappante pour des individus échantillonnés sur le terrain, car de nombreux facteurs environnementaux ne sont pas contrôlés et semblent indiquer un fort impact de ces infections multiples sur la taille, et potentiellement sur la valeur adaptative des tiques. Pour évaluer les interactions entre ces bactéries, nous avons étudié leur transmission et leur densité. Cependant, nous n'avons pas pu détecter d'interactions directes entre les symbiotes sur ces deux paramètres. Ces résultats doivent toutefois être confirmés étant donné les faibles effectifs étudiés. De plus si nos résultats semblent indiquer un fort coût aux infections multiples chez les tiques *D. marginatus* adultes, il serait important de vérifier cette hypothèse en conditions contrôlées, avec des tiques issues d'élevage. En effet si cette hypothèse est très probable, comme le montrent de nombreux exemples de coûts associés à des co-infection chez d'autres arthropodes (Mouton *et al.*, 2004; Oliver *et al.*, 2006), rien ne confirme la causalité entre la co-infection et la taille des tiques. On peut ainsi faire l'hypothèse que certaines tiques du fait d'une fitness moindre seraient plus propices à de multiples infection.

Le coût élevé de ces infections multiples est toutefois très intéressant car il pose la question du maintien de ces symbiotes chez *D. marginatus*. Avec un mode de transmission vertical strict, ces symbiotes devraient soit, apporter des avantages à leur hôte, comme c'est sûrement le cas pour les *Coxiella*-LE, soit manipuler leur reproduction (Ferrari & Vavre, 2011). Ces deux hypothèses sont cependant très improbables au vu de la faible transmission

maternelle et du coût élevé de *Spiroplasma* et *Rickettsia*. Ces deux symbiotes utilisent probablement la transmission horizontale et sont d'ailleurs retrouvés dans les glandes salivaires des tiques (Jasinskas *et al.*, 2007; Narasimhan & Fikrig, 2015). Les séquences des bactéries *Rickettsia* étudiées sont très proches de celles de *R. slovaca*. Or les séroprévalences de *R. slovaca* sont communément détectées chez les ruminants domestiques suggérant sa circulation chez les hôtes mammifères (Ortuño *et al.*, 2012). Le phénomène de co-feeding pourrait également faciliter leur transmission comme c'est le cas pour pour *Borrelia burgdorferi*, l'agent responsable de la maladie de Lyme (Randolph *et al.*, 1996; Voordouw, 2015). Cette hypothèse pourrait également expliquer le coût élevé associé aux infections multiples, car si la transmission verticale tend à aligner les intérêts des hôtes et des symbiotes, la transmission horizontale sélectionne les symbiotes ayant un niveau de virulence qui optimise leur transmission.

Afin de vérifier nos conclusions, il serait tout de même intéressant de tester la transmission horizontale de ces bactéries. Pour cela des expériences sur des tiques issues d'élevages et en conditions contrôlées devraient être réalisées. Ces expériences pourraient déterminer si des tiques non infectées par *Spiroplasma* ou *Rickettsia* peuvent effectivement acquérir ces symbiotes par co-feeding.

Discussion générale

L'objectif de ce travail de thèse était d'étudier les relations qu'entretiennent les *Coxiella* endosymbiotiques de tiques avec leurs hôtes, mais aussi de comprendre quand et comment a évolué la pathogénie dans ce genre bactérien.

I. Rôle des *Coxiella*-LE chez les tiques

1) Des symbiotes certainement nutritionnels ...

Sur tous les continents, on retrouve des bactéries du genre *Coxiella* associées à de nombreuses espèces de tiques. La forte incidence de ces bactéries chez les tiques est, de plus, souvent associée à des prévalences importantes puisque les *Coxiella*-LE sont généralement fixées dans les populations étudiées. La réalisation de la phylogénie du genre *Coxiella* a permis d'observer l'importante diversité génétique de ces bactéries et indique que *Coxiella* et tiques sont intimement associées. Les *Coxiella*-LE sont d'ailleurs les principaux symbiotes à transmission maternelle retrouvés chez ces arthropodes et leur tropisme particulier, dans les tubes de Malpighi, pourrait indiquer un rôle nutritionnel (Lalzar *et al.*, 2014; Bonnet *et al.*, 2017).

Chez les hématophages stricts la supplémentation en vitamines B est essentielle du fait de leur régime alimentaire. Tous les génomes de *Coxiella* séquencés possèdent les gènes nécessaires à la biosynthèse de vitamines B et des cofacteurs associés (Smith *et al.* 2015; Gottlieb *et al.* 2015 ; Article 1). La présence de ces gènes, notamment dans les génomes fortement réduits (CLEEA, CLEDm), conforte l'idée d'un rôle nutritionnel de ces bactéries. Les *Coxiella*-LE sont donc vraisemblablement des symbiotes obligatoires pour leur hôte tique. Des expériences *in vivo* de supplémentation en vitamines B doivent toutefois confirmer ce rôle nutritionnel en restaurant une valeur adaptative normale chez des tiques ayant subi l'élimination de ces symbiotes (en utilisant des antibiotiques par exemple), comme cela a été réalisé chez d'autres arthropodes hématophages (Nogge, 1981; Hosokawa *et al.*, 2010).

2) ... mais avec une histoire évolutive particulière

Si les *Coxiella*-LE semblent être des symbiotes obligatoires de tiques assurant la supplémentation en vitamines B, l'histoire évolutive des bactéries *Coxiella* est très différente de celle classiquement observée chez d'autres symbiotes nutritionnels. La phylogénie de ce genre bactérien est tout d'abord globalement incongruente avec celle des tiques : il n'y a donc pas co-cladogénèse entre les *Coxiella*-LE et leur hôte excepté au sein de genres de tiques particuliers. Ce phénomène est pourtant typiquement observé dans le cas des symbioses obligatoires (Clark *et al.*, 2000; Lo *et al.*, 2003). De plus, les faibles prévalences, voire même l'absence de *Coxiella*-LE chez certaines espèces de tiques, indiquent que d'autres symbiotes, notamment des *Fransicella*-LE, doivent assurer la supplémentation en vitamines B dans certaines espèces. Les symbiotes assurant la biosynthèse de vitamines B chez les tiques peuvent ainsi être remplacés par des bactéries apparentées ou par d'autres espèces bactériennes (Duron *et al.* 2017). Ces remplacements fréquents suggèrent de nombreux transferts horizontaux dans le genre *Coxiella*.

Par ailleurs, si chez certaines *Coxiella* on assiste à une forte érosion génomique (CLEAA et CLEDm), classique chez des symbiotes obligatoires, d'autres, comme CRt et CLEOmar possèdent des génomes plus grands où de nombreux pseudogènes et éléments mobiles sont retrouvés. Ces génomes ressemblent plus à des génomes retrouvés après une transition récente vers le mode de vie endosymbiotique ou de symbiotes secondaires. Il est tentant de proposer que ces bactéries, en maintenant une certaine plasticité de leur génome, puissent présenter une plus grande capacité à coloniser de nouveaux hôtes et à exclure des bactéries ayant déjà subi une érosion importante de leur génome.

Ces différents éléments suggèrent fortement que la symbiose *Coxiella*-tique est donc bien plus dynamique que les interactions classiques entre hôtes et symbiotes nutritionnels.

II. Virulence dans le genre *Coxiella*

La phylogénie du genre *Coxiella* montre l'émergence de *C. burnetii* au sein d'une grande diversité de *Coxiella*-LE, toutes présentes chez les tiques (Duron *et al.*, 2015a). L'hypothèse de l'émergence unique et récente de la pathogénie semblait être la plus plausible suivant le principe de parcimonie. Pourtant le séquençage et l'étude de nouveaux génomes de *Coxiella*-LE, notamment celui de CLEOmar -très proche phylogénétiquement de *C. burnetii*-, contredisent cette hypothèse. En effet, les principaux gènes responsables de la virulence chez *C. burnetii* sont retrouvés fonctionnels ou à l'état de pseudogènes chez des *Coxiella*-LE. Ces gènes ne sont pas indispensables à la symbiose avec les tiques et sont généralement complètement perdus dans les génomes fortement réduits, mais leurs traces dans des clades distincts de *Coxiella*-LE témoignent d'une présence ancestrale. Par exemple, des gènes codant pour le système de sécrétion de type IV, permettant à *C. burnetii* de survivre et de manipuler le fonctionnement de ses cellules hôtes, sont retrouvés intacts ou à l'état de pseudogènes dans les génomes de CRt et de CLEOmar (Gottlieb *et al.* 2015 ; Article 2). Ce système de sécrétion n'est pourtant jamais fonctionnel chez les *Coxiella*-LE et n'est donc pas nécessaire à l'interaction avec les cellules hôtes de tique. Il semble donc que dans le genre *Coxiella* de multiples pertes de la virulence au profit de stratégies mutualistes aient eu lieu au cours de l'évolution.

Afin de réconcilier la phylogénie et les caractéristiques génomiques, il est nécessaire d'envisager que des branches sont manquantes dans l'arbre phylogénétique réalisé. Il doit ainsi exister des réservoirs de pathogènes inconnus ou éteints dans le genre *Coxiella*. En effet, les bactéries *Coxiella*-LE ont été découvertes récemment chez les tiques et d'autres bactéries appartenant au genre *Coxiella* peuvent encore être échantillonnées chez d'autres types d'hôtes, voire même dans l'environnement. Ainsi l'histoire évolutive du genre *Coxiella* pourrait ressembler à celle du genre *Francisella* où des bactéries pathogènes sont à l'origine de l'émergence de symbiotes de tiques à transmission maternelle (Gerhart *et al.*, 2016). Toutefois, dans le genre *Coxiella*, ces transitions auraient pu avoir lieu à de multiples reprises.

Au cours de leur évolution, les bactéries du genre *Coxiella* auraient développé différentes stratégies symbiotiques transitant du parasitisme au mutualisme. La dynamique de ces transitions fait du genre *Coxiella* un intéressant sujet d'étude. L'étude de nouvelles bactéries de ce genre est essentielle pour comprendre les mécanismes permettant de telles

transitions. Outre le séquençage d'autres *Coxiella*-LE de tique, il apparaît important de rechercher des *Coxiella* dans d'autres réservoirs potentiels. Par exemple, des bactéries présentant de forts taux d'homologie avec des bactéries du genre *Coxiella* semblent capables d'infecter des hôtes non apparentés à l'ordre des Ixodida. *Coxiella cheraxi* serait, ainsi, responsable de maladies chez les écrevisses, tandis que différentes *Coxiella*-LE seraient à l'origine de maladies chez les oiseaux (Cooper *et al.*, 2007; Shivaprasad *et al.*, 2008). Les informations sur ces *Coxiella* sont pour l'instant très limitées, mais préciser leur position phylogénétique et analyser leur génome pourraient permettre de mieux comprendre l'évolution du genre *Coxiella* et les transitions de leur mode de vie.

III. Dynamiques des interactions symbiotiques chez les arthropodes

L'étude de l'histoire évolutive du genre *Coxiella* montre que les interactions symbiotiques de ces bactéries sont très diverses et surtout très dynamiques. De nombreuses transitions dans le continuum mutualisme-parasitisme ainsi que des captures d'hôtes fréquentes semblent avoir façonné ce genre bactérien. Dans cette partie nous allons détailler les mécanismes qui pourraient être à l'origine de telles transitions évolutives. La fréquence et la rapidité de ces transitions sont un point important à prendre en compte dans l'évolution des interactions symbiotiques.

1) Transmission mixte

Bien que les bactéries endosymbiotiques utilisent principalement la transmission verticale, des études montrent que certaines sont aussi capables de se transmettre horizontalement (Vavre *et al.*, 1999; Russell *et al.*, 2003). Les transferts horizontaux sont connus chez les bactéries symbiotiques, mais leurs conséquences ont peut-être été sous-estimées. En effet, ces phénomènes ne sont généralement observés que par la reconstruction de phylogénies et ne semblaient être importants qu'à des échelles évolutives, en permettant sporadiquement la capture de nouveaux hôtes. En réalité, il semble que certains endosymbiotes d'arthropodes utilisent des modes de transmission mixte, couplant à la fois transmission verticale et horizontale. Dans le troisième chapitre de ce manuscrit, nous avons étudié différents symbiotes de tiques dans le cadre de co-infections et avons proposé que ce

mode de transmission pourrait être fréquent chez certains symbiotes de tiques.

Cette transmission mixte peut avoir un impact sur les stratégies des symbiotes. En effet, nous avons vu que la virulence et la transmission sont intimement liées. Plusieurs exemples récents montrent également comment certains symbiotes d'insectes phytophages pourraient être transférés horizontalement via la plante à des fréquences élevées (Frago *et al.*, 2012). Il est vrai que de nombreux virus utilisent ce mode de transmission (Roossinck, 2011), ainsi que des bactéries comme les *Rickettsia* endosymbiotiques de l'aleurode *Bemisia tabaci* (Caspi-Fluger *et al.*, 2012). Si ce mode de transmission permet aux symbiotes d'infecter des hôtes arthropodes non-infectés il peut à la fois modifier l'évaluation de l'interaction avec l'hôte arthropode en favorisant des symbiotes plus virulents, mais également sélectionner des symbiotes capables de se répliquer au sein de l'hôte intermédiaire (Frago *et al.*, 2012). L'infection de ces nouveaux hôtes peut conduire à de nouvelles interactions symbiotiques totalement différentes de celles mettant en jeu ces mêmes symbiotes avec des hôtes arthropodes. Par exemple, deux bactéries du genre *Arsenophonus* ont développé des stratégies parasitaires chez les plantes et sont responsables du « syndrome des basses richesses » et de la chlorose marginale du fraisier (Zreik *et al.*, 1998; Bressan *et al.*, 2011). Ces bactéries, "*Candidatus Arsenophonus phytopathogenicus*" et "*Candidatus Phlomobacter fragariae*", sont paraphylétiques, mais émergent toutes les deux dans des clades de symbiotes d'arthropodes (Salar *et al.*, 2009). Cela implique deux événements distincts ayant mené à l'émergence de la virulence envers des plantes dans ce genre bactérien. Ces deux bactéries restent toutefois principalement associées à des cicadelles, chez qui elles passent la majorité de leur cycle et sont capables de se transmettre verticalement (Sémétey *et al.*, 2007; Bressan *et al.*, 2009). Le taux de transmission vertical chez ces hôtes est toutefois relativement faible et la transmission via la plante permettrait d'expliquer les fortes prévalences chez les cicadelles observées dans la nature (Bressan *et al.*, 2009). En cas d'épidémies du « syndrome des basses richesses », la prévalence de *A. phytopathogenicus* peut ainsi augmenter de 10 à 80-95 % chez son hôte phytophage (Bressan *et al.*, 2011).

Des symbiotes d'arthropodes peuvent donc devenir des parasites de plantes ou d'autres organismes. Mais les transmissions mixtes peuvent aussi mener à l'apparition de stratégies mutualistes chez des parasites. Les bactéries du genre *Burkholderia* sont associées avec de nombreux hôtes comprenant des vertébrés, des arthropodes ainsi que des plantes (Coenye &

Vandamme, 2007). *Burkholderia gladioli* appartient ainsi à un clade de bactéries parasitant différentes espèces de plantes (Jeong *et al.*, 2003; Ura *et al.*, 2006). Si la majeure partie des souches de *B. gladioli* sont responsables de maladies chez les plantes, une souche de *B. gladioli* est pourtant intimement associée à une espèce de scarabée. Cette souche a développé des stratégies mutualistes chez ce nouvel hôte, en produisant des antibiotiques permettant d'assurer la protection des œufs pondus (Flórez *et al.*, 2017).

Ainsi, la transmission mixte pourrait permettre à certains symbiotes de mieux se transmettre, mais avec comme conséquence possible des capacités accrues de changements d'hôtes et des transitions rapides sur le continuum mutualisme-parasitisme (Fig.d.1).

2) Rôle des arthropodes

Les transmissions mixtes sont généralement retrouvées chez des symbiotes d'arthropodes parasitant d'autres organismes. Ce mode de vie facilite les échanges entre organismes. Or, d'après Combes (2001), la mise en place d'une association symbiotique entre deux organismes ne peut survenir que dans des conditions particulières. Dans son ouvrage, Combes utilise ainsi la métaphore des filtres de rencontre et de compatibilité. Pour infecter un organisme, un symbiote doit pouvoir franchir ces deux filtres. Le premier, nécessite d'entrer un contact avec cet hôte potentiel, tandis que le second, requiert les capacités nécessaires à la survie, la reproduction et la transmission au sein de cet organisme. Le mode de vie parasitaire de certains arthropodes permet l'ouverture du filtre de rencontre pour leurs symbiotes et favorise ainsi les transitions d'un hôte à l'autre (Fig.d.1)

De plus, ces arthropodes sont fréquemment infectés par de nombreux symbiotes différents. Ces co-infections peuvent faciliter les échanges de gènes entre les différents partenaires symbiotiques impliqués. Certains endosymbiotes, comme la bactérie *Rickettsia buchnerii*, possèdent par exemple de nombreux éléments mobiles dans leur génome (Gillespie *et al.*, 2012; Kurtti *et al.*, 2015). Parmi ceux-ci on retrouve des éléments mobiles appelés RAGE (pour "*Rickettsiales* Amplified Genetic Elements") insérés dans le génome et même dans les plasmides de cette bactérie. Ces éléments semblent faciliter les transferts géniques et auraient façonné le génome des bactéries du genre *Rickettsia* en ayant notamment favorisé l'acquisition de facteurs de virulence (Gillespie *et al.*, 2012).

Les échanges de gènes permettent ainsi à certaines bactéries d'acquérir de nouvelles

fonctions leur permettant de développer de nouvelles stratégies symbiotiques. Si l'acquisition de facteurs de virulence peut entraîner l'émergence d'interactions parasites, d'autres fonctions, au contraire, vont permettre l'émergence du mutualisme. Ainsi une souche de bactérie *Wolbachia pipientis*, connue pour être un parasite manipulateur de la reproduction, est devenue un symbiote obligatoire chez la punaise de lit, *Cimex lectularius*, suite à l'acquisition des voies de synthèse de la vitamine B (Hosokawa *et al.*, 2010).

Ces échanges de gènes entre symbiotes infectant la même espèce montrent que l'hypothèse « you are what you eat » expliquant les transferts de gènes chez les eucaryotes phagotrophiques (Doolittle, 1998) peut être étendue à « you are what you meet » dans le cas de co-infections chez les arthropodes (Gluck-Thaler & Slot, 2015). Toutefois, certains symbiotes ayant subi une importante réduction génomique et ayant notamment perdu les gènes impliqués dans la recombinaison pourraient ne plus être capables d'acquérir de nouvelles fonctions et seraient ainsi moins aptes à ces transitions.

Les arthropodes, et particulièrement les exoparasites, peuvent alors être considérés comme des carrefours évolutifs pour les micro-organismes les infectant.

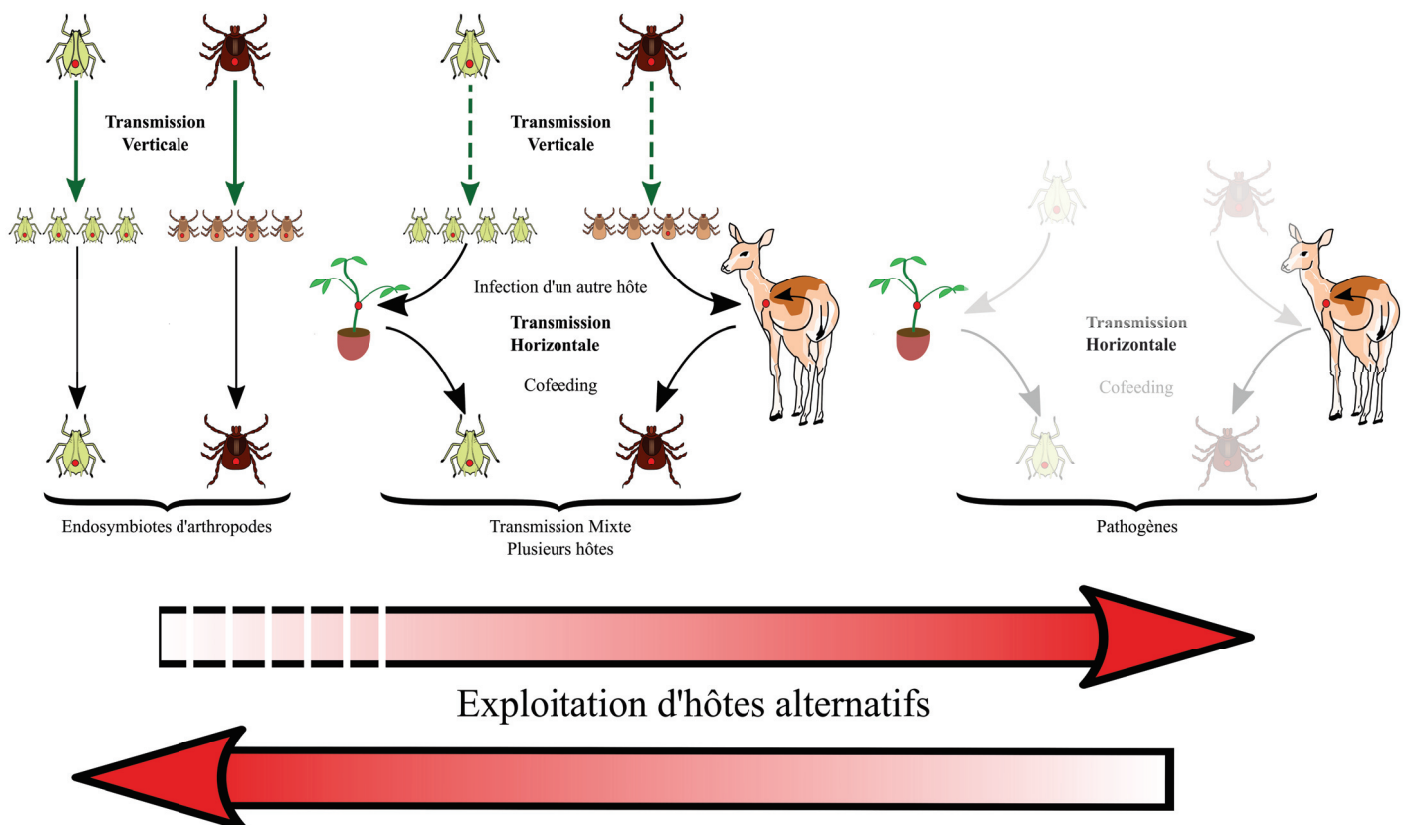


Fig.d.1| Impact des différents modes de transmission

Capacité d'un symbiote (pastille rouge) à infecter différents types d'hôte

La transmission mixte qui combine transmission verticale et horizontale permet ainsi l'exploitation de nombreux types d'hôtes. Deux sélections différentes s'appliqueront alors sur le symbiote pour améliorer sa transmission ce qui peut conduire à d'importants et brusques changements évolutifs

IV. Conclusion

Au terme de ce travail et au vu des résultats récents de la littérature, l'évolution des bactéries endosymbiotiques peut s'avérer complexe avec des transitions évolutives plus fréquentes qu'on ne l'imaginait. Cette dynamique rapide pourrait être notamment retrouvée chez les symbiotes infectant des arthropodes capables de parasiter d'autres organismes, le mode de vie de ces derniers facilitant les contacts interspécifiques. De plus, certains de ces symbiotes semblent pouvoir recourir à un mode de transmission mixte, couplant la transmission verticale avec de la transmission horizontale fréquente. Cette forme de transmission pourrait favoriser des changements rapides dans les interactions entre espèces. Dans un contexte où l'environnement change rapidement, les pressions de sélections qui agissent sur le symbiote pourraient également varier. En particulier des modifications de la structure des populations d'arthropodes ou de leurs hôtes (fragmentation, changement climatiques) pourraient modifier l'importance relative de la transmission verticale et de la transmission horizontale et conduire à des évolutions rapides des interactions.

L'étude des bactéries du genre *Coxiella* est un bon moyen de comprendre ces transitions évolutives. La comparaison des génomes des *Coxiella*-LE et *C. burnetii* devrait permettre d'identifier de nouveaux candidats impliqués dans la virulence. Car si la majorité des gènes spécifiques détectés chez *C. burnetii* n'ont pas de fonction assignées, ils n'en demeurent pas moins intéressants pour comprendre les mécanismes utilisés par cette bactérie pour infecter et survivre au sein des cellules qu'elle parasite.

Il est aussi nécessaire de comprendre comment les *Coxiella* ont pu capturer de nouveaux hôtes et comment elles cohabitent avec les nombreux symbiotes pouvant infecter les tiques. De nombreuses difficultés se dressent néanmoins car ces bactéries n'étant pas cultivables en milieu axénique et ne peuvent pas être modifiées génétiquement. L'élevage de leur hôte tique peut également s'avérer problématique, surtout en ce qui concerne les phases de gorgement. Toutefois les enjeux en terme de biologie évolutive sont importants pour mieux comprendre l'évolution des symbioses chez ces arthropodes.

D'un point de vue appliqué, les tiques sont également les principaux vecteurs d'agents pathogènes en Europe (Jongejan & Uilenberg, 2005). Par ailleurs, la manipulation ou

l'utilisation du compartiment symbiotique pour limiter les populations de vecteurs ou leur capacité vectorielle se développent (Hoffmann *et al.*, 2011; Iturbe-Ormaetxe *et al.*, 2011; Aliota *et al.*, 2016; Dutra *et al.*, 2016) et pourraient être appliquées aux tiques où des interactions entre symbiotes et pathogènes ont déjà été détectées (Burgdorfer *et al.*, 1981b; Macaluso *et al.*, 2002; Steiner *et al.*, 2008; Narasimhan *et al.*, 2014; Gall *et al.*, 2016; Bonnet *et al.*, 2017). Toutefois, atteindre cet objectif nécessite une bien meilleure connaissance des symbiotes de ces arthropodes et de leurs interactions avec les pathogènes.

Références bibliographiques:

- Ahantarig, A., Trinachartvanit, W., Baimai, V. & Grubhoffer, L. 2013. Hard ticks and their bacterial endosymbionts (or would be pathogens).
- Akman, L., Yamashita, A., Watanabe, H., Oshima, K., Shiba, T., Hattori, M., *et al.* 2002. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat. Genet.* **32**: 402–407.
- Aksoy, S. 1995. *Wigglesworthia* gen. nov. and *Wigglesworthia glossinidia* sp. nov., Taxa Consisting of the Mycetocyte-Associated, Primary Endosymbionts of Tsetse Flies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **45**: 848–851.
- Aliota, M.T., Walker, E.C., Uribe Yepes, A., Dario Velez, I., Christensen, B.M. & Osorio, J.E. 2016. The wMel Strain of *Wolbachia* Reduces Transmission of *Chikungunya* Virus in *Aedes aegypti*. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **10**: e0004677. Nature Publishing Group.
- Allen, J.M., Reed, D.L., Perotti, M.A. & Braig, H.R. 2007. Evolutionary relationships of “*Candidatus riesia* spp.,” endosymbiotic Enterobacteriaceae living within hematophagous primate lice. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 1659–1664. American Society for Microbiology.
- Andreotti, R., Pérez de León, A.A., Dowd, S.E., Guerrero, F.D., Bendele, K.G. & Scoles, G.A. 2011. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing. *BMC Microbiol.* **11**: 6.
- Bailly-Bechet, M., Martins-Simões, P., Szöllösi, G.J., Mialdea, G., Sagot, M.-F. & Charlat, S. 2017. How Long Does *Wolbachia* Remain on Board? *Mol. Biol. Evol.* **34**: 1183–1193.
- Balashov, Y.S. 1972. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) — vectors of diseases of man and animals. *Misc. Publ. Entomol. Soc. Am.* **8**: 161–376.
- Balashov, Y.S. & Grigoryeva, L.A. 2003. Cytological changes in the midgut of tick females of the genus *Ixodes* during and after feeding. *Dokl. Biol. Sci.* **393**: 527–30.
- Baldo, L., Dunning Hotopp, J.C., Jolley, K.A., Bordenstein, S.R., Biber, S.A., Choudhury, R.R., *et al.* 2006. Multilocus Sequence Typing System for the Endosymbiont *Wolbachia pipientis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**: 7098–7110.
- Bary, A. de. 1879. *Die Erscheinung der Symbiose*. Verlag von Karl J. Trübner.
- Baumann, L. & Baumann, P. 2005. Cospeciation Between the Primary Endosymbionts of Mealybugs and Their Hosts. *Curr. Microbiol.* **50**: 84–87.
- Baumann, P., Munson, M.A., Lai, C.-Y., Clark, M.A., Baumann, L., Moran, N.A., *et al.* 1993. Origin and properties of bacterial endosymbionts of aphids, whiteflies, and mealybugs. For aphids, the endosymbiont has many properties of free-living eubacteria. *ASM Am.*

- Soc. Microbiol. News* **59**: 21–24.
- Benson, M.J., Gawronski, J.D., Eveleigh, D.E. & Benson, D.R. 2004. Intracellular Symbionts and Other Bacteria Associated with Deer Ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**: 616–620.
- Bergstrom, C.T. & Pritchard, J. 1998. Germline bottlenecks and the evolutionary maintenance of mitochondrial genomes. *Genetics* **149**: 2135–46.
- Bonnet, S.I., Binetruy, F., Hernández-Jarguín, A.M. & Duron, O. 2017. The Tick Microbiome: Why Non-pathogenic Microorganisms Matter in Tick Biology and Pathogen Transmission. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**: 1–14.
- Bouchon, D., Cordaux, R. & Grève, P. 2008. Feminizing *Wolbachia* and the evolution of sex determination in isopods. In: *Insect Symbiosis, Volume 3*, pp. 273–294. Taylor and Francis Group LLC Boca Raton, FL.
- Breeuwer, J.A. & Werren, J.H. 1993. Cytoplasmic incompatibility and bacterial density in *Nasonia vitripennis*. *Genetics* **135**: 565–74.
- Breeuwer, J.A.J. & Werren, J.H. 1990. Microorganisms associated with chromosome destruction and reproductive isolation between two insect species. *Nature* **346**: 558–560. Nature Publishing Group.
- Bressan, A., Moral García, F.J. & Boudon-Padieu, E. 2011. The Prevalence of “Candidatus *Arsenophonus* phytopathogenicus” Infecting the Planthopper *Pentastiridius leporinus* (Hemiptera: Cixiidae) Increase Nonlinearly With the Population Abundance in Sugar Beet Fields. *Environ. Entomol.* **40**: 1345–1352.
- Bressan, A., Sémétey, O., Arneodo, J., Lherminier, J. & Boudon-Padieu, E. 2009. Vector transmission of a plant-pathogenic bacterium in the *Arsenophonus* clade sharing ecological traits with facultative insect endosymbionts. *Phytopathology* **99**: 1289–96.
- Brownlie, J.C. & Johnson, K.N. 2009. Symbiont-mediated protection in insect hosts. *Trends Microbiol.* **17**: 348–354.
- Buchner, P. 1965. Symbiosis in animals which suck plant juices. *Endosymbiosis Anim. with plant Microorg. (New York Interscience)* 210 – 432. Interscience New York, NY.
- Burgdorfer, W., Barbour, A.G., Hayes, S.F., Benach, J.L. & Davis, E.G. and J.P. 1982. Lyme Disease--A Tick-Borne Spirochetosis? *Science (80-.)*. **216**: 1317–1319.
- Burgdorfer, W., Brinton, L.P. & Hughes, L.E. 1973. Isolation and characterization of symbiotes from the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. *J. Invertebr. Pathol.* **22**: 424–434.
- Burgdorfer, W., Hayes, E.B., Thomas, L.A. & Lancaster, J.L. 1981a. A new spotted fever group rickettsia from the lone star tick, *Amblyomma americanum*. New York: Academic

- Press, 1981.
- Burgdorfer, W., Hayes, S.F. & Mavros, A.J. 1981b. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: *Rickettsiae and rickettsial diseases*, pp. 585–594.
- Camicas, J.-L., Hervy, J.P., Adam, F. & Morel, P.C. 1998. *The ticks of the world (Acarida, Ixodida): nomenclature, described stages, hosts, distribution*. Éditions de l'ORSTOM.
- Carpi, G., Cagnacci, F., Wittekindt, N.E., Zhao, F., Qi, J., Tomsho, L.P., *et al.* 2011. Metagenomic profile of the bacterial communities associated with *Ixodes ricinus* ticks. *PLoS One* **6**: e25604.
- Caspi-Fluger, A., Inbar, M., Mozes-Daube, N., Katzir, N., Portnoy, V., Belausov, E., *et al.* 2012. Horizontal transmission of the insect symbiont *Rickettsia* is plant-mediated. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **279**: 1791–1796.
- Chao, L., Hanley, K.A., Burch, C.L., Dahlberg, C. & Turner, P.E. 2000. Kin Selection and Parasite Evolution: Higher and Lower Virulence with Hard and Soft Selection. *Q. Rev. Biol.* **75**: 261–275.
- Chen, D.-Q., Campbell, B.C. & Purcell, A.H. 1996. A New *Rickettsia* from a Herbivorous Insect, the Pea Aphid *Acyrtosiphon pisum* (Harris). *Curr. Microbiol.* **33**: 123–128.
- Chen, D.-Q. & Purcell, A.H. 1997. Occurrence and Transmission of Facultative Endosymbionts in Aphids. *Curr. Microbiol.* **34**: 220–225.
- Chen, X., Li, S. & Aksoy, S. 1999. Concordant evolution of a symbiont with its host insect species: Molecular phylogeny of genus *Glossina* and its bacteriome-associated endosymbiont, *Wigglesworthia glossinidia*. *J. Mol. Evol.* **48**: 49–58.
- Clark, M.A., Moran, N.A., Baumann, P. & Wernegreen, J.J. 2000. Cospeciation between bacterial endosymbiont (*Buchnera*) and a recent radiation of aphids (*Uroleucon*) ad pitfalls of testing for phylogenetic congruence. *Evolution (N. Y.)*. **54**: 517–525.
- Clay, K., Klyachko, O., Grindle, N., Civitello, D., Oleske, D. & Fuqua, C. 2008. Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Mol. Ecol.* **17**: 4371–4381.
- Coenye, T. & Vandamme, P. 2007. *Burkholderia: Molecular Microbiology and Genomics*. Horizon Scientific Press.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Cockrell, D.C., Voth, D.E., Howe, D., Mead, D.J., *et al.* 2007. Proteome and Antigen Profiling of *Coxiella burnetii* Developmental Forms. *Infect. Immun.* **75**: 290–298.
- Coleman, S.A., Fischer, E.R., Howe, D., Mead, D.J. & Heinzen, R. a. 2004. Temporal Analysis of *Coxiella burnetii* Morphological Differentiation. *J. Bacteriol.* **186**: 7344–

7352.

- Combes, C. 2001. *Parasitism The Ecology and Evolution of Intimate Interactions*, Chicago Un.
- Cooper, A., Layton, R., Owens, L., Ketheesan, N. & Govan, B. 2007. Evidence for the classification of a crayfish pathogen as a member of the genus *Coxiella*. *Lett. Appl. Microbiol.* **45**: 558–563.
- Cordaux, R., Bouchon, D. & Grève, P. 2011. The impact of endosymbionts on the evolution of host sex-determination mechanisms. *Trends Genet.* **27**: 332–341.
- Cordaux, R. & Gilbert, C. 2017. Evolutionary Significance of *Wolbachia*-to-Animal Horizontal Gene Transfer: Female Sex Determination and the f Element in the Isopod *Armadillidium vulgare*. *Genes (Basel)*. **8**: 186.
- Costa, H.S., Toscano, N.C. & Henneberry, T.J. 1996. Mycetocyte Inclusion in the Oocytes of *Bemisia argentifolii* (Homoptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **89**: 694–699.
- Cowdry, E. V. 1925. A group of microorganisms transmitted hereditarily in ticks and apparently unassociated with disease. *J. Exp. Med.* **41**: 817–830.
- Dantas-Torres, F., Chomel, B.B. & Otranto, D. 2012. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends Parasitol.* **28**: 437–446. Elsevier Ltd.
- Darby, A. 2001. An aphid-borne bacterium allied to the secondary symbionts of whitefly. *FEMS Microbiol. Ecol.* **36**: 43–50.
- Darby, a C., Chandler, S.M., Welburn, S.C. & Douglas, a E. 2005. Aphid-Symbiotic Bacteria Cultured in Insect Cell Lines. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 4833–4839.
- Davis, G.E. & Cox, H.R. 1938. A filter-passing infectious agent isolated from ticks. *Public Health Rep.* **53**: 2259–2282.
- Dedeine, F., Boulétreau, M. & Vavre, F. 2005. *Wolbachia* requirement for oogenesis: occurrence within the genus *Asobara* (Hymenoptera, Braconidae) and evidence for intraspecific variation in *A. tabida*. *Heredity (Edinb)*. **95**: 394–400.
- Dedeine, F., Vavre, F., Fleury, F., Loppin, B., Hochberg, M.E. & Bouletreau, M. 2001. Removing symbiotic *Wolbachia* bacteria specifically inhibits oogenesis in a parasitic wasp. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**: 6247–6252.
- Doolittle, W.F. 1998. You are what you eat: A gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes.
- Douglas, A.E. 1998. Nutritional Interactions in Insect-Microbial Symbioses: Aphids and Their Symbiotic Bacteria Buchnera. *Annu. Rev. Entomol.* **43**: 17–37.
- Duron, O., Binetruy, F., Noël, V., Cremaschi, J., McCoy, K.D., Arnathau, C., *et al.* 2017.

- Evolutionary changes in symbiont community structure in ticks. *Mol. Ecol.* **26**: 2905–2921.
- Duron, O., Bouchon, D., Boutin, S., Bellamy, L., Zhou, L., Engelstadter, J., *et al.* 2008. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol.* **6**: 27.
- Duron, O., Noël, V., McCoy, K.D., Bonazzi, M., Sidi-Boumedine, K., Morel, O., *et al.* 2015a. The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. *PLOS Pathog.* **11**: e1004892.
- Duron, O., Sidi-Boumedine, K., Rousset, E., Moutailler, S. & Jourdain, E. 2015b. The Importance of Ticks in Q Fever Transmission: What Has (and Has Not) Been Demonstrated?
- Dutra, H.L.C., Rocha, M.N., Dias, F.B.S., Mansur, S.B., Caragata, E.P. & Moreira, L.A. 2016. *Wolbachia* Blocks Currently Circulating Zika Virus Isolates in Brazilian *Aedes aegypti* Mosquitoes. *Cell Host Microbe* **19**: 771–774. The Authors.
- Engelstädter, J. & Hurst, G.D.D. 2009. The Ecology and Evolution of Microbes that Manipulate Host Reproduction. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **40**: 127–149.
- Estrada-Peña, A. 2004. *Ticks of domestic animals in the Mediterranean region : a guide to identification of species.*
- Ewald, P.W. 1987. Transmission Modes and Evolution of the Parasitism-Mutualism Continuum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **503**: 295–306.
- Ferrari, J. & Vavre, F. 2011. Bacterial symbionts in insects or the story of communities affecting communities. *Philos. Trans. R. Soc. B-Biological Sci.* **366**: 1389–1400.
- Ferrari, J., West, J. a, Via, S. & Godfray, H.C.J. 2012. Population genetic structure and secondary symbionts in host-associated populations of the pea aphid complex. *Evolution* **66**: 375–90.
- Fialho, R.F. & Stevens, L. 2000. Male-killing *Wolbachia* in a flour beetle. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **267**: 1469–1473.
- Flórez, L. V., Scherlach, K., Gaube, P., Ross, C., Sitte, E., Hermes, C., *et al.* 2017. Antibiotic-producing symbionts dynamically transition between plant pathogenicity and insect-defensive mutualism. *Nat. Commun.* **8**: 15172.
- Frago, E., Dicke, M. & Godfray, H.C.J. 2012. Insect symbionts as hidden players in insect-plant interactions. *Trends Ecol. Evol.* **27**: 705–711. Elsevier Ltd.
- Frank, A.B. 1877. Über die biologischen Verhältnisse des Thallus einiger Krustflechten. *Cohn Beitr Biol Pflanz* **2**: 123–200. Cohn Beitr Biol.

- Frank, S. a. 1996. Host-Symbiont Conflict over the Mixing of Symbiotic Lineages. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **263**: 339–344.
- Fukatsu, T., Tsuchida, T., Nikoh, N., Fukatsu, T., Tsuchida, T. & Nikoh, N. 2001. *Spiroplasma* Symbiont of the Pea Aphid , *Acyrtosiphon pisum* (Insecta : Homoptera) *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1284–1291.
- Fytrou, A., Schofield, P.G., Kraaijeveld, A.R. & Hubbard, S.F. 2006. *Wolbachia* infection suppresses both host defence and parasitoid counter-defence. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **273**: 791–796.
- Gall, C.A., Reif, K.E., Scoles, G.A., Mason, K.L., Mousel, M., Noh, S.M., *et al.* 2016. The bacterial microbiome of *Dermacentor andersoni* ticks influences pathogen susceptibility. *ISME J.* **10**: 1846–1855. Nature Publishing Group.
- Gerhart, J.G., Moses, A.S. & Raghavan, R. 2016. A *Francisella*-like endosymbiont in the Gulf Coast tick evolved from a mammalian pathogen. *Sci. Rep.* **6**: 33670. Nature Publishing Group.
- Gil, R., Silva, F.J., Zientz, E., Delmotte, F., Gonzalez-Candelas, F., Latorre, A., *et al.* 2003. The genome sequence of *Blochmannia floridanus*: Comparative analysis of reduced genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 9388–9393.
- Gillespie, J.J., Joardar, V., Williams, K.P., Driscoll, T., Hostetler, J.B., Nordberg, E., *et al.* 2012. A *Rickettsia* genome overrun by mobile genetic elements provides insight into the acquisition of genes characteristic of an obligate intracellular lifestyle. *J. Bacteriol.* **194**: 376–394.
- Gluck-Thaler, E. & Slot, J.C. 2015. Dimensions of Horizontal Gene Transfer in Eukaryotic Microbial Pathogens.
- Goodman, J.L., Dennis, D.T. & Sonenshine, D.E. 2005. *Tick-borne diseases of humans*. ASM press.
- Gottlieb, Y., Lalzar, I. & Klasson, L. 2015. Distinctive genome reduction rates revealed by genomic analyses of two *Coxiella*-like endosymbionts in ticks. *Genome Biol. Evol.* **7**: 1779–1796.
- Gray, M.W. & Doolittle, W.F. 1982. Has the endosymbiont hypothesis been proven? *Microbiol. Rev.* **46**: 1–42. American Society for Microbiology (ASM).
- Guay, J.-F., Boudreault, S., Michaud, D. & Cloutier, C. 2009. Impact of environmental stress on aphid clonal resistance to parasitoids: Role of *Hamiltonella defensa* bacterial symbiosis in association with a new facultative symbiont of the pea aphid. *J. Insect Physiol.* **55**: 919–926.
- Guo, J., Hatt, S., He, K., Chen, J., Francis, F. & Wang, Z. 2017. Nine facultative

- endosymbionts in aphids. A review. *J. Asia. Pac. Entomol.* **20**: 794–801. Elsevier B.V. on behalf of Korean Society of Applied Entomology, Taiwan Entomological Society and Malaysian Plant Protection Society.
- Haine, E.R. 2008. Symbiont-mediated protection. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **275**: 353–361.
- Haller, G. 1881. Vorläufige Bemerkungen über das Gehörorgan der Ixodiden. *Zool. Anz* **4**: 165–167.
- Hardin, G. 1968. The tragedy of the commons. *Science* **162**: 1243–8.
- Hiroki, M., Tagami, Y., Miura, K. & Kato, Y. 2004. Multiple infection with *Wolbachia* inducing different reproductive manipulations in the butterfly *Eurema hecabe*. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **271**: 1751–1755.
- Hoffmann, A.A., Montgomery, B.L., Popovici, J., Iturbe-Ormaetxe, I., Johnson, P.H., Muzzi, F., *et al.* 2011. Successful establishment of *Wolbachia* in *Aedes* populations to suppress dengue transmission. *Nature* **476**: 454–457. Nature Publishing Group.
- Hornok, S., Meli, M.L., Perreten, A., Farkas, R., Willi, B., Beugnet, F., *et al.* 2010. Molecular investigation of hard ticks (Acari: Ixodidae) and fleas (Siphonaptera: Pulicidae) as potential vectors of rickettsial and mycoplasmal agents. *Vet. Microbiol.* **140**: 98–104.
- Hosokawa, T., Koga, R., Kikuchi, Y., Meng, X.-Y.X.-Y. & Fukatsu, T. 2010. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **107**: 769–774.
- Husnik, F., Nikoh, N., Koga, R., Ross, L., Duncan, R.P., Fujie, M., *et al.* 2013. Horizontal Gene Transfer from Diverse Bacteria to an Insect Genome Enables a Tripartite Nested Mealybug Symbiosis. *Cell* **153**: 1567–1578. Elsevier.
- Ioannidis, P., Lu, Y., Kumar, N., Creasy, T., Daugherty, S., Chibucos, M.C., *et al.* 2014. Rapid transcriptome sequencing of an invasive pest, the brown marmorated stink bug *Halyomorpha halys*. *BMC Genomics* **15**: 738.
- Iturbe-Ormaetxe, I., Walker, T. & O' Neill, S.L. 2011. *Wolbachia* and the biological control of mosquito-borne disease. *EMBO Rep.* **12**: 508–518. Nature Publishing Group.
- Jasinskas, A., Zhong, J. & Barbour, A.G. 2007. Highly prevalent *Coxiella* sp. bacterium in the tick vector *Amblyomma americanum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 334–336.
- Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T. & Hwang, I. 2003. Causing Rice Grain Rot Is Responsible for Inducing Bacterial Wilt in Many Field Crops. *Plant Dis.* **87**: 890–895. Am Phytopath Society.
- Jones, L.D., Davies, C.R., Steele, G.M. & Nuttall, P.A. 1987. A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host. *Science* **237**: 775–777.
- Jongejan, F. & Uilenbenberg, G. 2005. The global importance of ticks.

- Juchault, P., Rigaud, T. & Mocquard, J.P. 1993. Evolution of sex determination and sex ratio variability in wild populations of *Armadillidium vulgare* (Latr.)(Crustacea, Isopoda): a case study in conflict resolution. *Acta Oecologica* **14**: 547–562. Elsevier.
- Kampschreur, L.M., Delsing, C.E., Groenwold, R.H.H., Wegdam-Blans, M.C.A., Bleeker-Rovers, C.P., de Jager-Leclercq, M.G.L., *et al.* 2014. Chronic Q Fever in the Netherlands 5 Years after the Start of the Q Fever Epidemic: Results from the Dutch Chronic Q Fever Database. *J. Clin. Microbiol.* **52**: 1637–1643.
- Klasson, L., Kumar, N., Bromley, R., Sieber, K., Flowers, M., Ott, S.H., *et al.* 2014. Extensive duplication of the *Wolbachia* DNA in chromosome four of *Drosophila ananassae*. *BMC Genomics* **15**: 1097.
- Klyachko, O., Stein, B.D., Grindler, N., Clay, K. & Fuqua, C. 2007. Localization and visualization of a *Coxiella*-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**: 6584–6594.
- Koga, R., Meng, X.-Y., Tsuchida, T. & Fukatsu, T. 2012. Cellular mechanism for selective vertical transmission of an obligate insect symbiont at the bacteriocyte-embryo interface. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**: E1230–E1237.
- Kremer, N., Voronin, D., Charif, D., Mavingui, P., Mollereau, B. & Vavre, F. 2009. *Wolbachia* interferes with ferritin expression and iron metabolism in insects. *PLoS Pathog.* **5**: e1000630.
- Kurti, T.J., Felsheim, R.F., Burkhardt, N.Y., Oliver, J.D., Heu, C.C. & Munderloh, U.G. 2015. *Rickettsia buchneri* sp. Nov., a rickettsial endosymbiont of the blacklegged tick *Ixodes scapularis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **65**: 965–970.
- Lalzar, I., Friedmann, Y. & Gottlieb, Y. 2014. Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environ. Microbiol.* **16**: 3657–3668.
- Lalzar, I., Harrus, S., Mumcuoglu, K.Y. & Gottlieb, Y. 2012. Composition and Seasonal Variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* Bacterial Communities. *Appl. Environ. Microbiol.* **78**: 4110–4116.
- Lamelas, A., Gosalbes, M.J., Manzano-Marín, A., Peretó, J., Moya, A. & Latorre, A. 2011. *Serratia symbiotica* from the aphid *Cinara cedri*: A missing link from facultative to obligate insect endosymbiont. *PLoS Genet.* **7**: e1002357.
- Leclercq, S., Thézé, J., Chebbi, M.A., Giraud, I., Moumen, B., Ernenwein, L., *et al.* 2016. Birth of a W sex chromosome by horizontal transfer of *Wolbachia* bacterial symbiont genome. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**: 15036–15041.
- Leclerque, A. & Kleespies, R.G. 2012. A Rickettsiella Bacterium from the Hard Tick, *Ixodes woodi*: Molecular Taxonomy Combining Multilocus Sequence Typing (MLST) with

- Significance Testing. *PLoS One* 7: e38062.
- Lin, D. & Koskella, B. 2015. Friend and foe: factors influencing the movement of the bacterium *Helicobacter pylori* along the parasitism-mutualism continuum. *Evol. Appl.* **8**: 9–22.
- Liu, L., Li, L., Liu, J., Hu, Y., Liu, Z., Guo, L., *et al.* 2013. Coinfection of *Dermacentor Silvarum olenov* (Acari: Ixodidae) by *Coxiella*-like, *Arsenophonus*-like, and *Rickettsia*-like symbionts. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**: 2450–2454.
- Lo, N., Bandi, C., Watanabe, H., Nalepa, C. & Beninati, T. 2003. Evidence for cocladogenesis between diverse dictyopteran lineages and their intracellular endosymbionts. *Mol. Biol. Evol.* **20**: 907–913.
- Login, F.H., Balmand, S., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Vigneron, A., Weiss-Gayet, M., *et al.* 2011. Antimicrobial Peptides Keep Insect Endosymbionts Under Control. *Science* (80-.). **334**: 362–365.
- Lopez-Madrugal, S., Latorre, A., Porcar, M., Moya, A. & Gil, R. 2011. Complete Genome Sequence of “Candidatus Tremblaya princeps” Strain PCVAL, an Intriguing Translational Machine below the Living-Cell Status. *J. Bacteriol.* **193**: 5587–5588.
- Macaluso, K.R., Sonenshine, D.E., Ceraul, S.M. & Azad, A.F. 2002. Rickettsial Infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Inhibits Transovarial Transmission of a Second *Rickettsia*. *J. Med. Entomol.* **39**: 809–813.
- Machado-Ferreira, E., Dietrich, G., Hojgaard, A., Levin, M., Piesman, J., Zeidner, N.S., *et al.* 2011. *Coxiella* Symbionts in the Cayenne Tick *Amblyomma cajennense*. *Microb. Ecol.* **62**: 134–142.
- Madariaga, M.G., Rezai, K., Trenholme, G.M. & Weinstein, R.A. 2003. Q fever: A biological weapon in your backyard.
- Manzano-Marín, A., Ocegüera-Figueroa, A., Latorre, A., Jiménez-García, L.F. & Moya, A. 2015. Solving a Bloody Mess: B-Vitamin Independent Metabolic Convergence among Gammaproteobacterial Obligate Endosymbionts from Blood-Feeding Arthropods and the Leech *Haementeria officinalis*. *Genome Biol. Evol.* **7**: 2871–2884.
- Margulis, L. 1970. Origin of Eukaryotic cells : evidence and research implications for a theory of the origin and evolution of microbial, plant, and animal cells on the precambrian earth | Clc. Yale University Press.
- Margulis, L. 1993. Origins of species: acquired genomes and individuality. *BioSystems* **31**: 121–125.
- Maurin, M. & Raoult, D. 1999. Q fever. *Clin. Microbiol. Rev.* **12**: 518–553.
- McCutcheon, J.P. & Moran, N. a. 2011. Extreme genome reduction in symbiotic bacteria.

- Nat. Rev. Microbiol.* **10**: 13–26. Nature Publishing Group.
- Mediannikov, O., Ivanov, L., Nishikawa, M., Saito, R., Sidelnikov, Y.N., Zdanovskaya, N.I., *et al.* 2003. Molecular Evidence of *Coxiella*-like Microorganism Harbored by *Haemaphysalis concinnae* Ticks in the Russian Far East. *Ann. N.Y. Acad. Sci* **990**: 226–228.
- Mediannikov, O., Matsumoto, K., Samoylenko, I., Drancourt, M., Roux, V., Rydkina, E., *et al.* 2008. *Rickettsia raoultii* sp. nov., a spotted fever group rickettsia associated with *Dermacentor* ticks in Europe and Russia. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **58**: 1635–1639.
- Mixson, T.R., Campbell, S.R., Gill, J.S., Ginsberg, H.S., Reichard, M. V, Schulze, T.L., *et al.* 2006. Prevalence of *Ehrlichia*, *Borrelia*, and Rickettsial agents in *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) collected from nine states. *J. Med. Entomol.* **43**: 1261–1268.
- Monnin, D. 2016. Évolution de la dépendance et homéostasie oxydative dans les symbioses insecte/*Wolbachia*. Université de Lyon.
- Montenegro, H., Petherwick, A.S., Hurst, G.D.D. & Klaczko, L.B. 2006. Fitness effects of *Wolbachia* and *Spiroplasma* in *Drosophila melanogaster*. *Genetica* **127**: 207–215. Springer.
- Montllor, C.B., Maxmen, A. & Purcell, A.H. 2002. Facultative bacterial endosymbionts benefit pea aphids *Acyrtosiphon pisum* under heat stress. *Ecol. Entomol.* **27**: 189–195.
- Moran, N.A. & Jarvik, T. 2010. Lateral Transfer of Genes from Fungi Underlies Carotenoid Production in Aphids. *Science (80-.)*. **328**: 624–627.
- Moran, N.A., McCutcheon, J.P. & Nakabachi, A. 2008. Genomics and Evolution of Heritable Bacterial Symbionts. *Annu. Rev. Genet.* **42**: 165–190.
- Moran, N.A., Tran, P. & Gerardo, N.M. 2005a. Symbiosis and insect diversification: An ancient symbiont of sap-feeding insects from the bacterial phylum Bacteroidetes. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 8802–8810.
- Moran, N. a, Russell, J. a, Koga, R. & Fukatsu, T. 2005b. Evolutionary Relationships of Three New Species of Enterobacteriaceae Living as Symbionts of Aphids and Other Insects. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**: 3302–3310.
- Moran, N. & Baumann, P. 1994. Phylogenetics of cytoplasmically inherited microorganisms of arthropods.
- Mouton, L., Dedeine, F., Henri, H., Boulétreau, M., Profizi, N. & Vavre, F. 2004. Virulence, multiple infections and regulation of symbiotic population in the *Wolbachia-Asobara tabida* symbiosis. *Genetics* **168**: 181–189.
- Mouton, L., Henri, H., Bouletreau, M. & Vavre, F. 2003. Strain-specific regulation of

- intracellular *Wolbachia* density in multiply infected insects. *Mol. Ecol.* **12**: 3459–3465.
- Mudrow, E. 1932. Über die intrazellulären Symbionten der Zecken. *Zeitschrift für Parasitenkd.* **5**: 138–183.
- Munson, M.A., Baumann, P., Clark, M.A., Baumann, L., Moran, N.A., Voegtlin, D.J., *et al.* 1991. Evidence for the establishment of aphid-eubacterium endosymbiosis in an ancestor of four aphid families. *J. Bacteriol.* **173**: 6321–6324.
- Nakabachi, A., Yamashita, A., Toh, H., Ishikawa, H., Dunbar, H.E., Moran, N.A., *et al.* 2006. The 160-kilobase genome of the bacterial endosymbiont *Carsonella*. *Science (80-)*. **314**: 267.
- Narasimhan, S. & Fikrig, E. 2015. Tick microbiome: the force within. *Trends Parasitol.* **31**: 315–323.
- Narasimhan, S., Rajeevan, N., Liu, L., Zhao, Y.O., Heisig, J., Pan, J., *et al.* 2014. Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete. *Cell Host Microbe* **15**: 58–71.
- Nikoh, N., Hosokawa, T., Moriyama, M., Oshima, K., Hattori, M. & Fukatsu, T. 2014. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **111**: 10257–10262.
- Nikoh, N. & Nakabachi, A. 2009. Aphids acquired symbiotic genes via lateral gene transfer. *BMC Biol.* **7**: 12.
- Nilsson, A.I., Koskiniemi, S., Eriksson, S., Kugelberg, E., Hinton, J.C.D. & Andersson, D.I. 2005. Bacterial genome size reduction by experimental evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**: 12112–12116.
- Noda, H., Munderloh, U.G. & Kurtti, T.J. 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3926–32. American Society for Microbiology.
- Nogge, G. 1981. Significance of symbionts for the maintenance of an optimal nutritional state for successful reproduction in haematophagous arthropods. *Parasitology* **82**: 101–104.
- Nogge, G. 1976. Sterility in tsetse flies (*Glossina morsitans* Westwood) caused by loss of symbionts. *Experientia* **32**: 995–996.
- O’Neill, S.L., Giordano, R., Colbert, A.M., Karr, T.L. & Robertson, H.M. 1992. 16S rRNA phylogenetic analysis of the bacterial endosymbionts associated with cytoplasmic incompatibility in insects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**: 2699–702.
- Oliver, K.M., Campos, J., Moran, N. a & Hunter, M.S. 2008. Population dynamics of defensive symbionts in aphids. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **275**: 293–299.

- Oliver, K.M., Moran, N.A. & Hunter, M.S. 2006. Costs and benefits of a superinfection of facultative symbionts in aphids. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **273**: 1273–1280.
- Oliver, K.M., Russell, J.A., Moran, N.A. & Hunter, M.S. 2003. Facultative bacterial symbionts in aphids confer resistance to parasitic wasps. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 1803–1807.
- Ortuño, A., Pons, I., Quesada, M., Lario, S., Anton, E., Gil, A., *et al.* 2012. Evaluation of the Presence of *Rickettsia slovaca* Infection in Domestic Ruminants in Catalonia, Northeastern Spain. *Vector-Borne Zoonotic Dis.* **12**: 1019–1022.
- Pannebakker, B.A., Pijnacker, L.P., Zwaan, B.J. & Beukeboom, L.W. 2004. Cytology of *Wolbachia*-induced parthenogenesis in *Leptopilina clavipes* (Hymenoptera: Figitidae). *Genome* **47**: 299–303.
- Parola, P., Paddock, C.D., Socolovschi, C., Labruna, M.B., Mediannikov, O., Kernif, T., *et al.* 2013. Update on tick-borne rickettsioses around the world: A geographic approach. *Clin. Microbiol. Rev.* **26**: 657–702.
- Qiu, Y., Nakao, R., Ohnuma, A., Kawamori, F. & Sugimoto, C. 2014. Microbial population analysis of the salivary glands of ticks; a possible strategy for the surveillance of bacterial pathogens. *PLoS One* **9**: 1–11.
- Randolph, S.E., Gern, L. & Nuttall, P.A. 1996. Co-feeding ticks: Epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. *Parasitol. Today* **12**: 472–479.
- Read, A.F. 2001. The Ecology of Genetically Diverse Infections. *Science (80-.)*. **292**: 1099–1102.
- Regnery, R.L. & Mcdade, J.E. 1990. *Coxiella burnetii* Q Fever a potential microbial contaminant of the environment. In: *ASTM Special Technical Publication*, pp. 115–133. ASTM International.
- Richter, D., Matuschka, F.-R., Spielman, A. & Mahadevan, L. 2013. How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **280**: 20131758–20131758.
- Rigaud, T. & Juchault, P. 1993. Conflict between feminizing sex ratio distorters and an autosomal masculinizing gene in the terrestrial isopod *Armadillidium vulgare* Latr. *Genetics* **133**: 247–252.
- Rio, R.V.M., Attardo, G.M. & Weiss, B.L. 2016. Grandeur Alliances: Symbiont Metabolic Integration and Obligate Arthropod Hematophagy. *Trends Parasitol.* **32**: 739–749. Elsevier Ltd.
- Rispe, C. & Moran, N.A. 2000. Accumulation of Deleterious Mutations in Endosymbionts: Muller's Ratchet with Two Levels of Selection. *Am. Nat.* **156**: 425–441.

- Rollat-Farnier, P.-A., Santos-Garcia, D., Rao, Q., Sagot, M.-F., Silva, F.J., Henri, H., *et al.* 2015. Two Host Clades, Two Bacterial Arsenals: Evolution through Gene Losses in Facultative Endosymbionts. *Genome Biol. Evol.* **7**: 839–855.
- Roossinck, M.J. 2011. The big unknown: plant virus biodiversity. *Curr. Opin. Virol.* **1**: 63–67. Elsevier B.V.
- Ros, V.I. & Hurst, G.D. 2009. Lateral gene transfer between prokaryotes and multicellular eukaryotes: ongoing and significant? *BMC Biol.* **7**: 20.
- Rousset, F., Bouchon, D., Pintureau, B., Juchault, P. & Solignac, M. 1992. *Wolbachia* Endosymbionts Responsible for Various Alterations of Sexuality in Arthropods. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **250**: 91–98.
- Roux, V., Bergoin, M., Lamaze, N. & Raoult, D. 1997. Reassessment of the Taxonomic Position of *Rickettsiella grylli*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **47**: 1255–1257.
- Russell, J.A., Latorre, A., Sabater-Muñoz, B., Moya, A. & Moran, N.A. 2003. Side-stepping secondary symbionts: Widespread horizontal transfer across and beyond the Aphidoidea. *Mol. Ecol.* **12**: 1061–1075.
- Sachs, J.L. & Simms, E.L. 2006. Pathways to mutualism breakdown.
- Sachs, J.L., Skophammer, R.G., Bansal, N. & Stajich, J.E. 2013. Evolutionary origins and diversification of proteobacterial mutualists. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **281**: 20132146–20132146.
- Salar, P., Sémétey, O., Danet, J.L., Boudon-Padieu, E. & Foissac, X. 2009. “Candidatus Phlomobacter fragariae” and the proteobacterium associated with the low sugar content syndrome of sugar beet are related to bacteria of the arsenophonus clade detected in hemipteran insects. *Eur. J. Plant Pathol.* **126**: 123–127.
- Sandstrom, J.P., Russell, J.A., White, J.P. & Moran, N.A. 2001. Independent origins and horizontal transfer of bacterial symbionts of aphids. *Mol. Ecol.* **10**: 217–228.
- Sanogo, Y.O., Davoust, B., Parola, P., Camicas, J.L., Brouqui, P. & Raoult, D. 2003. Prevalence of *Rickettsia* spp. in *Dermacentor marginatus* ticks removed from game pigs (*Sus scrofa*) in southern France. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **990**: 191–195.
- Sasaki, T. & Ishikawa, H. 1995. Production of essential amino acids from glutamate by mycetocyte symbionts of the pea aphid, *Acyrtosiphon pisum*. *J. Insect Physiol.* **41**: 41–46.
- Sassera, D., Beninati, T., Bandi, C., Bouman, E.A.P., Sacchi, L., Fabbi, M., *et al.* 2006. “Candidatus Midichloria mitochondrii”, an endosymbiont of the tick *Ixodes ricinus* with a unique intramitochondrial lifestyle. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **56**: 2535–2540.
- Sassera, D., Epis, S., Pajoro, M. & Bandi, C. 2013. Microbial symbiosis and the control of

- vector-borne pathogens in tsetse flies, human lice, and triatomine bugs. *Pathog. Glob. Health* **107**: 285–292.
- Sassera, D., Lo, N., Epis, S., D’Auria, G., Montagna, M., Comandatore, F., *et al.* 2011. Phylogenomic Evidence for the Presence of a Flagellum and *cbb3* Oxidase in the Free-Living Mitochondrial Ancestor. *Mol. Biol. Evol.* **28**: 3285–3296.
- Schouls, L.M., Van De Pol, I., Rijpkema, S.G. & Schot, C.S. 1999. Detection and identification of *Ehrlichia*, *Borrelia burgdorferi sensu lato*, and *Bartonella* species in Dutch *Ixodes ricinus* ticks. *J. Clin. Microbiol.* **37**: 2215–22. American Society for Microbiology.
- Sémétey, O., Bressan, A., Gatineau, F. & Boudon-Padieu, E. 2007. Development of a specific assay using RISA for detection of the bacterial agent of “basses richesses” syndrome of sugar beet and confirmation of a *Pentastiridius* sp. (Fulgoromopha, Cixiidae) as the economic vector. *Plant Pathol.* **56**: 797–804.
- Seshadri, R., Paulsen, I.T., Eisen, J.A., Read, T.D., Nelson, K.E., Nelson, W.C., *et al.* 2003. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**: 5455–5460.
- Shigenobu, S., Watanabe, H., Hattori, M., Sakaki, Y. & Ishikawa, H. 2000. Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids *Buchnera* sp. APS. *Nature* **407**: 81–86.
- Shivaprasad, H.L., Cadenas, M.B., Diab, S.S., Nordhausen, R., Bradway, D., Crespo, R., *et al.* 2008. *Coxiella*-like infection in psittacines and a toucan. *Avian Dis.* **52**: 426–432.
- Smith, T.A., Driscoll, T., Gillespie, J.J. & Raghavan, R. 2015. A *Coxiella*-like endosymbiont is a potential vitamin source for the lone star tick. *Genome Biol. Evol.* **7**: 831–838.
- Sonenshine, D.E. 1991. *Biology of Ticks: Vol. 1*. Oxford University Press New York.
- Sonenshine, D.E. 2006. Tick pheromones and their use in tick control. *Annu. Rev. Entomol.* **51**: 557–580.
- Steiner, F.E., Pinger, R.R., Vann, C.N., Grindle, N., Civitello, D., Clay, K., *et al.* 2008. Infection and co-infection rates of *Anaplasma phagocytophilum* variants, *Babesia* spp., *Borrelia burgdorferi*, and the rickettsial endosymbiont in *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) from sites in Indiana, Maine, Pennsylvania, and Wisconsin. *J. Med. Entomol.* **45**: 289–97.
- Stouthamer, R. & Kazmer, D.J. 1994. Cytogenetics of microbe-associated parthenogenesis and its consequences for gene flow in *Trichogramma* wasps. *Heredity (Edinb)*. **73**: 317–327.
- Stouthamer, R., Luck, R.F. & Hamilton, W.D. 1990. Antibiotics cause parthenogenetic *Trichogramma* (Hymenoptera/Trichogrammatidae) to revert to sex. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci.* **87**: 2424–2427.
- Svensson, E.I. & Råberg, L. 2010. Resistance and tolerance in animal enemy-victim coevolution. *Trends Ecol. Evol.* **25**: 267–274. Elsevier Ltd.
- Tan, C.K. & Owens, L. 2000. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a *Rickettsia*, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis. Aquat. Organ.* **41**: 115–122.
- Teixeira, L., Ferreira, Á. & Ashburner, M. 2008. The bacterial symbiont *Wolbachia* induces resistance to RNA viral infections in *Drosophila melanogaster*. *PLoS Biol.* **6**: 2753–2763.
- Tsuchida, T. 2004. Host Plant Specialization Governed by Facultative Symbiont. *Science* (80-.). **303**: 1989–1989. American Association for the Advancement of Science.
- Turelli, M. 1994. Evolution of incompatibility-inducing microbes and their hosts. *Evolution* (N. Y). **48**: 1500–1513.
- Ura, H., Furuya, N., Iiyama, K., Hidaka, M., Tsuchiya, K. & Matsuyama, N. 2006. *Burkholderia gladioli* associated with symptoms of bacterial grain rot and leaf-sheath browning of rice plants. *J. Gen. Plant Pathol.* **72**: 98–103.
- Valmalette, J.C., Dombrovsky, A., Brat, P., Mertz, C., Capovilla, M. & Robichon, A. 2012. Light- induced electron transfer and ATP synthesis in a carotene synthesizing insect. *Sci. Rep.* **2**: 579.
- van Schaik, E.J., Chen, C., Mertens, K., Weber, M.M. & Samuel, J.E. 2013. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat. Rev. Microbiol.* **11**: 561–73.
- Vapniarsky, N., Barr, B.C. & Murphy, B. 2012. Systemic *Coxiella*-like infection with myocarditis and hepatitis in an eclectus parrot (*Eclectus roratus*). *Vet. Pathol.* **49**: 717–22.
- Vautrin, E., Genieys, S., Charles, S. & Vavre, F. 2007. Do vertically transmitted symbionts co-existing in a single host compete or cooperate? A modelling approach. *J. Evol. Biol.* **21**: 145–161.
- Vautrin, E. & Vavre, F. 2009. Interactions between vertically transmitted symbionts: cooperation or conflict? *Trends Microbiol.* **17**: 95–99.
- Vavre, F., Fleury, F., Lepetit, D., Fouillet, P. & Bouletreau, M. 1999. Phylogenetic evidence for horizontal transmission of *Wolbachia* in host-parasitoid associations. *Mol. Biol. Evol.* **16**: 1711–1723.
- Vayssier-Taussat, M., Moutailler, S., Michelet, L., Devillers, E., Bonnet, S., Cheval, J., et al. 2013. Next Generation Sequencing Uncovers Unexpected Bacterial Pathogens in Ticks

- in Western Europe. *PLoS One* **8**: e81439.
- Voordouw, M.J. 2015. Co-feeding transmission in Lyme disease pathogens. *Parasitology* **142**: 290–302.
- Werren, J.H. & Jaenike, J. 1995. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. *Heredity (Edinb)*. **75**: 320–326.
- Werren, J.H., Zhang, W. & Guo, L.R. 1995. Evolution and Phylogeny of *Wolbachia*: Reproductive Parasites of Arthropods. *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.* **261**: 55–63.
- Williams-Newkirk, A.J., Rowe, L.A., Mixson-Hayden, T.R. & Dasch, G.A. 2014. Characterization of the Bacterial Communities of Life Stages of Free Living Lone Star Ticks (*Amblyomma americanum*). *PLoS One* **9**: e102130.
- Zamboni, D.S., McGrath, S., Rabinovitch, M. & Roy, C.R. 2003. *Coxiella burnetii* express type IV secretion system proteins that function similarly to components of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system. *Mol. Microbiol.* **49**: 965–976.
- Zchori-Fein, E. & Brown, J.K. 2002. Diversity of Prokaryotes Associated with *Bemisia tabaci* (Gennadius) (Hemiptera: Aleyrodidae). *Ann. Entomol. Soc. Am.* **95**: 711–718.
- Zhong, J., Jasinskas, A. & Barbour, A.G. 2007. Antibiotic Treatment of the Tick Vector *Amblyomma americanum* Reduced Reproductive Fitness. *PLoS One* **2**: e405.
- Zreik, L., Bove, J.M. & Garnier, M. 1998. Phylogenetic characterization of the bacterium-like organism associated with marginal chlorosis of strawberry and proposition of a Candidatus taxon for the organism, “Candidatus *Phlomobacter fragariae*.” *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**: 257–261.
- Zug, R. & Hammerstein, P. 2012. Still a Host of Hosts for *Wolbachia*: Analysis of Recent Data Suggests That 40% of Terrestrial Arthropod Species Are Infected. *PLoS One* **7**: e38544.
- Zusman, T., Yerushalmi, G. & Segal, G. 2003. Functional Similarities between the icm/dot Pathogenesis Systems of *Coxiella burnetii* and *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **71**: 3714–3723.

Annexe : The Recent Evolution of a
Maternally-Inherited Endosymbiont of
Ticks Led to the Emergence of the Q
Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*

RESEARCH ARTICLE

The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*

Olivier Duron^{1*}, Valérie Noël¹, Karen D. McCoy¹, Matteo Bonazzi², Karim Sidi-Boumedine³, Olivier Morel⁴, Fabrice Vavre⁴, Lionel Zenner⁴, Elsa Jourdain⁵, Patrick Durand¹, Céline Arnathau¹, François Renaud¹, Jean-François Trape¹, Abel S. Biguezoton^{1,6}, Julie Cremaschi¹, Muriel Dietrich¹, Elsa Léger¹, Anaïs Appelgren¹, Marlène Dupraz¹, Elena Gómez-Díaz^{1,7}, Georges Diatta⁸, Guiguigbaza-Kossigan Dayo⁶, Hassane Adakal^{6,9}, Sébastien Zoungrana⁶, Laurence Vial¹⁰, Christine Chevillon¹



 OPEN ACCESS

Citation: Duron O, Noël V, McCoy KD, Bonazzi M, Sidi-Boumedine K, Morel O, et al. (2015) The Recent Evolution of a Maternally-Inherited Endosymbiont of Ticks Led to the Emergence of the Q Fever Pathogen, *Coxiella burnetii*. PLoS Pathog 11(5): e1004892. doi:10.1371/journal.ppat.1004892

Editor: Jason L. Rasgon, The Pennsylvania State University, UNITED STATES

Received: January 20, 2015

Accepted: April 17, 2015

Published: May 15, 2015

Copyright: © 2015 Duron et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Data Availability Statement: Nucleotide sequences of PCR-amplified fragments of tick-borne *Coxiella* and *Rickettsiella* genes have been deposited in the GenBank nucleotide database under accession codes KP994768-KP994862 (16S rRNA), KP994678-KP994767 (23S rRNA), KP985445-KP985537 (GroEL), KP985265-KP985357 (rpoB) and KP985358-KP985444 (dnaK).

Funding: Financial support was provided by the CNRS-INEE (Programme PEPS-Ecologie de la Santé 2014, 'SYMPATTIQUES': OD LZ; <http://www.cnrs.fr/inee/outils/PEPS2014.htm>), French Polar

1 Laboratoire MIVEGEC (Maladies Infectieuses et Vecteurs: Ecologie, Génétique, Evolution et Contrôle), Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5290)—Université de Montpellier—Institut pour la Recherche et le Développement (UR 224), Montpellier, France, **2** Centre d'études d'agents Pathogènes et Biotechnologies pour la Santé (CPBS), Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5236)—Université de Montpellier, Montpellier, France, **3** National Reference Laboratory on Q Fever, French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety (ANSES), Sophia-Antipolis, France, **4** Laboratoire de Biométrie et Biologie Évolutive (LBBE), Centre National de la Recherche Scientifique (UMR5558)—Université Claude Bernard Lyon 1, Villeurbanne, France, **5** Unité d'Epidémiologie Animale, Institut National de la Recherche Agronomique (UR346), Saint Genès Champanelle, France, **6** Unité de Recherche sur les Bases Biologiques de la lutte intégrée (URBIO), Centre International de Recherche-Développement sur l'Élevage en zone Subhumide (CIRDES), Bobo-Dioulasso, Burkina Faso, **7** Biology Department, O. Wayne Rollins Research Center, Emory University, Atlanta, Georgia, United States of America, **8** Unité de Recherche sur les Maladies Infectieuses et Tropicales Emergentes (URMITE), Centre National de la Recherche Scientifique (UMR6236)—Aix Marseille Université, Dakar, Sénégal, **9** Département des Sciences et Techniques de l'Élevage (DSTE/FASE), Université Dan Dicko Dan Koulo, Maradi, Niger, **10** Centre de Coopération Internationale en Recherche Agronomique pour le Développement (CIRAD), Prades-le-Lez, France

* olivier.duron@ird.fr

Abstract

Q fever is a highly infectious disease with a worldwide distribution. Its causative agent, the intracellular bacterium *Coxiella burnetii*, infects a variety of vertebrate species, including humans. Its evolutionary origin remains almost entirely unknown and uncertainty persists regarding the identity and lifestyle of its ancestors. A few tick species were recently found to harbor maternally-inherited *Coxiella*-like organisms engaged in symbiotic interactions, but their relationships to the Q fever pathogen remain unclear. Here, we extensively sampled ticks, identifying new and atypical *Coxiella* strains from 40 of 58 examined species, and used this data to infer the evolutionary processes leading to the emergence of *C. burnetii*. Phylogenetic analyses of multi-locus typing and whole-genome sequencing data revealed that *Coxiella*-like organisms represent an ancient and monophyletic group allied to ticks. Remarkably, all known *C. burnetii* strains originate within this group and are the descendants of a *Coxiella*-like progenitor hosted by ticks. Using both colony-reared and field-collected

Institute (IPEV, programme no. 333: KDMcC; http://www.institut-polaire.fr/ipev/programmes_de_recherche), the CNRS-INEE/TAAF (Programme Iles Eparses "PathOmithoTiques": KDMcC; http://www.cnrs.fr/inee/recherche/programmes/iles_eparses.htm), and the Agence Nationale de la Recherche (ANR-11-BSV7-003-02: KDMcC, ANR-13-BSV7-0018-01: KDMcC, ANR-3215AO-3R077-STEV: FR, PD, CA, JFT, ANR-11-LABX-0048: FV, OM, LZ, EJ; <http://www.agence-nationale-recherche.fr/>). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

gravid females, we further establish the presence of highly efficient maternal transmission of these *Coxiella*-like organisms in four examined tick species, a pattern coherent with an endosymbiotic lifestyle. Our laboratory culture assays also showed that these *Coxiella*-like organisms were not amenable to culture in the vertebrate cell environment, suggesting different metabolic requirements compared to *C. burnetii*. Altogether, this corpus of data demonstrates that *C. burnetii* recently evolved from an inherited symbiont of ticks which succeeded in infecting vertebrate cells, likely by the acquisition of novel virulence factors.

Author Summary

How virulent infectious diseases emerge from non-pathogenic organisms is a challenging question. Here, we address this evolutionary issue in the case of Q fever. Its causative agent, the intracellular bacterium *Coxiella burnetii*, is extremely infectious to humans and a variety of animals. However, uncertainty persists regarding its evolutionary origin, including the identity and lifestyle of its ancestors. In this article, we show that *C. burnetii* arose from a rare evolutionary transformation of a maternally-inherited endosymbiont of ticks into a specialized and virulent pathogen of vertebrates. While arthropod symbionts are typically transmitted maternally and thought not to be infectious to vertebrates, we establish here that one *Coxiella* symbiont has evolved the necessary adaptations to exploit the vertebrate cell, leading to the emergence of Q fever.

Introduction

'Query fever' (Q fever) is a highly infectious zoonotic disease first identified in 1937 [1,2,3,4,5]. The causative agent, the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*, infects a variety of vertebrate species, including humans. Sporadic cases in humans occur annually worldwide, but occasional outbreaks are also common [1,2,3,4]. For example, in the Netherlands more than 4,000 human cases were reported between 2007 and 2010 [6]. While most human cases are self-limiting with fever and fatigue, acute forms range from mild flu-like symptoms to pneumonia or hepatitis. The disease can also become chronic (mainly endocarditis), and, though rarely fatal, remains highly debilitating even when treated with antibiotics [1,2]. Most human cases are linked to contact with infected livestock, especially goats and sheep, which suffer abortion and reproductive disorders. Infection usually occurs by the inhalation of aerosolized resistant small cell variants that are present in the excretions of infected animals. Other modes of transmission including ingestion of unpasteurized milk or dairy products; human-to-human contact is also possible but considered rare [1,2,4,5]. One of the most virulent reference strains of *C. burnetii* (strain RSA 493 / Nine Mile I [7]) was isolated from a guinea pig on which field-collected Rocky Mountain wood ticks *Dermacentor andersoni* had fed, suggesting that transmission through tick bites may also occur [8]. The small cell variants of the bacterium can survive and remain highly infectious for long periods in the environment, leading to the classification of *C. burnetii* as potential bioterrorism agent [9].

The evolutionary origin of Q fever is unclear since the *C. burnetii* ancestor and its primary lifestyle remain entirely unknown. Historically, *C. burnetii* was assigned to the taxonomic order Rickettsiales (Alphaproteobacteria), but it has been recently considered more closely related to the Legionellales order (Gammaproteobacteria) because of its genetic proximity to the Legionnaires' disease agent, *Legionella pneumophila* [10]. The Legionellales order includes

many other intracellular bacteria infecting non-vertebrate species, such as, for instance, *Rickettsiella* species that are both widespread and biologically diverse in arthropods [11,12,13]. Within the *Coxiella* genus, the only known relative of *C. burnetii* which has been formally identified is *C. cheraxi*, a pathogen of crayfishes [14]. Many past descriptions of *Coxiella* were likely biased toward the detection of pathogenic strains since most *C. burnetii* isolates were collected from humans or domestic ruminants during Q fever outbreaks [1,5,15]. However, the advent of 16S rRNA gene sequencing as a universal DNA barcoding marker in bacteria has led to the description of a few novel *Coxiella*-like organisms in non-vertebrate species (listed in [16]), and particularly in ticks [17,18,19,20,21,22,23,24,25]. All these *Coxiella*-like organisms are closely related, but genetically distinct to *C. burnetii*, suggesting that some diversity exists within the *Coxiella* genus. The highly conserved nature of the 16S rRNA gene sequences has prevented researchers from establishing the exact relationship between *C. burnetii* and *Coxiella*-like organisms, and a sister clade relationship is commonly assumed [16,18,21,22,23].

The *Coxiella*-like organisms differ from *C. burnetii* in their biological traits and some may behave as subtle symbionts engaged in intricate interactions with ticks. In ticks belonging to *Ornithodoros*, *Amblyomma* and *Rhipicephalus* genera, *Coxiella*-like organisms were found to massively infect ovaries and to be maternally inherited through the egg cytoplasm [18,20,21,26]. In these tick species, the presence of the bacteria in the Malpighian tubules further suggests a possible role in nutrition by potentially provisioning their hosts with essential nutrients [20,21,26]. Indeed, the elimination of these bacteria with an antibiotic treatment was shown to negatively impact the fitness of the lone star tick *A. americanum* [27]. Accordingly, when the *Coxiella*-like bacterium found in *A. americanum* was recently sequenced [16], no recognizable virulence genes were found, indicating that this bacterium is likely non-pathogenic. In contrast, its genome encodes major vitamin and cofactor biosynthesis pathways, suggesting that it may be a vitamin-provisioning endosymbiont. This interaction exhibits the typical hallmarks of maternally-inherited symbionts with essential roles in arthropod biology [28,29]. Such patterns have been found in other exclusive blood-feeding species like bedbugs [30] and tsetse flies [31], two insect groups which rely on a single food source throughout their developmental cycle and harbor beneficial microbes that provide nutrients absent from their restricted diets. The *Coxiella*-like organisms of ticks share obvious similarities with these beneficial endosymbionts.

Here, we examine the origin of the Q fever pathogen, *C. burnetii*, by inferring the evolutionary processes that have shaped diversity within the entire *Coxiella* genus. To this aim, we first sampled an extensive range of ticks, with 58 tick species examined, and developed a sensitive detection method that reveals a wider *Coxiella* diversity than recognized in past studies. Second, instead of relying solely on the 16S rRNA gene, a molecular marker that is notoriously inadequate for inferring reliable fine-scale phylogenies [32], we used a novel multilocus typing method, allied to Whole Genome Sequencing (WGS) data, and conducted phylogenetic analyses on a large amount of DNA sequence data. Third, we examined two major ecological features of *Coxiella*-like organisms, i.e. their ability to be maternally-inherited through the tick egg cytoplasm and to grow in a vertebrate cell environment suitable to *C. burnetii*. Altogether, this corpus of data has led to the characterization of a large genetic and ecological diversity within the *Coxiella* genus, far beyond the *C. burnetii* type species. The *Coxiella*-like organisms of ticks form an ancient lineage of maternally-inherited tick endosymbionts that do not lie as a sister-clade to *C. burnetii* but rather form a basal lineage illustrative of the ancestral *Coxiella* life style.

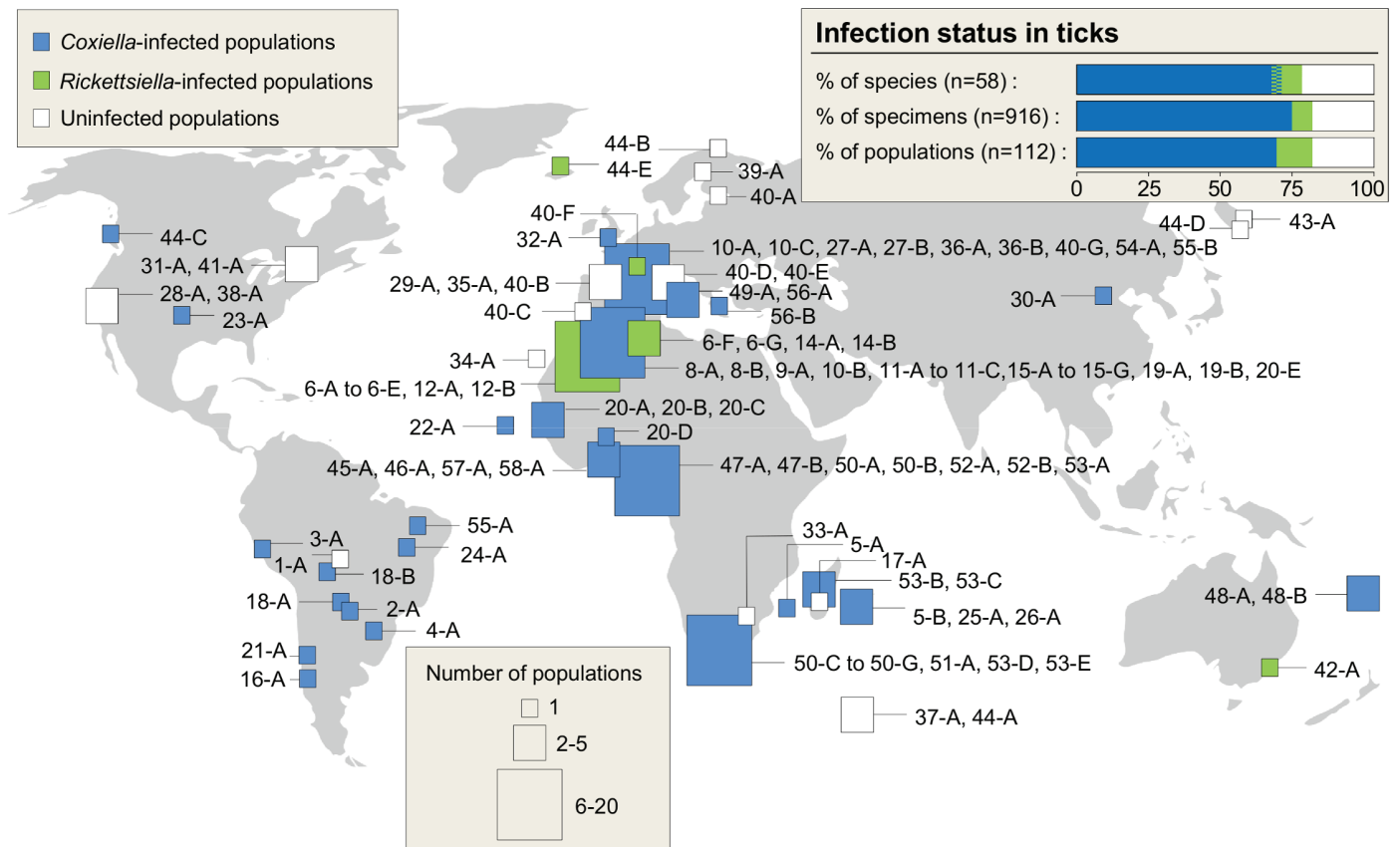


Fig 1. Geographic origin of the sampled ticks and distribution of *Coxiella* and *Rickettsiella* infections. Square size indicates the number of populations sampled per geographic area. Numbers refer to the tick species whereas letters discriminate the different populations screened within a species; this nomenclature is detailed in Table 1. The colors within squares indicate the infection status of populations. Two tick species were infected by both *Coxiella* and *Rickettsiella* at the species level, but not at individual and population levels.

doi:10.1371/journal.ppat.1004892.g001

Results

Ticks commonly harbor *Coxiella*-like organisms

We performed an extensive screening for the presence of *Coxiella* in 916 tick specimens from 58 species belonging to the two main tick families, Ixodidae (hard ticks, 36 species) and Argasidae (soft ticks, 22 species) (Fig 1 and Table 1). Except for 37 specimens (6 species) derived from laboratory colonies, all other tick specimens were sampled from natural populations in Europe, Americas, Africa, Oceania and Asia (n = 112 localities). In these populations, ticks were collected either in the host habitat or directly on hosts (Table 1). To detect *C. burnetii* and its relatives, we developed a detection method based on a nested polymerase chain reaction (PCR) using total tick DNA extracts to amplify a 539–542 base-pair (bp) fragment of the *Coxiella rpoB* gene (Table A in S1 Text).

Using this procedure, all the tick-borne bacteria we detected belong to the Legionellales order and can be unambiguously assigned either to *Coxiella* or to its sister genus, *Rickettsiella*. Whole tick DNA extracts from more than two thirds of the specimens (637 out of 916, 69.6%) and the species (40 out of 58, 70.0%) were found to be positive for *Coxiella* (Fig 1 and Table 1). *Coxiella* was found in most tested genera of hard ticks (*Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*) and soft ticks (*Ornithodoros*, *Argas*). In almost all infected

Table 1. List of tick species and populations included in the analysis, with details on their origin, the population sample size, and the prevalence of *Coxiella* spp. and *Rickettsiella* spp.

Tick species	Sample sites	Tick host species or habitat	n	<i>Coxiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)	<i>Rickettsiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)
Argasidae (soft ticks)					
1 - <i>Antricola guglielmonei</i> Estrada-Peña, Barros-Battesti and Venzal, 2004	1-A, Porto Velho, Rondonia, Brazil	Bat guano in cave	4	0.00 (0)	0.00 (0)
2 - <i>Argas monachus</i> Keirans, Radvosky and Clifford, 1973	2-A, Chaco, Argentina	Unknown	3	1.00 (3)	0.00 (0)
3 - <i>Ornithodoros amblus</i> Chamberlin, 1920	3-A, Lobos de Tierra Island, Peru, 2009	Peruvian Pelican (<i>Pelecanus thagus</i>), Peruvian Booby (<i>Sula variegata</i>)	5	1.00 (5)	0.00 (0)
4 - <i>Ornithodoros brasiliensis</i> Aragão, 1923	4-A, Sao Francisco de Paula, Brazil	Unknown	3	1.00 (3)	0.00 (0)
5 - <i>Ornithodoros capensis</i> Neumann, 1901	5-A, Juan de Nova Island, Mozambic Channel, 2011	Sooty Tern (<i>Onychoprion fuscatus</i>)	28	1.00 (28)	0.00 (0)
	5-B, Réunion Island	Sea bird nests	3	1.00 (3)	0.00 (0)
6 - <i>Ornithodoros costalis</i> Diatta, Bouattour, Durand, Renaud and Trape, 2013	6-A, Kenitra, Morocco, 2006	Rodent burrows	7	0.00 (0)	1.00 (7)
	6-B, Sidi Akhfennir, Morocco, 2006	Rodent burrows	18	0.00 (0)	1.00 (18)
	6-C, Boujdour, Morocco, 2006	Rodent burrows	2	0.00 (0)	1.00 (2)
	6-D, El Argoub, Morocco, 2006	Rodent burrows	2	0.00 (0)	1.00 (2)
	6-E, Lahmiris, Morocco, 2010	Rodent burrows	1	0.00 (0)	1.00 (1)
	6-F, Mostaganem, Algeria, 2012	Rodent burrows	4	0.00 (0)	1.00 (4)
	6-G, Oudhna, Tunisia, 2010	Rodent burrows	4	0.00 (0)	1.00 (4)
7 - <i>Ornithodoros denmarki</i> Kohls, Sonenshine and Clifford, 1965	7-H, unknown	Sea bird nests	1	1.00 (1)	0.00 (0)
8 - <i>Ornithodoros erraticus</i> Lucas, 1849	8-A, La Calle, Tunisia, 2009	Rodent burrows	1	1.00 (1)	0.00 (0)
	8-B, Taher, Algeria, 2010	Rodent burrows	2	1.00 (2)	0.00 (0)
9 - <i>Ornithodoros kairouanensis</i> Trape, Diatta, Bouattour, Durand and Renaud, 2013	9-A, Kairouan, Tunisia, 2010	Rodent burrows	3	1.00 (3)	0.00 (0)
10 - <i>Ornithodoros maritimus</i> Vermeil and Marguet, 1967	10-A, Medes Island, Spain, 2009	Yellow-legged Gull (<i>Larus michahellis</i>)	20	1.00 (20)	0.00 (0)
	10-B, Zembra Island, Tunisia, 2009	Yellow-legged Gull (<i>Larus michahellis</i>)	20	1.00 (20)	0.00 (0)
	10-C, Carteau, France, 2014	Yellow-legged Gull (<i>Larus michahellis</i>)	8	1.00 (8)	0.00 (0)
11 - <i>Ornithodoros maroccanus</i> Velu, 1919	11-A, Izemmourèn, Morocco, 2009	Rodent burrows	1	1.00 (1)	0.00 (0)
	11-B, Berkane Oued Kiss, Morocco, 2006	Rodent burrows	1	1.00 (1)	0.00 (0)

(Continued)

Table 1. (Continued)

Tick species	Sample sites	Tick host species or habitat	n	<i>Coxiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)	<i>Rickettsiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)
	11-C, Bir-Jdid, Morocco, 2009	Rodent burrows	1	1.00 (1)	0.00 (0)
12 - <i>Ornithodoros merionesi</i> - Trape, Diatta, Belghyti, Sarih, Durand and Renaud, 2013	12-A, Guelmin, Morocco, 2006	Rodent burrows	1	0.00 (0)	1.00 (1)
	12-B, Sidi Akhfennir, Morocco, 2006	Rodent burrows	2	0.00 (0)	1.00 (2)
13 - <i>Ornithodoros moubata</i> - Murray, 1877	13-A, Laboratory strain derived from field specimens of unknown origin	Unknown	3	0.00 (0)	0.00 (0)
14 - <i>Ornithodoros normandi</i> - Larrousse, 1923	14-A, Bizerte, Tunisia, 2010	Rodent burrows	1	0.00 (0)	1.00 (1)
	14-B, Oudhna, Tunisia, 2010	Rodent burrows	2	0.00 (0)	1.00 (2)
15 - <i>Ornithodoros occidentalis</i> - Trape, Diatta, Durand and Renaud, 2013	15-A, Fes, Morocco, 2010	Rodent burrows	4	1.00 (4)	0.00 (0)
	15-B, Kenitra, Morocco, 2006	Rodent burrows	4	1.00 (4)	0.00 (0)
	15-C, Beb-Lerba, Morocco, 2010	Rodent burrows	4	1.00 (4)	0.00 (0)
	15-D, Oued Choufcherk, Morocco, 2010	Rodent burrows	4	1.00 (4)	0.00 (0)
	15-E, Bouira, Algeria, 2010	Rodent burrows	4	1.00 (4)	0.00 (0)
	15-F, Berrouaghia, Algeria, 2010	Rodent burrows	4	1.00 (4)	0.00 (0)
	15-G, Chlef, Algeria, 2010	Rodent burrows	4	1.00 (4)	0.00 (0)
16 - <i>Ornithodoros peruvianus</i> - Kohls, Clifford and Jones, 1969	16-A, Chile	Common vampire Bat (<i>Desmodus rotundus</i>)	3	1.00 (3)	0.00 (0)
17 - <i>Ornithodoros porcinus</i> - Walton, 1962	17-A, Laboratory strain derived from field specimens collected in Mahitsy, Madagascar, 2008–2010	Unknown	3	0.00 (0)	0.00 (0)
18 - <i>Ornithodoros rostratus</i> - Aragão, 1911	18-A, Salta, Argentina	Environement	18	1.00 (18)	0.00 (0)
	18-B, Laboratory strain derived from field specimens collected in Nhecolandi, Pantanal, Brazil	Environement	4	1.00 (4)	0.00 (0)
19 - <i>Ornithodoros rupestris</i> - Trape, Bitam, Renaud and Durand, 2013	19-A, Saïda Mt Daïa, Algeria, 2012	Rodent burrows	1	1.00 (1)	0.00 (0)
	19-B, Mostaganem, Algeria, 2012	Rodent burrows	2	1.00 (2)	0.00 (0)
20 - <i>Ornithodoros sonrai</i> - Sautet and Witkowski, 1943	20-A, Dielmo, Senegal, 2002	Rodent burrows	20	1.00 (20)	0.00 (0)
	20-B, Kanène Khar, Senegal, 2003	Rodent burrows	17	1.00 (17)	0.00 (0)
	20-C, Richard-Toll, Senegal, 2003	Rodent burrows	19	1.00 (19)	0.00 (0)

(Continued)

Table 1. (Continued)

Tick species	Sample sites	Tick host species or habitat	n	<i>Coxiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)	<i>Rickettsiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)	
	20-D, Sogohi, Mali, 2007	Rodent burrows	10	1.00 (10)	0.00 (0)	
	20-E, M'Chounèche, Algeria, 2009	Rodent burrows	37	1.00 (37)	0.00 (0)	
21 -	<i>Ornithodoros spheniscus</i> Hoogstraal, Wassef, Hays and Keirans, 1985	21-A, Pan de Azucar, Chile, 2010–2013	Humboldt penguin (<i>Spheniscus humboldti</i>)	3	1.00 (3)	0.00 (0)
22 -	<i>Ornithodoros</i> sp. (<i>capensis</i> species complex)	22-A, Boa Vista Island, Cape Verde, 2008	Cape Verde Shearwater (<i>Calonectris edwardsii</i>) and Brown Booby (<i>Sula leucogaster</i>) Ixodidae (hard ticks)	16	1.00 (16)	0.00 (0)
23 -	<i>Amblyomma americanum</i> (Linnaeus, 1758)	23-A, Laboratory strain derived from field engorged females collected in Oklahoma, USA, 1976–2004	Unknown	20	1.00 (20)	0.00 (0)
24 -	<i>Amblyomma cajennense</i> (Fabricius, 1787)	24-A, Chapada Gaucha, Brazil, 2013	Unknown	3	1.00 (3)	0.00 (0)
25 -	<i>Amblyomma loculosum</i> Neumann, 1907	25-A, Petite Ile, La Réunion, 2012	Wedge-Tailed Shearwater (<i>Puffinus pacificus</i>) nests	3	1.00 (3)	0.00 (0)
26 -	<i>Amblyomma variegatum</i> (Fabricius, 1794)	26-A, La Réunion	Unknown	2	1.00 (2)	0.00 (0)
27 -	<i>Dermacentor marginatus</i> (Sulzer, 1776)	27-A, Cavaillon, France, 2011	Vegetation	1	1.00 (1)	0.00 (0)
		27-B, Les Plantiers, France, 2013	Vegetation	1	1.00 (1)	0.00 (0)
28 -	<i>Dermacentor occidentalis</i> Marx, 1892	28-A, Hopland, Mendocino Co, California, 1985	Environement	6	0.00 (0)	0.00 (0)
29 -	<i>Dermacentor reticulatus</i> (Fabricius, 1794)	29-A, Proveysieux, France, 2011	Vegetation	1	0.00 (0)	0.00 (0)
30 -	<i>Dermacentor silvarum</i> Olenev, 1931	30-A, Laboratory strain derived from field specimens collected in Xiaowutai National Natural Reserve Area, China		2	1.00 (2)	0.00 (0)
31 -	<i>Dermacentor variabilis</i> (Say, 1821)	31-A, Queen's biology station, Ontario, Canada, 2013	Vegetation	2	0.00 (0)	0.00 (0)
32 -	<i>Haemaphysalis punctata</i> Canestrini and Fanzago, 1878	32-A, East Sussex, England, 2011	Vegetation	5	1.00 (5)	0.00 (0)
33 -	<i>Hyalomma impeltatum</i> Schulze and Schlottke, 1930	33-A, Zimbabwe, 1998	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	3	0.00 (0)	0.00 (0)
34 -	<i>Hyalomma lusitanicum</i> Koch, 1844	34-A, Veneguera, Canaries, 2010	Vegetation	2	0.00 (0)	0.00 (0)
35 -	<i>Ixodes frontalis</i> (Panzer, 1798)	35-A, Bretagne, France, 2008	Eurasian Collared Dove (<i>Streptopelia decaocto</i>)	1	0.00 (0)	0.00 (0)
36 -	<i>Ixodes hexagonus</i> Leach, 1815	36-A, Bretagne, France, 2008	European Red Fox (<i>Vulpes vulpes</i>)	1	1.00 (1)	0.00 (0)
		36-B, Beaumont-Monteux, France, 2008	European Hedgehog (<i>Erinaceus europaeus</i>)	2	1.00 (1)	0.00 (0)
37 -	<i>Ixodes kerguelensis</i> André and Colas-Belcour, 1942	37-A, Crozet Archipelago, 2003	Sea bird nests	2	0.00 (0)	0.00 (0)

(Continued)

Table 1. (Continued)

Tick species	Sample sites	Tick host species or habitat	n	<i>Coxiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)	<i>Rickettsiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)	
38 - - - -	<i>Ixodes pacificus</i> Cooley and Kohls, 1943	38-A, Hopland, Mendocino Co, California, 1985	Environment	6	0.00 (0)	0.00 (0)
39 -	<i>Ixodes persulcatus</i> Schulze, 1930	39-A, Oulu, Finland, 2011	Vegetation	3	0.00 (0)	0.00 (0)
40 -	<i>Ixodes ricinus</i> (Linnaeus, 1758)	40-A, Lehmäsaari, Finland, 2011	Vegetation	20	0.00 (0)	0.00 (0)
		40-B, Rioja, Spain, 2011	Vegetation	20	0.00 (0)	0.00 (0)
		40-C, Mafra, Portugal, 2013	Vegetation	16	0.00 (0)	0.00 (0)
		40-D, Neuchâtel, Switzerland, 2012	Vegetation	16	0.00 (0)	0.00 (0)
		40-E, Chur, Switzerland, 2012	Hazel grouse (<i>Tetrastes bonasia</i>)	4	0.00 (0)	0.00 (0)
		40-F, Sénart, France, 2010	European Roe Deer (<i>Capreolus capreolus</i>), rodents and passerines	22	0.00 (0)	0.05 (1)
		40-G, Ain, France, 2004	Vegetation	2	1.00 (1)	0.00 (0)
41 -	<i>Ixodes scapularis</i> Say, 1821	41-A, Queen's biology station, Ontario, Canada, 2013	Vegetation	3	0.00 (0)	0.00 (0)
42 -	<i>Ixodes tasmani</i> Neumann, 1899	42-A, Kilarney Circuit, Coolangubra, Australia, 1982	Common Wombat (<i>Vombatus ursinus</i>)	2	0.00 (0)	1.00 (2)
43 -	<i>Ixodes unicavatus</i> Neumann, 1908	43-A, Ariy Kamen Islet, Kamchatka, Russia, 2008	Black-legged Kittiwake (<i>Rissa tridactyla</i>) and Red-legged Kittiwake (<i>Rissa brevirostris</i>)	4	0.00 (0)	0.00 (0)
44 -	<i>Ixodes uriae</i> White, 1852	44-A, Possession Island, Crozet Archipelago, 2003	King Penguin (<i>Aptenodytes patagonicus</i>)	20	0.00 (0)	0.00 (0)
		44-B, Hornøya Island, Norway, 2010	Brünnich's Guillemot (<i>Uria lomvia</i>)	20	0.00 (0)	0.00 (0)
		44-C, Triangle Island, Canada, 2010	Rhinoceros Auklet (<i>Cerorhinca monocerata</i>)	14	0.50 (7)	0.00 (0)
		44-D, Pitchie2, Kamchatka, Russia, 2008	Red-faced Cormorant (<i>Phalacrocorax urile</i>)	20	0.00 (0)	0.00 (0)
		44-E, Grimsey, Iceland, 2003	Atlantic Puffin (<i>Fratercula arctica</i>), Common Guillemot (<i>Uria aalge</i>) and Black-legged Kittiwake (<i>Rissa tridactyla</i>)	25	0.00 (0)	0.20 (5)
45 -	<i>Ixodes</i> sp.1	45-A, Guiglo, Ivory Coast, 1994	Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	12	1.00 (12)	0.00 (0)
46 -	<i>Ixodes</i> sp.2	46-A, Guiglo, Ivory Coast, 1994	Dog (<i>Canis familiaris</i>)	12	1.00 (12)	0.00 (0)
47 -	<i>Rhipicephalus annulatus</i> (Say, 1821)	47-A, Burkina-Faso, 2013	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	17	1.00 (17)	0.00 (0)
		47-B, Gogonou, Benin, 2012	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	5	1.00 (5)	0.00 (0)
48 -	<i>Rhipicephalus australis</i> Fuller, 1899	48-A, CCA Farm, New Caledonia, 2003	Cattle (<i>Bos taurus</i>)	12	1.00 (12)	0.00 (0)
		48-B, BMMMM Farm, New Caledonia, 2003	Cattle (<i>Bos taurus</i>)	12	1.00 (12)	0.00 (0)
49 -	<i>Rhipicephalus bursa</i> Canestrini and Fanzago, 1878	49-A, Italia	Cattle (<i>Bos taurus</i>) and Sheep (<i>Ovis aries</i>)	2	1.00 (2)	0.00 (0)

(Continued)

Table 1. (Continued)

Tick species	Sample sites	Tick host species or habitat	n	<i>Coxiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)	<i>Rickettsiella</i> prevalence (number of infected tick specimens)
50- <i>Rhipicephalus decoloratus</i> Koch, 1844	50-A, Burkina-Faso, 2013	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	20	0.95 (19)	0.00 (0)
	50-B, Gogonou, Benin, 2012	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	9	1.00 (9)	0.00 (0)
	50-C, Sandvelt, South Africa, 2011	Blue Wildebeest (<i>Connochaetes taurinus</i>), Greater Kudu (<i>Tragelaphus strepsiceros</i>) and Southern Eland (<i>Taurotragus oryx</i>)	20	1.00 (20)	0.00 (0)
	50-D, Queenstown, South Africa, 2011	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	17	1.00 (17)	0.00 (0)
	50-E, Vaalwater, South Africa, 2010	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	19	1.00 (19)	0.00 (0)
	50-F, Lephale, South Africa, 2010	South African Giraffe (<i>Giraffa camelopardalis giraffa</i>)	9	1.00 (9)	0.00 (0)
	50-G, Zimbabwe, 1998	Impala (<i>Aepyceros melampus</i>)	11	1.00 (11)	0.00 (0)
51- <i>Rhipicephalus evertsi</i> Neumann, 1897	51-A, Zimbabwe, 1998	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	8	1.00 (8)	0.00 (0)
52- <i>Rhipicephalus geigy</i> Aeschlimann and Morel, 1965	52-A, Burkina-Faso, 2013	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	18	0.94 (17)	0.00 (0)
	52-B, Gogonou, Benin, 2012	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	3	1.00 (3)	0.00 (0)
53- <i>Rhipicephalus microplus</i> (Canestrini, 1888)	53-A, Kpinnou, Benin, 2012	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	20	1.00 (20)	0.00 (0)
	53-B, Ambalanirana, Madagascar, 2013	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	18	1.00 (18)	0.00 (0)
	53-C, Imeritsiatosika, Madagascar, 2013	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	14	1.00 (14)	0.00 (0)
	53-D, Eglinton, South Africa, 2011	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	20	1.00 (20)	0.00 (0)
	53-E, Welverdiemda, South Africa, 2011	Zebu (<i>Bos indicus</i>)	11	1.00 (11)	0.00 (0)
	53-F, Laboratory strain derived from field engorged females collected in Kpinnou, Benin, 2012	Girolando (Cattle x Zebu hybrid)	7	1.00 (7)	0.00 (0)
54- <i>Rhipicephalus pusillus</i> Gil Collado, 1936	54-A, Gard, France, 2006	Vegetation	2	1.00 (2)	0.00 (0)
55- <i>Rhipicephalus sanguineus</i> (Latreille, 1806)	55-A, Brazil	Dog (<i>Canis familiaris</i>)	1	1.00 (1)	0.00 (0)
	55-B, Montferrier-sur-Lez, France, 2013	Dog (<i>Canis familiaris</i>)	1	1.00 (1)	0.00 (0)
56- <i>Rhipicephalus turanicus</i> Pomerantzev, 1940	56-A, Italia	Vegetation	2	1.00 (2)	0.00 (0)
	56-B, Kerkyra, Greece, 2012	Human (<i>Homo sapiens</i>)	3	1.00 (3)	0.00 (0)
57- <i>Rhipicephalus</i> sp.1	57-A, Guiglo area, Ivory Coast, 1994	Leopard (<i>Panthera pardus</i>)	3	1.00 (3)	0.00 (0)
58- <i>Rhipicephalus</i> sp.2	58-A, Guiglo, Ivory Coast, 1994	Dog (<i>Canis familiaris</i>)	2	1.00 (2)	0.00 (0)

doi:10.1371/journal.ppat.1004892.t001

species, *Coxiella* was detected in >90% of the examined specimens, indicating high *Coxiella* prevalence in diverse tick species. For example, infection was apparently fixed in populations of most *Rhipicephalus* and *Ornithodoros* species (Table 1). In contrast, *Coxiella* was frequently absent in *Ixodes* species and displayed highly variable prevalence in the five infected species (out of 12 screened).

Other Legionellales bacteria of the genus *Rickettsiella* were found in 52 specimens (5.7%) from six *Ornithodoros* species and three *Ixodes* species (Fig 1 and Table 1). In two of the three *Rickettsiella*-infected *Ixodes* species, i.e. *I. ricinus* and *I. uriae*, *Coxiella* was also found, but in different individuals and in distinct populations (i.e., no co-infection by *Coxiella* and *Rickettsiella* occurred at individual and population levels; Table 1). Adding the *Rickettsiella*-positive samples, we found that 689 of the 916 examined tick specimens (75.2%) and 44 of 58 screened species (76%) harbored either *Coxiella* or one of its relatives.

High genetic diversity among tick-borne *Coxiella*

To characterize *Coxiella* genetic diversity, we developed a multi-locus typing method based on five conserved bacterial genes including *rpoB* and four other housekeeping genes: 16S rRNA, 23S rRNA, *GroEL* and *dnaK* (Table A and Fig A in S1 Text). Multi-locus sequences were obtained from a subsample of 85 *Coxiella*- and 12 *Rickettsiella*-positive tick specimens (one to four specimens per infected species were examined). All five bacterial genes were successfully amplified from 71 *Coxiella*- and 12- *Rickettsiella* positive specimens representing 35 *Coxiella*- and six *Rickettsiella*-infected tick species. For five other *Coxiella*-infected species (i.e., 14 individual ticks), only three to four bacterial genes were successfully amplified. The sequences were easily readable without double peaks, indicating that there was no coinfection of *Coxiella*/*Rickettsiella* strains in any specimen.

The overall dataset included 33 to 40 alleles per bacterial gene (Table 2) and 51 new multi-locus genotypes (43 in *Coxiella* and eight in *Rickettsiella*). Within the *Coxiella* genus, all pairs of 16S rRNA gene sequences are at least 93% identical (Table 2) and range in threshold values typically used to delineate other Legionellales genera such as *Legionella* [33] and *Rickettsiella* [34]. Each of the infected tick species harbored a specific bacterial genotype or a set of closely related genotypes. None of the *Coxiella* multi-locus genotypes identified in ticks was identical to those of the 15 *C. burnetii* reference strains (Table B in S1 Text), although some showed moderate levels of nucleotide identity: pairwise identity between the two groups ranged from 77.8% to 97.7%. For each bacterial gene, the genetic diversity was significantly higher in the *Coxiella* strains of ticks than in *C. burnetii* as illustrated by the metrics on their respective genetic diversity (Table 2, paired t test, all $P < 0.02$).

Coxiella burnetii originated from a tick-borne *Coxiella* ancestor

We constructed a multi-gene phylogeny of the entire *Coxiella* genus using a dataset that included the *Coxiella* and *Rickettsiella* sequences from ticks, the 15 *C. burnetii* reference genomes, as well as sequences from *Legionella* spp. and more distant outgroups that were available in GenBank (Table B in S1 Text). The concatenated sequences included 3009 unambiguously aligned base pairs (bp). Prior recombination tests showed that *Coxiella* and *Rickettsiella* strains did not exhibit a strictly clonal structure, but rather experienced significant genetic exchanges. We thus applied a sequence-based network approach that does not force relationships to be tree-like but rather incorporates recombination into the phylogenetic reconstruction. The network results (Fig 2), as well as the results from the Maximum Likelihood (ML) tree-based analysis (Fig B in S1 Text), consistently showed that the *Coxiella* genus can be split into four main clades (labeled A-to-D hereafter) with each clade clustering the *Coxiella* genotypes found in five to 15

tick species. The phylogenetic analyses also highlight that all *C. burnetii* isolates cluster into a unique subclade embedded within the A clade (Fig B and C in [S1 Text](#) and [Fig 2](#)). Notably, the closest relatives of *C. burnetii* are the *Coxiella* strains from soft ticks of the *Ornithodoros* and *Argas* genera, suggesting that the common ancestor of *C. burnetii* originated from a *Coxiella* hosted by soft ticks.

The partitioning of *Coxiella* diversity among tick species revealed a complex structure, indicating a role for both co-divergence and horizontal transfer events in the evolution of this bacterial group. Closely related *Coxiella*-like organisms were frequently found in closely related tick species, a pattern suggestive of co-divergence between *Coxiella* and ticks (Fig B in [S1 Text](#) and [Fig 2](#)). For instance, all the *Coxiella*-like organisms found in the 12 examined *Rhipicephalus* tick species cluster together within the C clade, whereas all the *Coxiella*-like organisms in the *Ixodes* species cluster within the B clade (Fig B in [S1 Text](#) and [Fig 2](#)). Conversely, some *Coxiella*-like organisms found in related tick species are only distantly related and do not cluster together (e.g., the *Coxiella*-like organisms of *Ornithodoros* soft ticks are scattered among the A, B and C clades), a pattern suggestive of horizontal transfers among tick species.

Further analyses were conducted by examining public repositories of DNA sequencing data generated by the whole genome sequencing (WGS) projects of the cattle tick *R. microplus* and the deer tick *I. scapularis*. Using the 1,995,281 bp *C. burnetii* (str. Nine Mile I RSA 493) genome as a probe, we found clear evidence of *Coxiella* infections in *R. microplus*, but not in *I. scapularis*. A total of 31 contigs (514–2,349 bp, totaling 34,990 bp) from *R. microplus* sequencing were uniquely attributable to *Coxiella*. They matched 50 genes of *C. burnetii* with 68-to-100% nucleotide identity (Fig A and Table C in [S1 Text](#) and [Fig 3A](#)). Alignment of the 31 *Coxiella* contigs to other bacterial genomes, including the 15 *C. burnetii* reference genomes (19,304 unambiguously aligned bp), corroborates the finding of our prior five loci-based analyses: the *Coxiella* strain identified in *R. microplus* is evolutionarily related, but distinct, to *C. burnetii* ([Fig 3B](#)).

Coxiella-like organisms are maternally inherited in ticks

It should be noted that the *R. microplus* WGS DNA examined above was extracted from eggs of an inbred strain of ticks (Deutsch strain), first derived from a few field specimens sampled in Texas in 2001, and reared for at least seven generations in the laboratory. The presence of *Coxiella* DNA in the WGS of *R. microplus* eggs thus raised the issue of their maternal inheritance in ticks. To address this question, 24 gravid females of four *Coxiella*-positive tick species were collected either from seabird nests (*O. maritimus*, n = 8 females), from a dog (*R. sanguineus*, n = 1) or from laboratory colonies (*R. microplus*, n = 7; *A. americanum*, n = 8) in order to test for the presence of *Coxiella*-infection in the cytoplasm of their progeny (8 to 14 surface-sterilized eggs per female were individually examined; i.e., 244 eggs in total). The occurrence of maternal transmission was detected in all four tick species and in almost all eggs: *O. maritimus*—79 *Coxiella*-positive eggs out of 80, *R. sanguineus*—14 out of 14, *R. microplus*—68 out of 70, and *A. americanum*—80 of 80. The mean transmission rate can thus be estimated at 0.988 (95% confidence interval, 0.965–0.994), demonstrating highly efficient maternal transmission of *Coxiella* in ticks. Maternal inheritance is thus widespread in the *Coxiella* genera, being found in three different clades (A: *Coxiella*-like organism of *O. maritimus*; C: *R. sanguineus* and *R. microplus*; D: *A. americanum*).

Table 2. Genetic estimates for 85 *Coxiella*-like strains and for 15 *Coxiella burnetii* reference strains.

Locus	Function	L	Strains	N _i	P _{nsi}	N _a	P _s	A _d	π	D
16S rRNA	Small ribosomal subunit	1066	<i>Coxiella</i> -like organisms	85	93.0–100	40	262	0.985	0.038	39.960
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.7–100	4	4	0.552	0.001	1.224
23S rRNA	Large ribosomal subunit	496	<i>Coxiella</i> -like organisms	82	84.2–100	34	177	0.978	0.079	39.393
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.4–100	2	2	0.133	0.001	0.267
<i>GroEL</i>	Chaperone protein GROEL	550	<i>Coxiella</i> -like organisms	82	68.7–100	37	292	0.982	0.179	98.527
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.4–100	5	5	0.562	0.002	0.895
<i>rpoB</i>	DNA-directed RNA polymerase beta chain	474	<i>Coxiella</i> -like organisms	85	68.7–100	38	250	0.981	0.205	97.136
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.3–100	4	4	0.467	0.001	0.648
<i>dnaK</i>	Chaperone protein DNAK	423	<i>Coxiella</i> -like organisms	74	69.6–100	33	227	0.979	0.177	75.789
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.8–100	3	1	0.362	0.001	0.381
Full concatenated data set		3009	<i>Coxiella</i> -like organisms	71	81.8–100	36	1139	0.984	0.115	346.990
			<i>Coxiella burnetii</i>	15	99.6–100	7	16	0.781	0.001	2.933

Analyses are based on nucleotide sequences of five housekeeping genes, excluding sites with alignment gaps and/or missing data. L, sequence fragment length in base pairs; N_i, Number of examined strains; P_{nsi}, Pairwise nucleotide sequence identity (%); N_a, number of alleles; P_s, number of polymorphic sites; A_d, allelic diversity; π, nucleotide diversity; D, average number of nucleotide differences between sequences.

doi:10.1371/journal.ppat.1004892.t002

Differences in metabolic requirements of *Coxiella*-like organisms and *C. burnetii*

We next compared the metabolic requirements of *Coxiella*-like organisms with those of *C. burnetii* by assessing their ability to replicate in both an axenic medium ACCM2 (mimicking the environment of the acidified lysosome-like vacuoles of phagocytes typically colonized by *C. burnetii*; [35]) and directly inside vertebrate host cells. First, ACCM2 was inoculated with *Coxiella*-like organisms extracted from eggs of either *O. maritimus*, *R. microplus* or *A. americanum*. Inoculated media were incubated for 10 days under standard conditions used to amplify *C. burnetii*. Although our *C. burnetii* positive controls readily replicated in the media, the *Coxiella* obtained from eggs of the three tick species did not grow. We then incubated egg homogenates from ticks of *O. maritimus* and *R. microplus* with mammalian cell cultures for seven days. Similar to results under axenic conditions, the incubation of vertebrate cell lines with *Coxiella*-like organisms failed to produce *Coxiella*-containing vacuoles, whereas the same cell lines incubated with *C. burnetii* under the same conditions were readily infected. The apparent inability to amplify tick-borne *Coxiella* through standardized protocols, well-characterized for *C. burnetii*, suggests that, despite their phylogenetic proximity, the *Coxiella*-like bacteria are adapted to radically different environments.

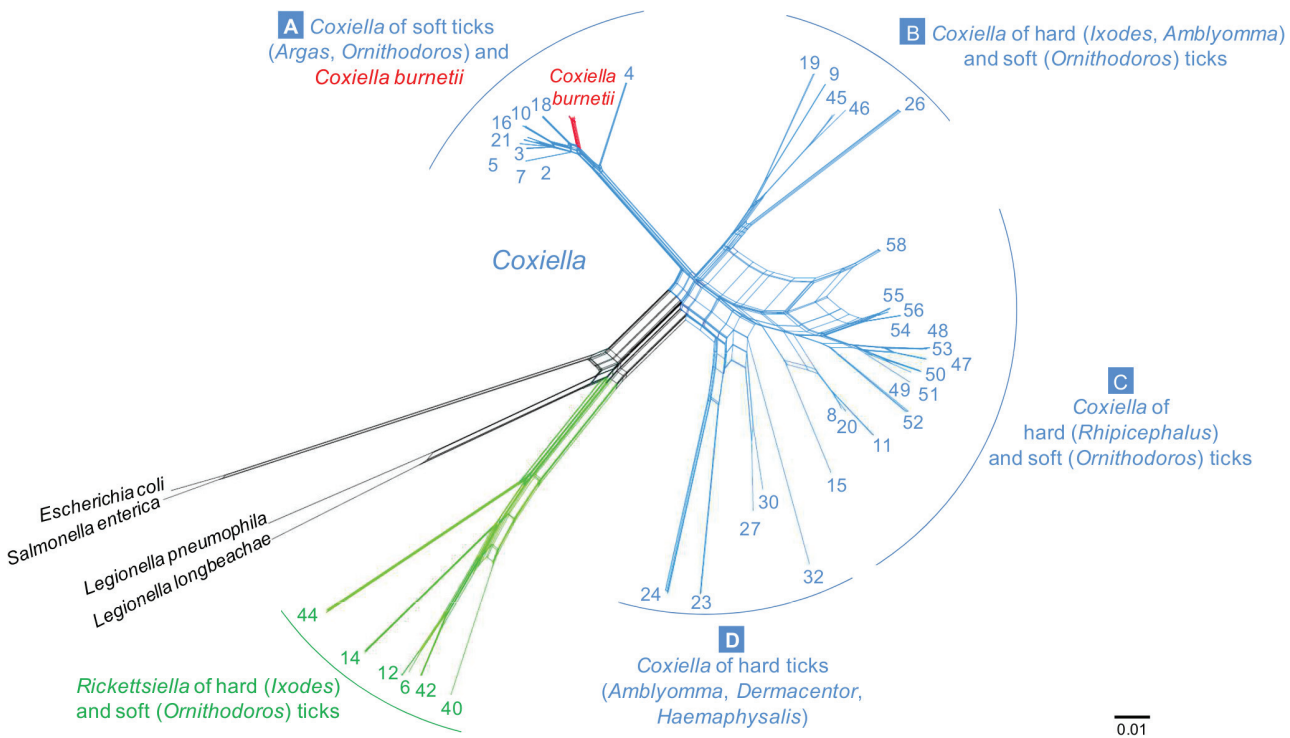


Fig 2. Phylogenetic network with concatenated 16S rRNA, 23S rRNA, *GroEL*, *rpoB* and *dnaK* sequences (3009 unambiguously aligned bp), including 71 *Coxiella*-like strains of ticks, 15 *C. burnetii* reference strains, and bacterial outgroups. The four *Coxiella* clades are labeled A to D. A zoom on the A clade which contains *C. burnetii* isolates is shown in Supplementary Fig C in S1 Text. Each number corresponds to one tick species as detailed in Table 1. Blue—*Coxiella*-like organisms; red—*C. burnetii*; green—*Rickettsiella*; black- other bacteria. All multi-locus typing of *Coxiella* and *Rickettsiella* of ticks are new sequences from this study. The scale bar is in units of substitution/site.

doi:10.1371/journal.ppat.1004892.g002

Discussion

Since its original description, *C. burnetii* infections have been characterized in a wide variety of hosts. While only two species have been formally identified within the *Coxiella* genus, we show here that a far greater diversity of *Coxiella* exists in ticks. We detect the presence of *Coxiella*-like organisms in many more tick species than previously known [17,18,19,20,21,22,23,24,25] and describe a far wider genetic diversity among these bacteria than previously suspected. The incidence of *Coxiella*, as well as of its sister genus *Rickettsiella*, in ticks is exceptionally high, with approximately three quarters of tick species infected. Although possible tick-borne transmission of *C. burnetii* has been reported [1,2,8], none of the 43 new *Coxiella* genotypes identified here are identical to *C. burnetii*. We also demonstrate for genetically divergent *Coxiella* strains (i.e., members of the A, C and D clades) found in four tick species that infection is primarily transmitted maternally via the egg cytoplasm. These results converge to support the hypothesis that these *Coxiella*-like organisms are specific endosymbionts of ticks. Phylogenetic evidence further shows that one of the *Coxiella*-like organisms belonging to the A clade and primarily hosted by soft ticks has served as the progenitor of *C. burnetii*.

Three complementary lines of argument indicate a much longer evolutionary history for *Coxiella*-tick associations than for vertebrate-*Coxiella* associations. The first lies in the broad distribution of *Coxiella* and *Rickettsiella* bacteria across tick species, genera and families. The second concerns the extensive genetic diversity found in tick-borne *Coxiella* strains compared to *C. burnetii* strains, as illustrated by the clear subdivision of this genus into four highly divergent clades

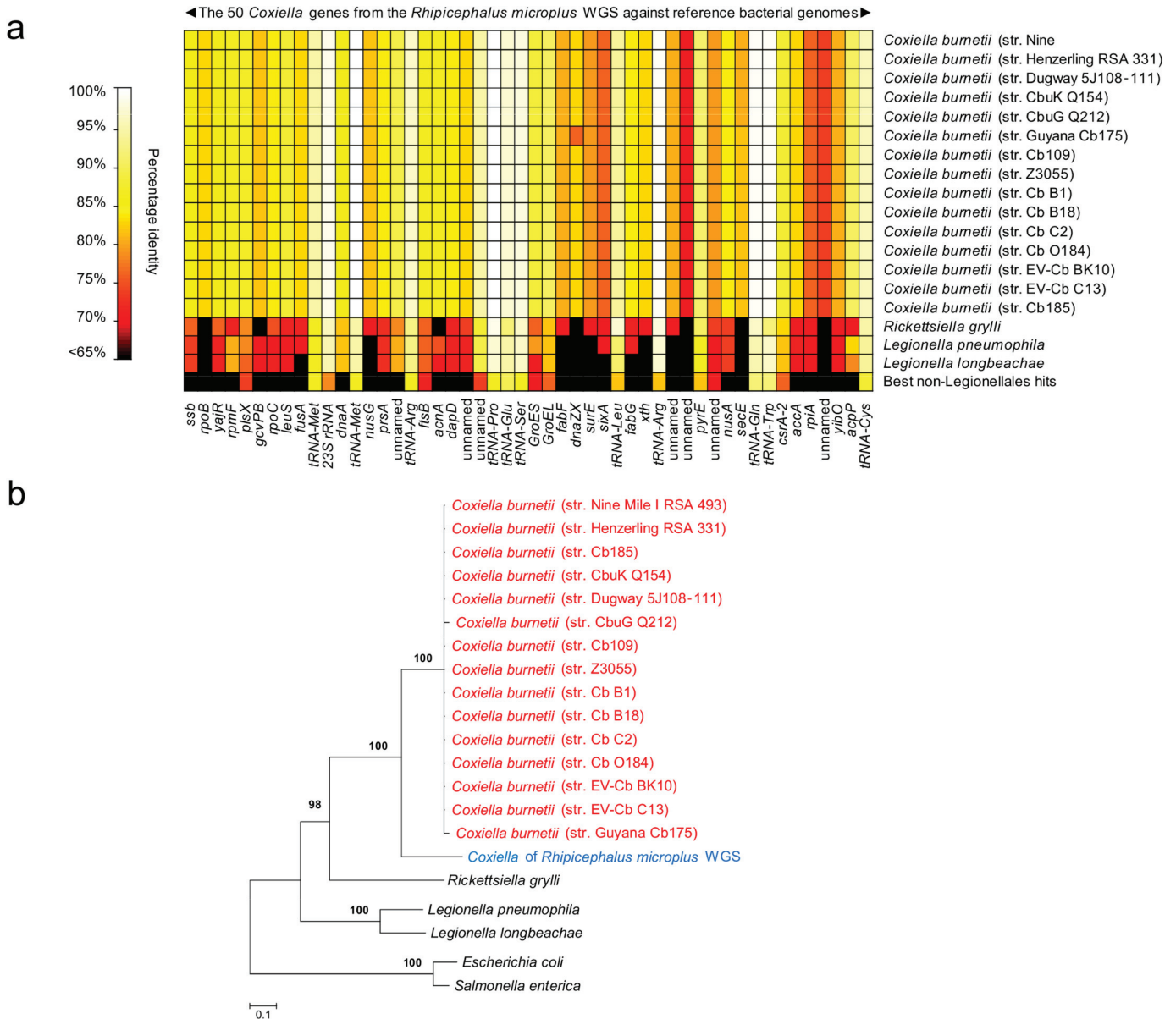


Fig 3. Characterization of new *Coxiella* strains derived from whole-genome sequencing (WGS) of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. (a) Percent identity of 50 genes uniquely attributable to *Coxiella* from *R. microplus* WGS versus 15 sequenced *C. burnetii* genomes and other reference genomes. (b) Bacterial phylogeny, comprising the *Coxiella* found in the *R. microplus* WGS data, reconstructed from the concatenated sequences of Fig 3A (19,304 unambiguously aligned bp) using maximum-likelihood (ML). Branch numbers indicate percent bootstrap support for major branches (1,000 replicates; only bootstrap values >90% are shown). The scale bar is in units of substitution/site.

doi:10.1371/journal.ppat.1004892.g003

(A-D). Finally, the clustering of all *C. burnetii* strains within one of the clades of tick-borne *Coxiella* shows that the ancestor of *C. burnetii* was a tick-associated bacterium which succeeded in infecting vertebrate cells. The remarkably low genetic diversity of *C. burnetii*, previously noted in other studies [36,37], indicates a unique and recent emergence of this highly infectious vertebrate pathogen. Interestingly, this hypothesis was initially raised a decade ago from observations of the profound differences in genome architecture of *C. burnetii* relative to other pathogenic intracellular bacteria [38]. It was again emphasized from the genome sequencing of new *C. burnetii*

strains [39]. Our data brings further support to this hypothesis by demonstrating that *C. burnetii* roots within the *Coxiella* phylogeny. Comparative genome sequences of *C. burnetii* [38, 39] and of the *Coxiella*-like organism from *A. americanum* [16] also suggest that *Coxiella* bacteria differ substantially in terms of genome size and gene content. The *C. burnetii* genome (A clade) has a size of ca 2Mb [38, 39], whereas the genome of the *Coxiella*-like organism isolated in *A. americanum* (D clade) is only about a 1/3 of this size (ie. 0.66 Mb) with a large percentage of missing genes [16]. This reduction in genome size may limit the transition to pathogenicity, and suggests that some *Coxiella*-like organisms may have evolved towards exclusive and irreversibly specialized interactions with their tick hosts. Overall, the diversity of genome sizes emphasizes that members of the different *Coxiella* clades may have retained a variety of evolutionary strategies to favour their spread and persistence in their hosts.

We identified *Coxiella* as a major emerging clade of bacterial endosymbionts allied to ticks. *Coxiella*-like organisms are maternally-transmitted through the egg cytoplasm at high frequency with 98–100% mother-to-offspring transmission, a pattern also reported in previous studies [20,21,26]. This transmission pattern is the rule for a variety of bacterial endosymbionts that live exclusively within arthropod cells [28,29,40]. While some, like *Wolbachia*, are globally common symbionts estimated to infect ca. 40% of insect species [41,42], others are globally rare, but common and important in particular arthropod groups [28]. This is precisely the case for *Coxiella*-like organisms; although they have not been found in other arthropod species, they are commonly associated with ticks. This leads to the obvious question of the phenotypic consequences of *Coxiella*-tick interactions. In some cases, *Coxiella*-like organisms of ticks likely act as obligate mutualistic symbionts required to support normal tick development, potentially provisioning their hosts with essential nutrients absent in vertebrate blood [16,20,21,26,27]. The ubiquity of *Coxiella* in some tick groups—such as in the *Rhipicephalus* genus in which infection is at fixation—corroborates the hypothesis of an obligate endosymbiont. This is not, however, the case for all tick species since some, such as *I. ricinus* and *I. uriae*, harbour *Coxiella*-like organisms at much lower frequencies. In these tick species, *Coxiella* is more likely to behave as a conditional mutualist—i.e., that confers advantages under certain environmental conditions—or as a reproductive parasite—i.e., that manipulates host reproduction toward the production of daughters (the transmitting sex), as commonly observed in arthropods with a variety of facultative symbionts [28,40]. It should also be noted that other endosymbionts also occur in ticks and may have evolved under complex multispecific interactions [17,24]. For instance, whereas the soft tick *O. moubata* was not found to be infected by a *Coxiella*-like organism in the present study, this tick species has been found to be infected by an endosymbiont belonging to the *Francisella* genus [17]. Endosymbionts other than *Coxiella* may thus interact with ticks, a pattern suggesting that endosymbiotic systems can be dynamic across tick lineages. These different hypotheses will now require specific testing.

Another question remains concerning the degree of vertebrate infection risk by the *Coxiella*-like organisms of ticks. Ticks are found worldwide and blood-feed on many different hosts; a combination of traits that may facilitate tick-to-vertebrate transfers of *Coxiella*. However, the bacteria observed in this study seem confined to ticks and, to our knowledge, none have ever been isolated from a vertebrate or associated with clinical symptoms. This suggests that these tick-associated bacteria currently pose a much lower infection risk to vertebrates than *C. burnetii*. As discussed above, the genome reduction of the *Coxiella*-like organism isolated in *A. americanum*, with the lack of nearly all the genes associated with pathogenicity [16], corroborates this view. Moreover, the inability to grow tick-borne bacteria in vertebrate cells highlights the significant barrier that must be overcome by the bacteria to successively achieve tick-to-vertebrate transmission. This type of transmission may, nonetheless, occasionally occur; an avian *Coxiella*-like organism was recently reported to induce fatal systemic

infections in domestic birds [43,44,45]. A very similar infection pattern was found for another maternally inherited endosymbiont, *Arsenophonus*, a widespread bacterium in different insect groups [41,46,47,48,49]. In particular, some *Arsenophonus* strains were detected in the phloem of plants fed on by infected phytophagous insects and were assumed to be opportunistic plant pathogens [50]. In such cases, the plant host may act as an ecological arena for the global exchange of endosymbionts like *Arsenophonus*, serving as a possible intermediate host for the horizontal transfer of bacteria among insect species [48]. In the case of *Coxiella*-like organisms, the extent of exchange between different tick species via the vertebrate host is yet to be established, but could be favoured by tick co-feeding (ticks feeding in close proximity on the host). The genetic similarity between *Coxiella*-like organisms found in unrelated tick species highlights the capacity to shift tick host species. Future research is now needed to assess the potential of different *Coxiella*-like organisms to infect vertebrates.

The reasons why *C. burnetii* is a highly virulent pathogen of vertebrates, but not *Coxiella*-like organisms (especially those from the A clade) remain unknown. As an intracellular pathogen with airborne transmission, *C. burnetii* has evolved specific mechanisms to survive in the abiotic environment, as well as to infect and exploit vertebrate cells [15]. Several evolutionary pathways may explain the acquisition of the genetic material necessary for this major lifestyle transition; this includes spontaneous genetic mutations in the genome of a tick-*Coxiella* ancestor, or the more likely transfer and integration of virulence genes from a co-infecting pathogen. The opportunity of gene transfer among bacteria, irrespective of their pathogenic or symbiotic properties, relies on their frequent co-occurrence within the same tick host [25,51,52]. The *Coxiella*-like organisms of the A clade may have dynamic genomes as observed in many arthropod symbionts: although they reside in confined intracellular environments, arthropod symbionts commonly experience variable degrees of recombination and gene transfer [53,54,55,56,57]. These gene transfers have served as immediate and powerful mechanisms of rapid adaptation in many endosymbionts, such as *Wolbachia* [56] and *Hamiltonella* [55,57]. This mechanism may explain the evolutionary transition from a *Coxiella* tick-symbiont of the A clade to the vertebrate pathogen *C. burnetii*. Other genetic connections are also possible; several *C. burnetii* genes that may contribute to major virulence traits, such as tissue tropism, are similar to eukaryotic genes and may have been acquired through lateral gene transfers from eukaryotes [38,39]. Detailed studies of virulence genes in *C. burnetii* and their homology with *Coxiella*-like organisms of the A clade will now be necessary to understand the remarkable emergence of the Q fever agent.

The evolutionary transition observed within the *Coxiella* genus is one of the rare cases reported to date of an arthropod-inherited symbiont evolving metabolic adaptations leading to the emergence of a vertebrate infectious disease. Another such transition occurred in the *Rickettsia* genus. The best-known members of this genus are transmitted by blood-feeding arthropods and are pathogenic in the vertebrate host. However, in recent years, many maternally-inherited *Rickettsia* endosymbionts found exclusively in arthropods have been discovered [58,59]. The examination of the evolutionary history of the *Rickettsia* genus revealed that this bacterium originated from endosymbionts of invertebrates and only secondarily became vertebrate pathogens [58,59]. Like *Coxiella*, some *Rickettsia* species of blood-feeding hosts have undergone a horizontal transmission through a vertebrate host, leading to pathogen emergence. Other bacteria, such as *Arsenophonus* [47,48] and *Sodalis* [60] may have had similar life cycle transitions, but the case of *Coxiella* is unique in that the arthropod host is no longer required to complete its life cycle.

In conclusion, we show that *C. burnetii* arose from a rare and recent event: the evolutionary transformation of a maternally inherited endosymbiont of ticks into a specialized and virulent pathogen of vertebrates. This raises a series of exciting questions related to both how *Coxiella*

endosymbionts made the major evolutionary transition leading to the emergence of Q fever and their role in the population dynamics of ticks. Identifying the evolutionary processes that transform symbiotic bacteria into emerging pathogens will require further exploration into the biology of the entire *Coxiella* genus.

Methods

Tick collection

The examined specimens represent the two main tick families, nine genera, 58 species and 112 populations from around the world (Table 1). Field specimens were sampled on various host species belonging to major mammal and bird families or from their habitats. We also used specimens from laboratory colonies reared in captivity for at least three generations for six tick species (derived from field specimens collected in North America, South America, Africa and China). All samples were preserved in 70–90% ethanol at room temperature until use. Before storage, tick eggs collected under laboratory conditions were surface-sterilized with 2.6% sodium hypochlorite and 0.5% SDS for 1 min and washed with sterile water to avoid external bacterial contamination.

Coxiella screening and typing

Tick DNA was individually extracted using the DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) following manufacturer instructions. DNA template quality was systematically verified by PCR amplification of the 18S ribosomal RNA (18S rRNA) or the cytochrome oxidase 1 (*CO1*) arthropod primers (Table A in S1 Text). Tick DNA samples were then tested for *Coxiella* presence using a nested PCR assay and sequencing of the *rpoB* gene using *Coxiella*-specific primers. The use of nested PCR was efficient at decreasing the probability of contamination from unwanted amplification products. Additional PCR assays on the 16S rRNA, 23S rRNA, *GroEL* and *dnaK* genes were conducted on a subsample of *Coxiella*-positive tick DNA to obtain additional DNA sequences for phylogenetic analyses. We used 15 recently published genomes of *C. burnetii* (mainly isolated from humans and ruminants) and the genome of *Rickettsiella grylli* from woodlice (listed in Table B in S1 Text) as references to design PCR primers. The efficiency of our typing method was ascertained through positive PCR amplification and clear sequences for the five loci in four cultured reference strains of *C. burnetii* (Table B in S1 Text). Gene features, primers and PCR conditions are detailed in Table A in S1 Text. All PCR products were visualized through electrophoresis in a 1.5% agarose gel. Positive PCR products were purified and sequenced in both directions (EUROFINS). The chromatograms were manually inspected and cleaned with CHROMAS LITE (http://www.technelysium.com.au/chromas_lite.html) and sequence alignments were done using CLUSTALW [61], both implemented in MEGA [62].

Coxiella sequences were also searched for in the whole genome sequence (WGS) data of *R. microplus* and *I. scapularis* (GenBank accession numbers ADMZ02000000 and ABJB000000000, respectively) using the 1,995,281 bp *C. burnetii* genome (str. Nine Mile I RSA 493, GenBank accession number NC002971) as a probe and the Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) with default parameters. Table C in S1 Text reports the number and content of *Coxiella* contigs that were detected in the *R. microplus* WGS data.

Molecular and phylogenetic analyses

The GBLOCKS program [63] with default parameters was used to remove poorly aligned positions and to obtain non-ambiguous sequence alignments. Sequences of individual genes that differed by one or more nucleotides were assigned distinct allele numbers using DNASP [64],

with the option of excluding sites with alignment gaps and/or missing data. Tick-borne *Coxiella* strains are defined as each unique combination of alleles. The genetic diversity estimates (P_s , number of polymorphic sites; A_d , allelic diversity; π , nucleotide diversity; D , average number of nucleotide differences between sequences) were computed using DNASP. Other statistical analyses were carried out using the R statistical package. All sequence alignments were checked for putative recombinant regions using the GENECONV [65] and RDP [66] methods available in the RDP3 computer analysis package [67].

Phylogenetic analyses were based on single and concatenated sequences of the five bacterial genes used in the multi-locus typing scheme and on the 50 *Coxiella* genes found in the *R. microplus* WGS data. Sequence alignments included *Coxiella* and *Rickettsiella* sequences obtained in this study from tick DNA, as well as sequences available in GenBank from reference strains of *C. burnetii*, *Rickettsiella grylli*, *Legionella pneumophila*, *L. longbeachae*, and two more distantly related bacteria, *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* (Table B in [S1 Text](#)). The evolutionary models fitting the sequence data most closely were determined using the Akaike information criterion with the program MEGA. For each data set examined, the best-fit approximation was the general time reversible model with gamma distribution and invariant sites (GTR+G+I). Network-based phylogenetic analyses were done using SplitsTree, implementing the evolutionary model under the agglomerating NeighborNet algorithm [68]. Tree-based phylogenetic analyses were done using maximum-likelihood (ML) analyses. A ML heuristic search using a starting tree obtained by neighbor-joining was conducted in MEGA. Clade robustness was assessed by bootstrap analysis using 1,000 replicates.

Culture assays

We first assessed the ability of tick-borne *Coxiella* to replicate in an axenic medium as follows. Tick eggs were surface-sterilized as described above and homogenized by hand in sterile water. Eggs homogenates were used to inoculate 2ml of the axenic medium ACCM2 [35] and incubated three days in a humidified atmosphere of 5% CO₂ and 2.5% O₂ at 37°C. 50µl of each culture were then diluted in 2ml of fresh ACCM2 and further incubated under the same conditions for 10 days to assess bacterial growth. We then assessed the ability of tick-borne *Coxiella* to replicate inside vertebrate host cells as follows. Surface-sterilized tick eggs were homogenized by hand in 1 ml of 10% Foetal Bovine Serum (FBS) supplemented MEM medium (GIBCO). The homogenate (0.5 ml) was diluted in 25 ml of 10% SVF-MEM and centrifuged at 4000 rpm (2000g) at 4°C for 30 min. Ten ml of the supernatant was mixed with 10 ml of 10% FSB-MEM and again centrifuged at 2000g at 4°C for 30 min. Ten ml of the supernatant was harvested and filtered through a sterile 0.45 µm pore size filter (MILLIPORE). Two flasks containing confluent Sheep Foetal Thymus cells (SFT) cells were inoculated with 5 ml of the obtained filtrate and incubated at 35°C and allowed to grow for 12 weeks. Cell culture flasks were observed daily for the presence of contamination or growth signs such as vacuoles containing *Coxiella*, during the first week then once a week. As a positive control, a homogenate of *C. burnetii* was used following the same protocol.

Accession codes

Nucleotide sequences of PCR-amplified fragments of tick-borne *Coxiella* and *Rickettsiella* genes have been deposited in the GenBank nucleotide database under accession codes KP994768-KP994862 (16S rRNA), KP994678-KP994767 (23S rRNA), KP985445-KP985537 (*GroEL*), KP985265-KP985357 (*rpoB*) and KP985358-KP985444 (*dnaK*).

Supporting Information

S1 Text. Table A. Genes and primers used in polymerase chain reaction (PCR) assays to detect *Coxiella* and relatives and to control tick DNA quality. The same primers were used for the *Coxiella* and *Rickettsiella* typing, with the exception of the 16S rRNA gene for which different primers were designed for the two bacteria. Nested PCR amplifications (16S rRNA, 23S rRNA, *GroEL*, *rpoB* and *dnaK*) were performed as follows: the first PCR run with the external primers was performed in a 10 μ L volume containing 20–50 ng of genomic DNA, 3 mM of each dNTP (Thermo Scientific), 8 mM of MgCl₂ (Roche Diagnostics), 3 μ M of each primer, 1 μ L of 10 \times PCR buffer (Roche Diagnostics), and 0.5 U of Taq DNA polymerase (Roche Diagnostics). A 1- μ L aliquot of the PCR product from the first reaction was then used as a template for the second round of amplification. The second PCR was performed in a total volume of 25 μ L and contained 8 mM of each dNTP (Thermo Scientific), 10 mM of MgCl₂ (ThermoScientific), 7.5 μ M of each of the internal primers, 2.5 μ L of 10 \times PCR buffer (Thermo Scientific), and 1.25 U of Taq DNA polymerase (Thermo Scientific). Non-nested PCR amplifications (CO1 and 18S rRNA) were performed following conditions similar to the first PCR run used in the nested PCR assays. All PCR amplifications were performed under the following conditions: initial denaturation at 93°C for 3 min, 35 cycles of denaturation (93°C, 30 s), annealing (T_m = 50–56°C, depending on primers, 30 s), extension (72°C, 1–2 min), and a final extension at 72°C for 5 min. **Table B.** List, biological features and GenBank accession numbers of the bacterial strains used as references in molecular and phylogenetic analyses.* reference strains of *C. burnetii* used for primer testing. **Table C.** List, sequence accession numbers and features of the 31 *Coxiella* contigs from the whole-genome shotgun sequencing (WGS) of the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. **Fig A.** Map of the *Coxiella burnetii* genome (strain Nine Mile I RSA 493) showing the position of the genetic markers (in blue) used in this study. The arrows indicate the position along the chromosome of the five housekeeping genes (16S rRNA, 23S rRNA, *GroEL*, *rpoB* and *dnaK*) used in the multi-locus typing of tick-borne *Coxiella* infections. The numbered boxes (1–31) indicate the position of the 31 *Coxiella* contigs (listed in Table C in S1 Text) detected from the whole genome sequencing of the hard tick *Rhipicephalus microplus*. **Fig B.** *Coxiella* and *Rickettsiella* phylogeny constructed using maximum-likelihood (ML) estimations based on 16S rRNA, 23S rRNA, *GroEL*, *rpoB* and *dnaK* concatenated sequences (3009bp), including 71 *Coxiella*-like strains of ticks, 15 *C. burnetii* reference strains and outgroups. The four *Coxiella* clades are labeled A to D. Each number corresponds to one tick species as detailed in Table 1. Blue, *Coxiella*-line organisms; red, *C. burnetii*; green, *Rickettsiella*; black, other bacteria. All multi-locus typing of tick-borne *Coxiella* and *Rickettsiella* of ticks are new sequences from this study. Branch numbers indicate percentage bootstrap support for major branches (1000 replicates; only bootstrap values >90% are shown). **Fig C.** Inset of *Coxiella* network from Fig 2 with focus on the A clade (*Coxiella* of soft ticks and *C. burnetii*). Each number corresponds to one tick species as detailed in Table 1. Blue, *Coxiella*-line organisms; red, *C. burnetii*. The scale bar is in units of substitution/site. (DOCX)

Acknowledgments

We are grateful to X. Bailly, A. Barbour, L. Beati, T. Boulinier, J.L. Chapuis, F. Dantas-Torres, A. Estrada-Peña, M. Gauthier-Clerc, L. Gern, D. González Acuña, J. Gonzalez-Solis, U. Guidon, A. Guglielmone, K. Hansford, M. Hipfner, A. Jaeger, D. Jenny, M. Labruna, R. Lane, M.S. Latrofa, C. Lebarbenchon, J. Liu, J. Medlock, S. Nava, A.C. Norte, U.E. Schnepapat, D. Spratt, P.

Tortosa and M. Vittecoq for help at different stages of this work, and to three anonymous reviewers for helpful comments and suggestions.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OD CC. Performed the experiments: OD VN JC OM. Analyzed the data: OD CC. Contributed reagents/materials/analysis tools: OD VN KDM MB KSB OM FV LZ EJ PD CA FR JFT ASB JC MDi EL AA MDu EGD GD GKD HA SZ LV CC. Wrote the paper: OD KDM CC.

References

1. Madariaga MG, Rezai K, Trenholme GM, Weinstein RA. Q fever: a biological weapon in your backyard. *Lancet Infect Dis.* 2003; 3: 709–721. PMID: [14592601](#)
2. Raoult D, Marrie T, Mege J. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infect Dis.* 2005; 5: 219–226. PMID: [15792739](#)
3. Vanderburg S, Rubach MP, Halliday JE, Cleaveland S, Reddy EA, Crump JA. Epidemiology of *Coxiella burnetii* infection in Africa: a OneHealth systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014; 8: e2787. doi: [10.1371/journal.pntd.0002787](#) PMID: [24722554](#)
4. Angelakis E, Raoult D. Q Fever. *Vet Microbiol.* 2010; 140: 297–309. doi: [10.1016/j.vetmic.2009.07.016](#) PMID: [19875249](#)
5. Bewley KR. Animal models of Q fever (*Coxiella burnetii*). *Comp Med.* 2013; 63: 469–476. PMID: [24326221](#)
6. van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, Schneeberger PM, Vellema P, Wijkmans C, et al. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill* 2010; 15.
7. Russell-Lodrigue KE, Andoh M, Poels MWJ, Shive HR, Weeks BR, Zhang GQ, et al. *Coxiella burnetii* isolates cause genogroup-specific virulence in mouse and guinea pig models of acute Q fever. *Infect Immun.* 2009; 77: 5640–5650. doi: [10.1128/IAI.00851-09](#) PMID: [19786560](#)
8. McDade JE. Historical aspects of Q fever. In: Marie TJ, editor. *Q Fever Volume 1: The Disease*. Boca Raton: CRC Press; 1990. pp. 5–21.
9. Oyston PC, Davies C. Q fever: the neglected biothreat agent. *J Med Microbiol.* 2011; 60: 9–21. doi: [10.1099/jmm.0.024778-0](#) PMID: [21030501](#)
10. Weisburg WG, Dobson ME, Samuel JE, Dasch GA, Mallavia LP, Baca O, et al. Phylogenetic diversity of the Rickettsiae. *J Bacteriol.* 1989; 171: 4202–4206. PMID: [2753854](#)
11. Leclerque A, Kleespies RG. Type IV secretion system components as phylogenetic markers of entomopathogenic bacteria of the genus *Rickettsiella*. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008; 279: 167–173. doi: [10.1111/j.1574-6968.2007.01025.x](#) PMID: [18179586](#)
12. Bouchon D, Cordaux R, Grève P. *Rickettsiella*, intracellular pathogens of arthropods. In: Zchori-Fein E, Bourtzis K, editors. *Manipulative Tenants*. Boca Raton: CRC Press; 2012. pp. 127–148.
13. Tsuchida T, Koga R, Horikawa M, Tsunoda T, Maoka T, Matsumoto S, et al. Symbiotic bacterium modifies aphid body color. *Science* 2010; 330: 1102–1104. doi: [10.1126/science.1195463](#) PMID: [21097935](#)
14. Tan CK, Owens L. Infectivity, transmission and 16S rRNA sequencing of a rickettsia, *Coxiella cheraxi* sp. nov., from the freshwater crayfish *Cherax quadricarinatus*. *Dis Aquat Organ.* 2000; 41: 115–122. PMID: [10918979](#)
15. van Schaik EJ, Chen C, Mertens K, Weber MM, Samuel JE. Molecular pathogenesis of the obligate intracellular bacterium *Coxiella burnetii*. *Nat Rev Microbiol.* 2013; 11: 561–573. doi: [10.1038/nrmicro3049](#) PMID: [23797173](#)
16. Smith TA, Driscoll T, Gillespie JJ, Raghavan R. A *Coxiella*-like Endosymbiont is a potential vitamin source for the Lone Star Tick. *Genome Biol Evol.* 2015; 7: 831–838. doi: [10.1093/gbe/evv016](#) PMID: [25618142](#)
17. Noda H, Munderloh UG, Kurtti TJ. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. *Appl Environ Microbiol.* 1997; 63: 3926–3932. PMID: [9327557](#)
18. Almeida AP, Marcili A, Leite RC, Nieri-Bastos FA, Domingues LN, Ricardo Martins J, et al. *Coxiella* symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks Tick Borne Dis.* 2012; 3: 203–206. doi: [10.1016/j.ttbdis.2012.02.003](#) PMID: [22480930](#)

19. Duron O, Jourdain E, McCoy KD. Diversity and global distribution of the *Coxiella* intracellular bacterium in seabird ticks. *Ticks Tick Borne Dis.* 2014; 5: 557–563. doi: [10.1016/j.ttbdis.2014.04.003](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.04.003) PMID: [24915875](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24915875/)
20. Klyachko O, Stein BD, Grindle N, Clay K, Fuqua C. Localization and visualization of a *Coxiella*-type symbiont within the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 6584–6594. PMID: [17720830](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17720830/)
21. Machado-Ferreira E, Dietrich G, Hojgaard A, Levin M, Piesman J, Zeidner NS, et al. *Coxiella* symbionts in the Cayenne tick *Amblyomma cajennense*. *Microb Ecol.* 2011; 62: 134–142. doi: [10.1007/s00248-011-9868-x](https://doi.org/10.1007/s00248-011-9868-x) PMID: [21611689](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21611689/)
22. Lalar I, Harrus S, Mumcuoglu KY, Gottlieb Y. Composition and seasonal variation of *Rhipicephalus turanicus* and *Rhipicephalus sanguineus* bacterial Communities. *Appl Environ Microbiol.* 2012; 78: 4110–4116. doi: [10.1128/AEM.00323-12](https://doi.org/10.1128/AEM.00323-12) PMID: [22467507](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22467507/)
23. Jasinskas A, Zhong J, Barbour AG. Highly prevalent *Coxiella* sp. bacterium in the tick vector *Amblyomma americanum*. *Appl Environ Microbiol.* 2007; 73: 334–336. PMID: [17085709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17085709/)
24. Clay K, Klyachko O, Grindle N, Civitello D, Oleske D, Fuqua C. Microbial communities and interactions in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. *Mol Ecol.* 2008; 17: 4371–4381. PMID: [19378409](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19378409/)
25. Wilkinson DA, Dietrich M, Lebarbenchon C, Jaeger A, Le Rouzic C, Lagadec E, et al. Massive infection of seabird ticks with bacterial species related to *Coxiella burnetii*. *Appl Environ Microbiol.* 2014; 80: 3327–3333. doi: [10.1128/AEM.00477-14](https://doi.org/10.1128/AEM.00477-14) PMID: [24657860](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24657860/)
26. Lalar I, Friedmann Y, Gottlieb Y. Tissue tropism and vertical transmission of *Coxiella* in *Rhipicephalus sanguineus* and *Rhipicephalus turanicus* ticks. *Environ Microbiol.* 2014; 16: 3657–3668. doi: [10.1111/1462-2920.12455](https://doi.org/10.1111/1462-2920.12455) PMID: [24650112](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24650112/)
27. Zhong J, Jasinskas A, Barbour AG. Antibiotic treatment of the tick vector *Amblyomma americanum* reduced reproductive fitness. *PLoS One.* 2007; 2: e405. PMID: [17476327](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17476327/)
28. Moran NA, McCutcheon JP, Nakabachi A. Genomics and evolution of heritable bacterial symbionts. *Annu Rev Genet.* 2008; 42: 165–190. doi: [10.1146/annurev.genet.41.110306.130119](https://doi.org/10.1146/annurev.genet.41.110306.130119) PMID: [18983256](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18983256/)
29. Wernegreen JJ. Endosymbiosis. *Curr Biol.* 2012; 22: R555–561. doi: [10.1016/j.cub.2012.06.010](https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.06.010) PMID: [22835786](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22835786/)
30. Hosokawa T, Koga R, Kikuchi Y, Meng XY, Fukatsu T. *Wolbachia* as a bacteriocyte-associated nutritional mutualist. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2010; 107: 769–774. doi: [10.1073/pnas.0911476107](https://doi.org/10.1073/pnas.0911476107) PMID: [20080750](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20080750/)
31. Akman L, Yamashita A, Watanabe H, Oshima K, Shiba T, Hattori M, et al. Genome sequence of the endocellular obligate symbiont of tsetse flies, *Wigglesworthia glossinidia*. *Nat Genet.* 2002; 32: 402–407. PMID: [12219091](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12219091/)
32. Husnik F, Chrudimsky T, Hypsa V. Multiple origins of endosymbiosis within the Enterobacteriaceae (gamma-Proteobacteria): convergence of complex phylogenetic approaches. *BMC Biol.* 2011; 9: 87. doi: [10.1186/1741-7007-9-87](https://doi.org/10.1186/1741-7007-9-87) PMID: [22201529](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22201529/)
33. Gomez-Valero L, Rusniok C, Buchrieser C. *Legionella pneumophila*: population genetics, phylogeny and genomics. *Infect Genet Evol.* 2009; 9: 727–739. doi: [10.1016/j.meegid.2009.05.004](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2009.05.004) PMID: [19450709](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19450709/)
34. Leclerque A, Kleespies RG. A *Rickettsiella* bacterium from the hard tick, *Ixodes woodi*: molecular taxonomy combining multilocus sequence typing (MLST) with significance testing. *PLoS One.* 2012; 7: e38062. doi: [10.1371/journal.pone.0038062](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038062) PMID: [22675436](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22675436/)
35. Omsland A, Beare PA, Hill J, Cockrell DC, Howe D, Virtaneva K, et al. Isolation from animal tissue and genetic transformation of *Coxiella burnetii* are facilitated by an improved axenic growth medium. *Appl Environ Microbiol.* 2011; 77: 3720–3725. doi: [10.1128/AEM.02826-10](https://doi.org/10.1128/AEM.02826-10) PMID: [21478315](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21478315/)
36. Sekeyová Z, Roux V, Raoult D. Intraspecific diversity of *Coxiella burnetii* as revealed by *com1* and *mucZ* sequence comparison. *FEMS Microbiol Lett.* 1999; 180: 61–67. PMID: [10547445](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10547445/)
37. Pearson T, Hornstra HM, Sahl JW, Schaack S, Schupp JM, Beckstrom-Sternberg SM, et al. When outgroups fail; phylogenomics of rooting the emerging pathogen, *Coxiella burnetii*. *Syst Biol.* 2013; 62: 752–762. doi: [10.1093/sysbio/syt038](https://doi.org/10.1093/sysbio/syt038) PMID: [23736103](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23736103/)
38. Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, Read TD, Nelson KE, Nelson WC, et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen *Coxiella burnetii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2003; 100: 5455–5460. PMID: [12704232](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12704232/)
39. Beare PA, Unsworth N, Andoh M, Voth DE, Omsland A, Gilk SD, et al. Comparative genomics reveal extensive transposon-mediated genomic plasticity and diversity among potential effector proteins within the genus *Coxiella*. *Infect Immun.* 2009; 77: 642–656. doi: [10.1128/IAI.01141-08](https://doi.org/10.1128/IAI.01141-08) PMID: [19047403](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19047403/)

40. Engelstadter J, Hurst GDD. The ecology and evolution of microbes that manipulate host reproduction. *Annu Rev Ecol Evol Syst.* 2009; 40: 127–149.
41. Duron O, Bouchon D, Boutin S, Bellamy L, Zhou L, Engelstadter J, et al. The diversity of reproductive parasites among arthropods: *Wolbachia* do not walk alone. *BMC Biol.* 2008; 6: 27. doi: [10.1186/1741-7007-6-27](https://doi.org/10.1186/1741-7007-6-27) PMID: [18577218](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18577218/)
42. Zug R, Hammerstein P. Still a host of hosts for *Wolbachia*: analysis of recent data suggests that 40% of terrestrial arthropod species are infected. *PLoS One.* 2012; 7: e38544. doi: [10.1371/journal.pone.0038544](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038544) PMID: [22685581](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22685581/)
43. Shivaprasad HL, Cadenas MB, Diab SS, Nordhausen R, Bradway D, Crespo R, et al. *Coxiella*-like infection in psittacines and a toucan. *Avian Dis.* 2008; 52: 426–432. PMID: [18939630](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18939630/)
44. Woc-Colburn AM, Garner MM, Bradway D, West G, D'Agostino J, Trupkiewicz J, et al. Fatal coxiellosis in Swainson's Blue Mountain Rainbow Lorikeets (*Trichoglossus haematodus moluccanus*). *Vet Pathol.* 2008; 45: 247–254. doi: [10.1354/vp.45-2-247](https://doi.org/10.1354/vp.45-2-247) PMID: [18424842](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18424842/)
45. Vapniarsky N, Barr BC, Murphy B. Systemic *Coxiella*-like infection with myocarditis and hepatitis in an eclectus parrot (*Eclectus roratus*). *Vet Pathol.* 2012; 49: 717–722. doi: [10.1177/0300985811409251](https://doi.org/10.1177/0300985811409251) PMID: [21712515](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21712515/)
46. Duron O, Wilkes TE, Hurst GDD. Interspecific transmission of a male-killing bacterium on an ecological timescale. *Ecol Lett.* 2010; 13: 1139–1148. doi: [10.1111/j.1461-0248.2010.01502.x](https://doi.org/10.1111/j.1461-0248.2010.01502.x) PMID: [20545734](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20545734/)
47. Duron O, Schnepat UE, Berthomieu A, Goodman SE, Droz B, Paupy C, et al. Origin, acquisition and diversification of heritable bacterial endosymbionts in louse flies and bat flies. *Mol Ecol.* 2014; 23: 2105–2017. doi: [10.1111/mec.12704](https://doi.org/10.1111/mec.12704) PMID: [24612422](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24612422/)
48. Jousset E, Coeur d'Acier A, Vanlerberghe-Masutti F, Duron O. Evolution and diversity of *Arsenophonus* endosymbionts in aphids. *Mol Ecol.* 2013; 22: 260–270. doi: [10.1111/mec.12092](https://doi.org/10.1111/mec.12092) PMID: [23106652](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23106652/)
49. Novakova E, Hypsa V, Moran NA. *Arsenophonus*, an emerging clade of intracellular symbionts with a broad host distribution. *BMC Microbiol.* 2009; 9: 143. doi: [10.1186/1471-2180-9-143](https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-143) PMID: [19619300](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19619300/)
50. Bressan A. Emergence and evolution of *Arsenophonus* bacteria as insect-vectoring plant pathogens. *Infect Genet Evol.* 2014; 22: 81–90. doi: [10.1016/j.meegid.2014.01.004](https://doi.org/10.1016/j.meegid.2014.01.004) PMID: [24444593](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24444593/)
51. Benson MJ, Gawronski JD, Eveleigh DE, Benson DR. Intracellular symbionts and other bacteria associated with deer ticks (*Ixodes scapularis*) from Nantucket and Wellfleet, Cape Cod, Massachusetts. *Appl Environ Microbiol.* 2004; 70: 616–620. PMID: [14711698](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14711698/)
52. van Overbeek L, Gassner F, van der Plas CL, Kastelein P, Nunes-da Rocha U, Takken W. Diversity of *Ixodes ricinus* tick-associated bacterial communities from different forests. *FEMS Microbiol Ecol.* 2008; 66: 72–84. doi: [10.1111/j.1574-6941.2008.00468.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2008.00468.x) PMID: [18355299](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18355299/)
53. Duron O. Lateral transfers of insertion sequences between *Wolbachia*, *Cardinium* and *Rickettsia* bacterial endosymbionts. *Heredity* 2013; 111: 330–337. doi: [10.1038/hdy.2013.56](https://doi.org/10.1038/hdy.2013.56) PMID: [23759724](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23759724/)
54. Baldo L, Werren JH. Revisiting *Wolbachia* supergroup typing based on WSP: spurious lineages and discordance with MLST. *Curr Microbiol.* 2007; 55: 81–87. PMID: [17551786](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17551786/)
55. Degnan PH, Moran NA. Evolutionary genetics of a defensive facultative symbiont of insects: exchange of toxin-encoding bacteriophage. *Mol Ecol.* 2008; 17: 916–929. doi: [10.1111/j.1365-294X.2007.03616.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2007.03616.x) PMID: [18179430](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18179430/)
56. Nikoh N, Hosokawa T, Moriyama M, Oshima K, Hattori M, Fukatsu T. Evolutionary origin of insect-*Wolbachia* nutritional mutualism. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014; 111: 10257–10262. doi: [10.1073/pnas.1409284111](https://doi.org/10.1073/pnas.1409284111) PMID: [24982177](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24982177/)
57. Duron O. *Arsenophonus* insect symbionts are commonly infected with APSE, a bacteriophage involved in protective symbiosis. *FEMS Microbiol Ecol.* 2014; 90: 184–194. doi: [10.1111/1574-6941.12381](https://doi.org/10.1111/1574-6941.12381) PMID: [25041857](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25041857/)
58. Perlman SJ, Hunter MS, Zchori-Fein E. The emerging diversity of *Rickettsia*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 2006; 273: 2097–106.
59. Weinert LA, Werren JH, Aebi A, Stone GN, Jiggins FM. Evolution and diversity of *Rickettsia* bacteria. *BMC Biol.* 2009; 7: 6. doi: [10.1186/1741-7007-7-6](https://doi.org/10.1186/1741-7007-7-6) PMID: [19187530](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19187530/)
60. Clayton AL, Oakeson KF, Gutin M, Pontes A, Dunn DM, von Niederhausern AC, et al. A novel human-infection-derived bacterium provides insights into the evolutionary origins of mutualistic insect–bacterial symbioses. *PLoS Genet.* 2012; 8: e1002990. doi: [10.1371/journal.pgen.1002990](https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002990) PMID: [23166503](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23166503/)
61. Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. *Curr Protoc Bioinformatics* 2002; 2: 3. doi: [10.1002/0471250953.bi0203s00](https://doi.org/10.1002/0471250953.bi0203s00) PMID: [18792934](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18792934/)
62. Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* 2004; 5: 150–163. PMID: [15260895](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15260895/)

63. Castresana J. Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Mol Biol Evol.* 2000; 17: 540–552. PMID: [10742046](#)
64. Librado P, Rozas J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 2009; 25: 1451–1452. doi: [10.1093/bioinformatics/btp187](#) PMID: [19346325](#)
65. Sawyer SA. GENECONV: A computer package for the statistical detection of gene conversion. <http://www.math.wustl.edu/~sawy>.
66. Martin D, Rybicki E. RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics.* 2000; 16: 562–563. PMID: [10980155](#)
67. Martin D, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefevvre P. RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics.* 2010; 26: 2462–2463. doi: [10.1093/bioinformatics/btq467](#) PMID: [20798170](#)
68. Huson DH, Bryant D. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol.* 2006; 23: 254–267. PMID: [16221896](#)