



Dialogue moléculaire des virus de l'encéphalite à tique et louping ill avec leur vecteur tique *Ixodes ricinus*

Manon Lemasson

► To cite this version:

Manon Lemasson. Dialogue moléculaire des virus de l'encéphalite à tique et louping ill avec leur vecteur tique *Ixodes ricinus*. Médecine humaine et pathologie. Université Paris-Est, 2021. Français. NNT : 2021PESC0039 . tel-03670384

HAL Id: tel-03670384

<https://theses.hal.science/tel-03670384>

Submitted on 17 May 2022

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

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

Thèse de doctorat
pour obtenir le grade de Docteur délivré par
L'Université Paris-Est Sup

Ecole doctorale Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité Biologie Cellulaire et Moléculaire

Thèse présentée et soutenue publiquement par
Manon LEMASSON

Le vendredi 22 janvier 2021 à Maisons-Alfort

Dialogue moléculaire
des virus de l'encéphalite à tique et louping ill
avec leur vecteur tique *Ixodes ricinus*

Directrice de thèse : **Jennifer RICHARDSON**
Encadrante de thèse : **Sandrine LACOUR**

Composition du jury :

M. Pierre-Yves LOZACH, Directeur de recherche, INRAE

M. Alain KOHL, Professeur, Université de Glasgow

Mme Nolwenn JOUVENET, Directrice de recherche, Institut Pasteur

M. Claude RISPE, Chargé de recherche, INRAE

Mme Jennifer RICHARDSON, Directrice de recherche, INRAE

Mme Sandrine LACOUR, Chargée de projet recherche, ANSES

Rapporteur

Rapporteur

Examinatrice

Présidente du jury

Examineur

Directrice de thèse

Encadrante de thèse

REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier les membres de mon Jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse : **Pierre-Yves Lozach** et **Alain Kohl** qui ont accepté de relire le manuscrit. **Nolwenn Jouvenet** et **Claude Rispe** pour avoir accepté d'être examinateurs le jour de ma soutenance de thèse.

Je tiens à remercier les membres de mon comité de thèse, **Carla Saleh** et **Nolwenn Jouvenet**, pour avoir suivi ce travail de thèse depuis le début et avoir suggéré différentes pistes de réflexion. J'espère que les collaborations initiées par ce projet de thèse se pérenniseront et feront l'objet de belles publications.

Je remercie très chaleureusement l'équipe de direction de l'UMR Virologie, **Stéphan, Nicole, Bernard** et **Jennifer** de m'avoir accueilli au sein de l'unité dès le stage de Master 2. Ça a été un plaisir de travailler au sein d'une unité où l'ambiance professionnelle et bon enfant est de mise.

Un immense merci **Sandrine**, mon encadrante de thèse, pour ta disponibilité sans faille au cours des 3 dernières années. Merci pour la confiance que tu m'as accordée et les conseils que tu as pu m'apporter. Merci pour les nérissons même si je ne suis pas certaine que ça améliore mon niveau de calcul mental. Je te souhaite plein de réussite et de financements pour les projets qui arrivent.

Merci beaucoup **Jennifer**, ma directrice de thèse, pour tes encouragements et ton aide notamment lors de la rédaction de l'article et du manuscrit. J'espère avoir suivi tes conseils au mieux pour donner un peu plus d'envergure au projet de thèse. Un seul mot d'ordre désormais : objectif Barabási. Yes, we can !

Merci **Marion** pour ton dynamisme et la fraîcheur que tu as apportés au sein de l'équipe ThAI. J'espère de tout cœur que tu décrocheras ce poste de CR (maintenant que la rédaction est finie, je peux croiser les doigts). J'espère qu'on aura l'occasion de fêter ça autour d'une bonne Brooklyn. Je te souhaite de continuer à t'éclater dans la recherche scientifique. Merci **Yves** pour ton aide dans la mise au point du « Gap Repair » notamment, les levures n'auront bientôt plus de secrets pour toi.

Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'UMR pour ces 3 belles années passées à vos côtés. Merci pour les échanges et discussions scientifiques que nous avons pu avoir, j'ai beaucoup appris et j'essayerais de mettre à profit ces connaissances et ce savoir-faire dans le futur. Je tiens également à vous remercier tout autant pour les échanges informels que nous avons eus et les liens humains que nous avons pu tisser ; ils sont selon moi indispensables à l'épanouissement professionnel.

Un très très grand merci **Sylvie** ainsi qu'aux membres de ton équipe, **Cécile, Gaëlle, Rayane** et **Marine**, pour votre aide et le temps précieux que vous avez consacré à ma formation P3 et aux techniques de virologie. C'était un plaisir de partager avec vous toutes ces heures en combinaison à Icube ZO.

Merci **Damien**, pour ta gentillesse, tes encouragements et pour ces petites discussions sur le sport. A quand l'UTMB ? Merci **Sophie** pour tes anecdotes vétérinaires, je ne m'en lasse pas. **Greg**, le papa du double-hybride au labo, merci pour ton aide sur cette technique et tes conseils au cours de la thèse et

pour l'après. Si tu décides finalement d'utiliser les levures pour monter une brasserie fais-moi signe !
Merci **Sandra** pour tes encouragements et pour le partage de sucreries aux moments stratégiques. Je te souhaite une belle coordination du projet ICRAD. Merci **Marielle, François, Fleur, Fao, Muriel** et **Hélène** pour ces quelques mots échangés en BM ou dans les couloirs de Bressou, toujours un plaisir.

A mes collègues doctorantes **Manon D, Lise, Camille, Manon B** et **Juliette**. Je vous souhaite bon courage pour vos thèses respectives, accrochez-vous, n'oubliez pas de prendre du plaisir dans ce que vous faites. Merci d'avoir apporté un peu (beaucoup) de verdure au bureau des docs, d'avoir adopté notre bien aimé Bettadine, prenez soin de lui/elle (as you like). Qu'il/elle vous apporte paix et sérénité au labo. Merci pour les afterworks au Poisson Lune, les échanges sur les 2^{-ΔΔCt}, biorender et graphpad.

Un grand merci **Marie**, pour tout ! Ton optimisme, ta bonne humeur communicative, ton soutien dans la dernière ligne droite, nos fous rires et nos sorties en tous genres. Arrivées au même moment à Bressou et pourtant on a mis le temps... Je te souhaite du fond du cœur le meilleur au sein de l'unité mais aussi en dehors ! Reste cette belle personne que j'ai eu la chance de rencontrer.

Merci aux viro girls : **Bahia** pour ton aide dans la gestion administrative de la thèse ET pour tes pâtisseries à couper le souffle. J'espère que tu resteras dans l'unité mais sinon le food truck « chez Bahia » fera une parfaite reconversion. Merci **Lauren** pour permettre au labo de tourner et pour tes récits affectueux sur Odile et Hariette. **Aurore**, ma collègue breizh 100% pur beurre, avec qui ça a été un plaisir de discuter course à pieds et tour du Mont-Blanc entre autres.

Merci à **Houssam** et à **Lesley Bell-Sakyi** pour les lignées cellulaires de tique et la banque d'ADNc ainsi que pour les échanges constructifs que nous avons pu avoir, notamment lors de la rédaction de l'article. Merci **Baptiste** pour ton aide lors de la constitution des différents milieux de cultures de cellules de tique, tout un art cette préparation.

Merci aux collègues du côté Bachelard avec qui c'est toujours un plaisir d'échanger quelques mots sur le campus ou lors d'événements conviviaux. Merci pour votre sympathie.

Je remercie aussi **Sara** et **Ladislav**, nos collègues de l'UMR BIPAR, pour leur générosité et leur aide dans l'infection des tiques.

Merci à **Lionel Frangeul** et à **Hervé Blanc** de l'équipe de **Carla Saleh** à l'Institut Pasteur pour le séquençage des petits ARN et l'analyse des résultats.

Une pensée pour les anciens de l'UMR :

A **Léa**, la 3^e sardine pailletée, toujours dispo pour un verre ou un goûter. J'espère pouvoir venir te faire un coucou à Glasgow si un certain coronavirus arrête de faire des siennes. **Anne**, j'espère que ton nouveau travail à l'Institut Pasteur te plaira. **Steeve**, pour les conseils sérieux et films mais aussi pour le pot de départ le plus génial au monde, indétrônable ! (Bon, dommage que ça ait été pour ton départ). A **Mazigh, Cindy, Marie P** et **Eugénie**, nos chemins se sont croisés dans le bureau des docs et je garde des bons souvenirs des pauses café et des afterworks au Clin's.

A mes camarades du M2 viro de Pasteur : **Sarah, Alex et Emeline**. Merci pour les délires en TP, pour les soirées jeux de société interminables (T'as de la potion ?). Vous êtes dingues et j'adore ça. Ne changez rien !

Aux bretons **A-L, Coco, Juju, Mélindi, Flo, Tiff, Rodo, Pti Ju, Jean-Jean, Quent, Brendan et Mamat**, merci d'être vous, des amis sincères et fidèles depuis le lycée maintenant. Une troupe d'amis tellement différents, du chef cuisinier à la conseillère financière en passant par le menuisier, la docteure en bio-imagerie ou l'éducateur spé, et pourtant le partage de beaux moments continuent de nous rassembler. Que ça continue encore et encore... Merci pour la livraison de cookies et de chaussettes pilou dans la dernière ligne droite de la rédaction, merci pour les apéro-skype qui ont permis de surmonter le confinement dans mon 20m² sans fenêtres, merci, merci, merci !

A ma **famille**, oui oui vous tous les cousines, cousins, tantes, oncles et mamy, j'adresse un grand merci ! Le premier qui dit UN tique, ça va barder, vous n'avez plus aucunes excuses maintenant. A ma **sœurette**, merci pour tout ! Mes **parents**, merci pour vos encouragements et votre soutien inépuisables mais surtout de m'avoir transmis le goût d'être curieuse de la vie.

J'en oublie sûrement, mais du fond du cœur je vous adresse à toutes et à tous un grand merci !

RESUME

Dialogue moléculaire des virus de l'encéphalite à tique et louping ill avec leur vecteur tique *Ixodes ricinus*

A l'échelle mondiale, l'émergence de maladies virales transmises par les tiques est en nette augmentation depuis le début du XXI^e siècle. En Europe, la tique est le premier arthropode capable de transmettre la plus large variété de pathogènes à l'homme et à l'animal. *Ixodes ricinus*, espèce de tique majoritairement représentée en Europe, transmet notamment les virus de l'encéphalite à tique (TBEV) et louping ill (LIV), responsables de méningo-encéphalites respectivement chez l'homme et les moutons. Bien que la transmission de ces virus par la tique soit connue depuis près d'une centaine d'années, les mécanismes permettant à la tique de répliquer et transmettre les virus à un hôte sont encore méconnus. Aussi, une meilleure compréhension du dialogue moléculaire entre le virus et son vecteur est un prérequis majeur dans la lutte contre les maladies vectorielles.

Le premier objectif de ce projet de thèse a été d'identifier les interactions protéiques établies par TBEV et LIV avec leur vecteur *I. ricinus*. En ce sens, une cartographie des interactions entre les protéines de TBEV, de LIV et celles d'*I. ricinus* a été établie et a révélé que les protéines de TBEV et LIV interagissaient avec différents modules protéiques des cellules de tique tels que des voies de signalisation contrôlant la transduction de signaux, la transcription, la dégradation protéique et des fonctions du cytosquelette. La tique, quant à elle, met en place des moyens de lutte afin de limiter l'impact du virus sur ses traits de vie. Cette lutte se traduit notamment par l'initiation et le maintien d'une réponse immunitaire. Le second objectif était ainsi d'explorer la réponse ARN interférence (voie antivirale décrite comme majeure des arthropodes) d'*I. ricinus* lors de l'infection à TBEV et à LIV. Le séquençage des petits ARNs issus de cellules de tique infectées par TBEV et LIV et de tiques vivantes infectées par TBEV a montré qu'*I. ricinus* produisaient des petits ARNs de 22 nucléotides à partir des ARNs viraux.

Le rôle des protéines de tiques interagissant avec TBEV et LIV, ainsi que celui d'acteurs de l'immunité antivirale, dans le cycle viral sera appréhendé par l'inactivation de leur expression.

Ce sujet de thèse initie un programme de recherche qui vise à élucider les mécanismes moléculaires de la compétence vectorielle d'*I. ricinus* pour les virus qu'elle transmet, dans le but de prédire la transmission d'autres arbovirus par cette même tique afin d'anticiper leurs émergences en Europe.

Mots clés : TBEV, LIV, *Ixodes ricinus*, interactions protéine – protéine, ARNi

ABSTRACT

Molecular dialogue between tick-borne encephalitis virus and louping ill virus with their tick vector, *Ixodes ricinus*

The emergence of tick-borne viral diseases has sharply increased since the beginning of the twenty-first century. Among arthropod vectors present in Europe, ticks transmit the greatest variety of pathogens to humans and animals. *Ixodes ricinus*, the most abundant tick species in Europe, transmits the tick-borne encephalitis and louping ill viruses, responsible for meningoencephalitis in humans and sheep, respectively. Although transmission of these virus was first described almost a century ago, the mechanisms that allow viral replication in the tick and subsequent transmission to vertebrate hosts are as yet poorly understood. Thus, better understanding of the molecular dialogue between virus and vector is a major prerequisite in the fight against vector-borne viruses.

The first objective of the thesis was to identify protein-protein interactions (PPIs) established between TBEV and LIV with their vector *I. ricinus*. In this regard, a map of PPI was generated and revealed that proteins of TBEV and LIV interact with multiple protein modules of tick cells that are involved in critical biological processes, such as signal transduction, transcription, protein degradation and cytoskeletal function. Within ticks, means are deployed to limit the impact of the virus on the tick's life cycle. This struggle is notably manifested by the initiation and maintenance of an immune response.

The second objective was to explore the RNA interference (RNAi) response – a major antiviral immune mechanism in arthropods – elicited in the tick *I. ricinus* upon infection with TBEV and LIV. To this end, sequencing of small RNAs generated in tick cells infected with TBEV and LIV and in TBEV-infected ticks showed that *I. ricinus* produced small RNAs of 22 nucleotides in length derived from genomic viral RNA. The functional role of tick proteins that interact with TBEV and LIV – as well as that of critical components of antiviral immunity pathway – in the viral life cycle will be addressed in future studies by knockdown of gene expression.

The results of the thesis contribute to elucidating the molecular mechanisms that underpin the vector competence of *I. ricinus* for the viruses it transmits, with a view to illuminating transmission of other arboviruses by the same tick species, and with the ultimate objective of improving anticipation of emergence of tick-borne viruses in Europe.

Keywords: TBEV, LIV, *Ixodes ricinus*, protein-protein interaction, RNAi

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	3
RESUME	6
ABSTRACT	7
LISTE DES ABBREVIATIONS	13
LISTE DES FIGURES.....	17
LISTE DES TABLEAUX	19
LISTE DES ANNEXES	19
AVANT-PROPOS.....	20
INTRODUCTION	21
1. Virus transmis par les tiques ou TBV (Tick-Borne Viruses).....	21
1.1. TBV : une diversité virale sous-estimée	21
1.2. Les flavivirus transmis par les tiques.....	24
1.3. Le sérocomplexe TBEV	25
1.3.1. Le virus de l'encéphalite à tique.....	25
1.3.2. Le virus louping ill.....	26
1.4. Historique et épidémiologie de TBEV & LIV	27
1.5. Pathogenèse et réponse de l'hôte	29
1.6. Caractéristiques cliniques et pathologiques	31
1.6.1. Chez l'humain	31
1.6.1.1. Caractéristiques cliniques.....	31
1.6.1.2. Caractéristiques pathologiques.....	33
1.6.2. Chez l'animal	33
1.7. Vaccination et traitements.....	34
1.8. Génomique et organisation structurale.....	35
1.8.1. Caractéristiques et propriétés.....	35
1.8.2. Liaison au récepteur et entrée	36

1.8.3.	Traduction de la polyprotéine	38
1.8.3.1.	Les protéines structurales	40
1.8.3.1.1.	Protéine de capside C.....	40
1.8.3.1.2.	Protéine de prémembrane prM, précurseur de la protéine de membrane M..	41
1.8.3.1.3.	Protéine d'enveloppe E	41
1.8.3.2.	Les protéines non structurales	42
1.8.3.2.1.	Protéine NS1.....	42
1.8.3.2.2.	Protéines NS2A et NS2B	43
1.8.3.2.3.	Protéine NS3.....	43
1.8.3.2.4.	Protéines NS4A et NS4B	44
1.8.3.2.5.	Protéine NS5.....	44
1.8.4.	Réplication de l'ARN viral	44
1.8.5.	Assemblage et libération.....	45
2.	Le vecteur tique.....	47
2.1.	Importance sanitaire des tiques.....	47
2.2.	Taxonomie	47
2.3.	Biologie de la tique	48
2.3.1.	Rôles des hôtes vertébrés	48
2.3.2.	Stades de développement.....	49
2.3.3.	Rôle du repas sanguin	50
2.3.4.	Durée d'un cycle de vie	51
2.3.5.	Conditions environnementales et habitats.....	51
2.3.6.	Comportement de prédation de la tique	52
2.4.	La compétence vectorielle	52
2.4.1.	Définition.....	52
2.4.2.	<i>Ixodes ricinus</i> : un vecteur de TBEV et LIV.....	53
2.4.2.1.	Acquisition et maintien du virus par la tique	57
2.4.2.2.	Interactions tique-virus	58

2.4.2.3.	Transmission du pathogène de la tique à l'hôte mammifère	59
2.4.2.4.	Interactions tique-mammifère	59
2.4.3.	Autres agents pathogènes.....	61
2.4.4.	Microbiote des tiques.....	62
2.5.	Futurs défis dus aux changements climatiques	62
2.6.	Les moyens de luttés contre les tiques	65
3.	Immunité antivirale des arthropodes.....	67
3.1.	Les voies de l'ARN interférence (ARNi)	70
3.1.1.	Dicer et Argonaute	70
3.1.2.	siARN	70
3.1.3.	miARN.....	73
3.1.4.	piARN.....	75
3.2.	Réponses antivirales déclenchées par des voies de signalisation de l'immunité innée	77
3.2.1.	JAK/STAT.....	77
3.2.2.	Toll	79
3.2.3.	IMD	81
3.3.	Autres réponses antivirales	84
3.4.	Les supprimeurs viraux.....	85
	OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE	86
	RESULTATS.....	87
	Chapitre I : Interactions protéines-protéines de TBEV et LIV avec leur vecteur <i>I. ricinus</i>	87
1.	Exploration des interactions protéine-protéine de deux flavivirus transmis par les tiques avec leur vecteur <i>I. ricinus</i>	87
2.	Caractérisation de la banque d'ADNc d' <i>I. ricinus</i>	125
2.1.	Introduction.....	125
2.2.	Méthodes	125
2.2.1.	Lignées cellulaires d' <i>I. ricinus</i> et banque d'ADNc.....	125
2.2.2.	Extraction ARN.....	126

2.2.3.	RT-qPCR	126
2.3.	Résultats	126
2.4.	Conclusion et perspectives.....	128
Chapitre 2 : l'ARNi chez <i>I. ricinus</i>		130
1.	Introduction.....	130
2.	Matériel et Méthodes	130
2.1.	Culture cellulaire	130
2.2.	Production virale et titration.....	131
2.3.	Infections.....	132
2.4.	Les extractions d'ARN.....	132
2.5.	RT-qPCR	133
2.6.	Quantité de particules virales infectieuses	134
2.7.	Réaction de polymérisation en chaine par transcription inverse (RT-PCR)	134
2.8.	Purification des produits PCR	134
2.9.	Clonage en pGEM-T.....	135
2.10.	Transformation bactérienne	135
2.11.	Extraction d'ADN plasmidique et séquençage nucléotidique	135
2.12.	Digestion pGEM-T.....	136
2.13.	Synthèse des ARNdb par transcription <i>in vitro</i>	136
2.14.	Extinction de l'expression d'AGO2 et DCR2 à l'aide des ARNdb	137
2.15.	Isolement des petits ARN	137
2.16.	Séquençage des petits ARN et analyse	137
3.	Résultats.....	138
3.1.	Cinétiques d'infection	138
3.2.	Infections persistantes	141
3.3.	Séquençage des petits ARN suite à l'infection par TBEV et LIV des 3 lignées cellulaires d' <i>I. ricinus</i>	142
3.4.	Séquençage des petits ARN suite à l'infection par TBEV de tique <i>I. ricinus</i>	155

3.5. Inactivation de l'expression d'acteurs de l'ARNi.....	160
4. Discussion.....	162
DISCUSSION GENERALE.....	166
1. Le risque des maladies vectorielles.....	166
2. Les objectifs du projet de thèse	166
3. La tique : un modèle d'étude complexe.....	167
4. Les interactions virus-vecteur dans le cycle de vie du virus et de la tique	167
5. Les perspectives et impacts du projet.....	169
BIBLIOGRAPHIE.....	171
ANNEXES.....	204

LISTE DES ABBREVIATIONS

ADNc : ADN complémentaire

Ae. aegypti : *Aedes aegypti*

A. gambiae : *Anopheles gambiae*

AGO: protéine argonaute

AHFV : virus de la fièvre hémorragique d'Alkhurma

A. phagocytophilum : *Anaplasma phagocytophilum*

AP-1 : activator protein 1

ARMI : protéine armitage

ARNi : ARN interférence

ARNdb : ARN double-brin

ARNm : ARN messenger

ARNsb : ARN simple-brin

ASFV : virus de la peste porcine africaine

AUB : protéine aubergine

B. annulatus : *Boophilus annulatus*

B. microplus : *Boophilus microplus*

C : protéine de capside

CCHFV : virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo

CHIKV : virus chikungunya

CrPV : Virus de la paralysie du criquet

DCR : protéine dicer

DENV : virus de la dengue

DHOV : virus Dhori

D. marginatus : *Dermacentor marginatus*

D. reticulatus : *Dermacentor reticulatus*

D. melanogaster : *Drosophila melanogaster*

E : protéine d'enveloppe

E. coli : *Escherichia coli*

EYAV : virus Eyach

FADD : Fas-Associated protein with Death Domain

GGYV : virus Gadget Gully

GGEV : Greek goat encephalitis virus

Ha. anatolicum : *Haemaphysalis anatolicum*

Ha. concinna : *Haemaphysalis concinna*

Ha. Inermis : *Haemaphysalis Inermis*

Ha. longicornis : *Haemaphysalis longicornis*

Ha. punctata : *Haemaphysalis punctata*

H. sapiens : *Homo sapiens*

I κ B : protéine inhibitrice κ B

IMD : immune deficiency

I. arboricola : *Ixodes arboricola*

I. hexagonus : *Ixodes hexagonus*

I. persulcatus : *Ixodes persulcatus*

I. ricinus : *Ixodes ricinus*

I. scapularis : *Ixodes scapularis*

JAK : janus tyrosine kinase

KDV : virus Kadam

KEMV : virus Kemerovo

KFDV : virus de la forêt de Kyasanur

KSIV : virus Karshi

LGTV : virus Langat

LIV : virus louping ill

M: protéine de membrane

MBFV : mosquito-borne flavivirus

MDA5 : melanoma differentiation-associated protein 5

miARN: microARN

MIDWV : Midway nyavirus

NFκB : nuclear factor-kappa B

NS1 – 5 : protéine non structural 1 – 5

OHFV : virus de la fièvre hémorragique d'Omsk

ONNV : virus O'nyong-nyong

ORF : open reading frame

PAM : peptides antimicrobiens

PAMP : motifs moléculaires associés aux pathogènes

piARN : petits ARN associés à PIWI

POWV : virus Powassan

PPI : protein-protein interaction

prM : protéine de prémembrane

pré-miARN : précurseurs de miARN

pri-miARN : miARN primaires

PRR : récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires

RE : réticulum endoplasmique

RFV : virus de la fièvre royale

R. appendiculatus : *Rhipicephalus appendiculatus*

R. microplus : *Rhipicephalus microplus*

R. pravus : *Rhipicephalus pravus*

R. sanguineus : *Rhipicephalus sanguineus*

RIG-I : retinoic acid-inducible gene 1

RISC: RNA-induced silencing complex

sfARN : ARN sous-génomique de flavivirus

SFV : virus de la forêt de Semliki

siARN : small interfering RNA / petits ARN interférents

SINV : virus Sindbis

SNVV : Sierra Nevada nyavirus

SSEV : Spain sheep encephalitis virus

SOCS : suppressor of cytokine signaling

STAT : signal transducers and activators of transcription

TBEV : virus de l'encéphalite à tique

TBEV-Eu : sous-type européen de TBEV

TBEV-Fe : sous-type d'Extrême-Orient de TBEV

TBEV-Sib : sous-type sibérien de TBEV

TBFV : tick-borne flavivirus

TBV : tick-borne virus

THOV: virus Thogoto

TLR : toll-like receptor

TNF : tumor necrosis factor

TRAF : facteurs associés aux récepteurs de facteurs de nécrose tumorale

TSEV : Turkish sheep encephalitis virus

UUKV : virus Uukuniemi

WNV : virus West-Nile

Y2H : double-hybride en levure

YFV : Virus de la fièvre jaune

ZIKV : virus Zika

ZUC : protéine zucchini

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Taxonomie des virus transmis par les tiques	22
Figure 2. Distribution géographique approximative de TBEV, LIV, POWV, OHFV et KFDV	25
Figure 3. Répartition géographique approximative des différents sous-types de TBEV	26
Figure 4. Infection biphasique de l'infection à TBEV.....	30
Figure 5. Représentation schématique des différentes issues possibles suite à l'infection par TBEV..	32
Figure 6. Structure du virion de TBEV	36
Figure 7. Cycle de réplication de TBEV et LIV	38
Figure 8. Représentation schématique du génome de TBEV et LIV et structure de leur polyprotéine	39
Figure 9. Représentation schématique de la protéine E	42
Figure 10. Complexe de réplication.....	45
Figure 11. Maturation des particules de flavivirus.....	46
Figure 12. Classification systématique des tiques.....	48
Figure 13. Cycle biologique de la tique	49
Figure 14. Les différents stades évolutifs d' <i>Ixodes</i> spp.....	50
Figure 15. Les différentes étapes du repas sanguin.....	51
Figure 16. Compétence vectorielle d' <i>I. ricinus</i> pour un virus.....	52
Figure 17. Répartition d' <i>I. ricinus</i> en Europe en mai 2020 d'après ECDC	54
Figure 18. Répartition géographique mondiale des principales espèces de tique <i>Ixodes</i>	55
Figure 19. Rostre d' <i>I. ricinus</i> au microscope électronique à balayage (250x).....	60
Figure 20. Influence des facteurs biotiques et abiotiques sur les interactions tique – hôte – virus	64
Figure 21. Représentation schématique du cycle de vie d'un arbovirus chez la tique.....	68
Figure 22. Modèle simplifié des conditions d'infection optimales nécessaires à la transmission de virus par les tiques.	69
Figure 23. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des siARN chez les arthropodes..	72
Figure 24. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des miARN chez les arthropodes	75
Figure 25. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des piARN d'origine virale chez les insectes.....	76
Figure 26. Représentation schématique de la voie de signalisation JAK/STAT chez les arthropodes ..	78
Figure 27. Représentation schématique de la voie de signalisation Toll chez les arthropodes	80
Figure 28. Représentation schématique de la voie de signalisation IMD chez les arthropodes.....	82
Figure 29. Niveau d'expression des 22 interacteurs tiques dans chacune des 3 lignées cellulaires d' <i>I. ricinus</i>	128

Figure 30. Modélisation de l'infection des 3 lignées cellulaires d' <i>I. ricinus</i> par TBEV et LIV au cours du temps.....	139
Figure 31. Graphique synthétisant la modélisation au cours du temps de l'infection à TBEV et à LIV des 3 lignées cellulaires d' <i>I. ricinus</i>	140
Figure 32. Cinétique d'infection persistante de TBEV en cellules de tique.....	141
Figure 33. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE11 non infectées	146
Figure 34. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE11 infectées par TBEV	147
Figure 35. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE11 infectées par LIV	148
Figure 36. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM19 non infectées...	149
Figure 37. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM19 infectées par TBEV	150
Figure 38. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM19 infectées par LIV	151
Figure 39. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM20 non infectées...	152
Figure 40. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM20 infectées par TBEV	153
Figure 41. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM20 infectées par LIV	154
Figure 42. Résultats du séquençage des petits ARN issus du groupe de tiques <i>I. ricinus</i> non infectées	156
Figure 43. Résultats du séquençage des petits ARN issus du groupe de tiques <i>I. ricinus</i> T1/T2 infectées par TBEV	157
Figure 44. Résultats du séquençage des petits ARN issus du groupe de tiques <i>I. ricinus</i> T3/T4 infectées par TBEV	158
Figure 45. Quantité d'ARN viral et de particules infectieuses de TBEV dans les tiques infectées.....	159
Figure 46. Inactivation de l'expression de DCR2 et AGO2 dans les cellules IRE/CTVM19 au cours du temps en fonction de la quantité d'ARNdb utilisées	161

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Résumé des hôtes réservoirs de la tique <i>I. ricinus</i> , de TBEV et de LIV	57
Tableau 2. Principaux pathogènes transmis par <i>I. ricinus</i> , les maladies et leurs hôtes associés	61
Tableau 3. Méthodes d'extraction d'ARN utilisées selon l'application ultérieure	133
Tableau 4. Récapitulatif des données chiffrées issues du séquençage des petits ARNs des 3 lignées cellulaires d' <i>I. ricinus</i> en conditions non infectées ou infectées par TBEV et LIV	145

LISTE DES ANNEXES

Tableau 1. Caractéristiques principales des cellules utilisées lors de l'étude	204
Tableau 2. Caractéristiques du vecteur pGEM-T utilisé pour la synthèse des ARNdb	205
Tableau 3. Amorces et sondes utilisées pour quantifier la réplication virale de TBEV et LIV ainsi que les amorces utilisées pour le clonage en pGEM-T	205

AVANT-PROPOS

Les maladies vectorielles représentent 17 % des maladies infectieuses mondiales et tuent près de 700 000 personnes par an [1]. Ces maladies sont dues à différents pathogènes, virus, parasites ou bactéries, eux même transmis à l'homme et aux animaux par des vecteurs [1]. Les virus transmis par ces vecteurs à des animaux sont communément appelés des arbovirus pour « arthropod-borne viruses » et peuvent être définis par leur capacité à se maintenir dans un environnement donné grâce à une transmission biologique entre un hôte vertébré et un vecteur arthropode hématophage [2]. Il existe plus de 500 arbovirus actuellement dans le monde dont $\frac{1}{4}$ sont responsables de maladies humaines pouvant causer des fièvres hémorragiques ou des méningoencéphalites susceptibles d'entraîner la mort [3]. A l'échelle mondiale, le moustique est le principal vecteur de maladies infectieuses pour l'homme. Les principaux genres de moustiques, *Aedes*, *Anopheles* et *Culex* sont à l'origine de la transmission de pathogènes entraînant la mort de plus d'1 million de personnes chaque année [4]. A titre d'exemple, le virus de la dengue, transmis par les moustiques du genre *Aedes*, infecte entre 100 et 400 millions de personnes par an avec un taux de mortalité variant entre 2 et 4%. Les tiques forment quant à elles le premier vecteur d'agents pathogènes pour les animaux et le second pour les hommes au niveau mondial [5]. En outre, elles sont considérées en Europe comme les premiers vecteurs arthropodes, hommes et animaux confondus [6] et à l'origine de 77% des maladies vectorielles aux Etats-Unis [7].

INTRODUCTION

1. Virus transmis par les tiques ou TBV (Tick-Borne Viruses)

1.1. TBV : une diversité virale sous-estimée

D'après les connaissances actuelles, les virus transmis par les tiques sont représentés par une large variété d'espèces virales que l'on peut classer dans 9 familles différentes à savoir, les *Flaviviridae*, les *Nairoviridae*, les *Orthonairoviridae*, les *Peribunyaviridae*, les *Phenuiviridae*, les *Nyamiviridae*, les *Reoviridae*, les *Orthomyxoviridae* et les *Asfarviridae* (**Figure 1**) [8]. Bien que réparties dans un vaste nombre de familles et de genres viraux, certaines espèces virales ne peuvent à ce jour être classées dans des genres, familles ou ordres connus.

Les *Bunyavirales* constituent l'un des ordres viraux (**Figure 1**) dans lequel des virus transmis par les tiques sont classés. Ces virus sphériques enveloppés à ARN simple brin tri segmentés et de polarité négative sont pour la plupart associés à des maladies virales chez les vertébrés. Le virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo (CCHFV) constitue l'un des principaux représentants de cet ordre à ce jour et s'avère être le principal virus transmis par les tiques au niveau mondial [9]. Ce nairovirus induit des fièvres hémorragiques ayant un taux de mortalité variant entre 10% et 50% chez l'homme [10]. Cette fièvre hémorragique de Crimée a initialement été observée en 1945, lorsque 200 membres du personnel militaire soviétiques se sont retrouvés infectés après avoir aidé des paysans en Crimée à l'issue de la seconde guerre mondiale [11]. Le virus isolé quelques années plus tard, en 1967, se trouve alors être antigéniquement indistinguishable du virus Congo, isolé en 1956 à partir d'un patient dans l'ancien Congo Belge. La structure antigénique similaire conduit alors à nommer cet agent étiologique virus de la fièvre hémorragique de Crimée-Congo [11]–[13]. Plusieurs tiques appartenant à la famille des *Ixodidae* comme *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus rossicus* et *Dermacentor marginatus* semblent être les principaux vecteurs du CCHFV [14].

D'autres membres de l'ordre des *Bunyavirales*, appartenant au genre *Phlebovirus*, émergent et représentent une réelle menace de santé publique. On notera notamment le virus du syndrome de fièvre sévère avec thrombocytopénie (SFTSV) qui a émergé en Chine au début du XXI^{ème} siècle et dont le taux de mortalité peut s'élever à 50% [15] et le virus Heartland, qui a fait son apparition aux Etats Unis en 2009 [16]. Le virus Uukuniemi (UUKV), présent dans le Nord de l'Europe et qui n'induit a priori pas de signes cliniques chez l'homme, est ainsi un bon modèle d'étude de classe 2 pour ces virus émergents [17].

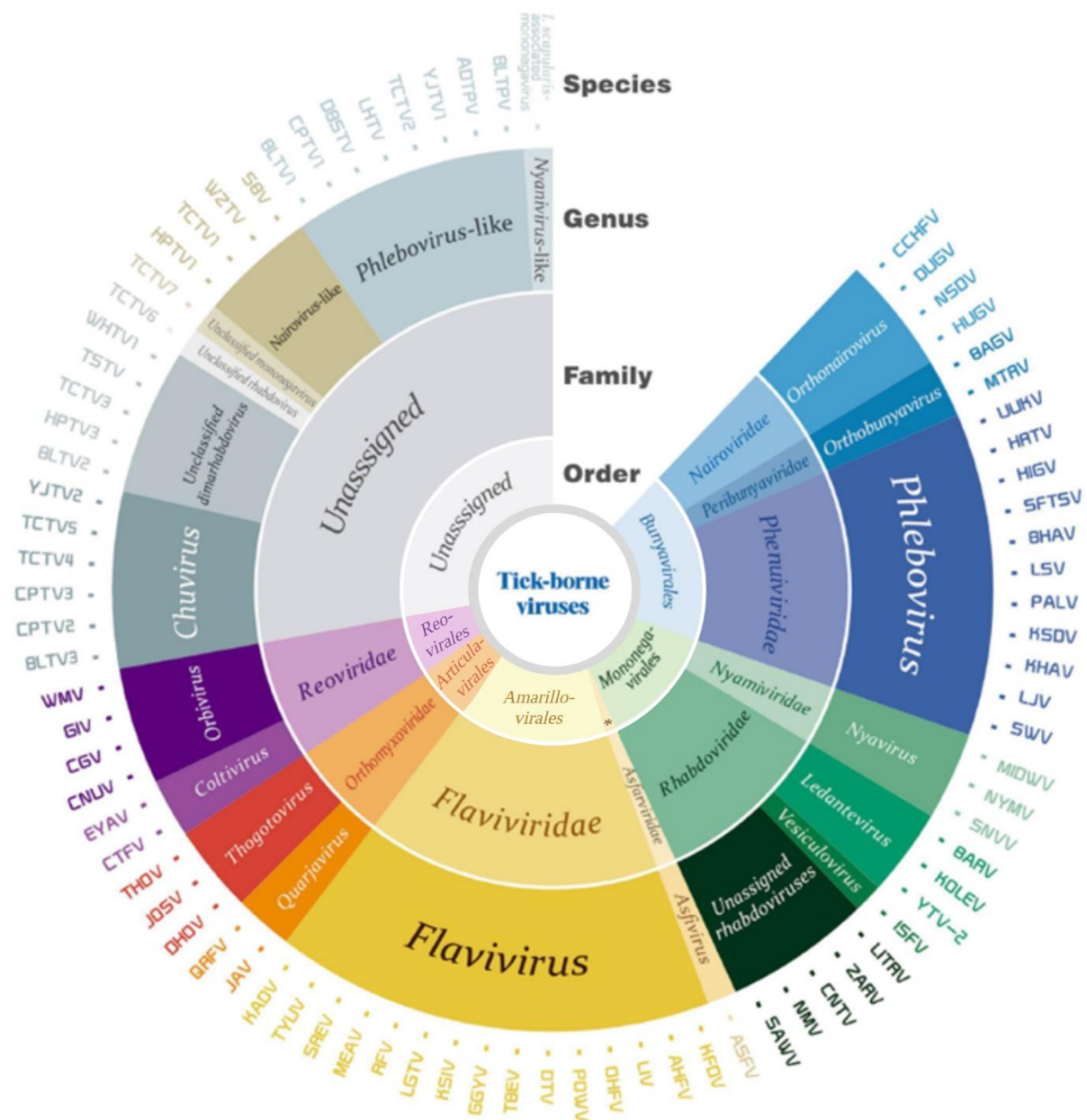


Figure 1. Taxonomie des virus transmis par les tiques

Classification des virus transmis par les tiques organisées par ordre, famille, genre et espèce. **Asfaviridae* (Adaptée de Shi et *al.*, 2018).

Les *Mononegavirales* représentent un second ordre viral (**Figure 1**) incluant des virus transmis par les tiques. Cet ordre, subdivisé en deux familles virales, se caractérise par des virus à ARN simple brin, linéaire, non segmenté et de polarité négative. Dans la famille des *Nyamiviridae*, seules trois espèces virales sont à ce jour connues ; Midway nyavirus (MIDWV), Nyamanini nyavirus (NYMV) et Sierra Nevada nyavirus (SNVV). Ces virus à la distribution géographique différente et au spectre d'hôtes variés sont essentiellement transmis par des tiques molles telles que *Ornithodoros* et *Argas*. MIDWV a été isolé à partir de tiques *Ornithodoros* spp. et des anticorps dirigés contre ce virus ont été retrouvés chez deux espèces d'oiseaux marins. NYMV a été identifié chez le héron (*Bubulcus ibis*) et à ce jour aucune maladie ou infection humaine due à NYMV n'a été rapportée. SNNV a été isolé à partir d'une tique du genre *Ornithodoros* et sa capacité à infecter des mammifères ou des oiseaux n'est pas connue. La famille des *Rhabdoviridae* est quant à elle constituée d'une grande variété d'espèces virales capables d'infecter de nombreux vertébrés, invertébrés et plantes [18]. Selon le rapport officiel de l'ICTV paru en 2018 [19], cette famille est constituée de 20 genres différents dont 3 comportent des virus transmis par les tiques ; *Ledantevirus*, *Vesiculovirus* et « *Unassigned* » *rhabdoviruses*.

Certaines familles virales comportant des virus transmis par les tiques sont rattachées à des ordres viraux récemment établis (**Figure 1**). C'est le cas de la famille des *Asfarviridae* qui appartient à l'ordre des *Asfuvirales*, la famille des *Reoviridae* est rattachée à l'ordre des *Reovirales*, la famille des *Orthomyxoviridae* appartient à l'ordre des *Articulavirales* et enfin les *Flaviviridae* font partie de l'ordre des *Amarillovirales*.

La famille des *Asfarviridae* présente la particularité de contenir un seul genre, les *Asfivirus*, et une seule espèce : le virus de la peste porcine africaine ou ASFV (African swine fever virus). Ce virus, principalement transmis par les tiques molles du genre *Ornithodoros*, est à ce jour le seul virus à ADN transmis par les tiques. Bien qu'éradiqué d'Europe dans les années 90, une réémergence du virus est récemment apparue (2007) en Géorgie d'abord puis a gagné en 2014 plusieurs pays d'Europe de l'Est dont la Pologne et les Balkans avant d'atteindre la Belgique en 2018 [20]. Le rôle de la tique dans le cycle de transmission de l'ASFV en Europe demeure néanmoins à déterminer [21]. Les *Reoviridae* représentent la plus large famille de virus à ARN double brin et comptent un large éventail de virus isolés de vertébrés, d'invertébrés, de plantes, d'insectes et de bactéries. Les *Coltivirus* et les *Orbivirus* constituent les 2 genres viraux de *Reoviridae* comprenant des virus transmis par les tiques. Le *Coltivirus* Eyach (EYAV), isolé à partir d'une tique *I. ricinus* dans les années 80 en France [22], est suspecté de pathogénicité chez l'homme [23]. Le genre *Orbivirus* comporte 5 espèces virales dont l'une d'elle, St Croix River virus (SCRV), possède la particularité d'être le premier virus endogène isolé à partir d'une lignée cellulaire de tique (IDE2) établie en 1994 à partir d'œufs de tique d'*I. scapularis* [24], [25]. SCRV

est alors considéré uniquement comme un virus de tique et non comme un arbovirus étant donné qu'aucune autre lignée cellulaire dérivant de moustiques, d'amphibiens ou de mammifères n'a pu être infectée [26]. Le virus Kemerovo (KEMV) a été isolé d'une tique *I. persulcatus* dans la région de Kemerovo en Russie dans les années 60 et des anticorps neutralisants dirigés contre ce virus ont été identifiés chez différents animaux et chez l'humain [27], [28]

La famille des *Orthomyxoviridae*, dont le représentant le plus notable est le virus Influenza, compte deux genres viraux, les Quarjavirus et les Thogotovirus, qui contiennent des virus transmis par les tiques. Ce sont des virus à ARN simple brin, segmenté et de polarité négative. Le virus Thogoto (THOV) est le principal représentant du genre Thogotovirus. Ce virus est décrit comme pathogène pour les ovins et a également été isolé chez d'autres animaux de rentes comme les bovins et les caprins [29].

1.2. Les flavivirus transmis par les tiques

La famille des *Flaviviridae* est l'une des principales familles comptant des virus transmis par les tiques. En effet, elle inclut un grand nombre de virus responsables d'encéphalites ou de fièvres hémorragiques chez l'homme et l'animal. Les virus du genre *Flavivirus*, appartenant à la famille des *Flaviviridae*, comportent des espèces virales pouvant être transmises par les moustiques, les tiques et par des vecteurs à ce jour inconnus ou sans vecteurs. Bien que les flavivirus transmis par les moustiques, comme le virus de la Dengue, le virus de la fièvre jaune ou le virus West-Nile, demandent une surveillance accrue, un certain nombre de virus transmis par les tiques ont émergé au cours de ces dernières décennies, devenant alors une préoccupation de santé publique.

Ces flavivirus transmis par les tiques peuvent être classés en 2 groupes majeurs: les flavivirus d'oiseaux marins et les flavivirus de mammifères [30]. A noter le cas particulier du virus Kadam (KADV) qui a été isolé à partir d'une tique *R. pravius* en Uganda et qui était initialement assigné au groupe des flavivirus de mammifères. Des analyses phylogénétiques semblent indiquer que ce virus constituerait un 3^e groupe de flavivirus transmis par la tique [31]. Au sein du groupe des flavivirus de mammifères sont retrouvés plusieurs flavivirus transmis par les tiques pathogènes pour l'homme et/ou l'animal. En effet, le virus de la fièvre hémorragique d'Omsk (OHFV), le virus de la forêt de Kyasanur (KFDV), le virus de la fièvre hémorragique d'Alkhurma (AHFV), le virus de l'encéphalite à tique (TBEV), le virus Powassan (POWV) et le virus louping ill (LIV) sont les principaux représentants.

1.3. Le sérocomplexe TBEV

OHFV, KFDV, AHFV, TBEV, POWV et LIV forment, avec d'autres virus, le sérocomplexe TBEV, c'est-à-dire qu'ils sont proches génétiquement et antigéniquement [32]. Ces virus sont répartis à différents endroits sur Terre (**Figure 2**). TBEV, POWV et LIV sont connus pour induire des encéphalites chez les humains et les animaux, tandis qu'OHFV, KFDV et AHFV sont responsables de fièvres hémorragiques [31]. Aucun motif protéique ne semble expliquer à lui seul pourquoi OHFV, AHFV et KFDV induisent des maladies hémorragiques [31]. Bien qu'appartenant également au sérocomplexe TBEV et au groupe des flavivirus transmis par les tiques aux mammifères, le virus Langat (LGTV), le virus Gadget Gully (GGYV), le virus de la ferme royale (RFV) et le virus Karshi (KSIV) n'ont jamais été décrits pour induire une pathologie chez l'homme [31], [33].

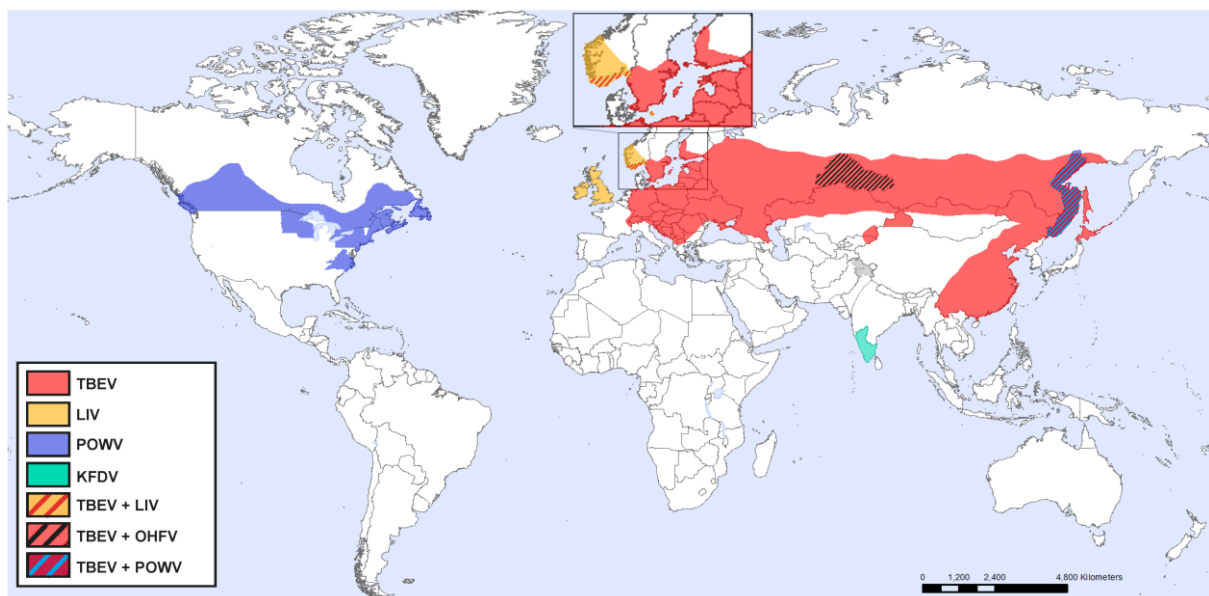


Figure 2. Distribution géographique approximative de TBEV, LIV, POWV, OHFV et KFDV

(D'après Lindqvist et *al.*, 2018)

1.3.1. Le virus de l'encéphalite à tique

TBEV est le flavivirus de tique le plus notable. Isolé pour la première fois en Russie en 1937, TBEV est représenté par 3 sous-types ; le sous-type européen (TBEV-Eu), le sous-type d'Extrême-Orient (TBEV-Fe) et le sous-type sibérien (TBEV-Sib). Le sous-type européen touche principalement le centre, l'est et le nord de l'Europe. Le sous-type sibérien est quant à lui majoritairement retrouvé en Sibérie, en Russie, en Lettonie et en Finlande tandis que le sous-type d'Extrême-Orient touche d'avantage l'Asie de l'Est et l'Asie centrale, incluant la Chine et le Japon (**Figure 3**) [34]. Deux nouveaux sous-types ont récemment été proposés : le sous-types baïkalien et le sous-type himalayen [35], [36].

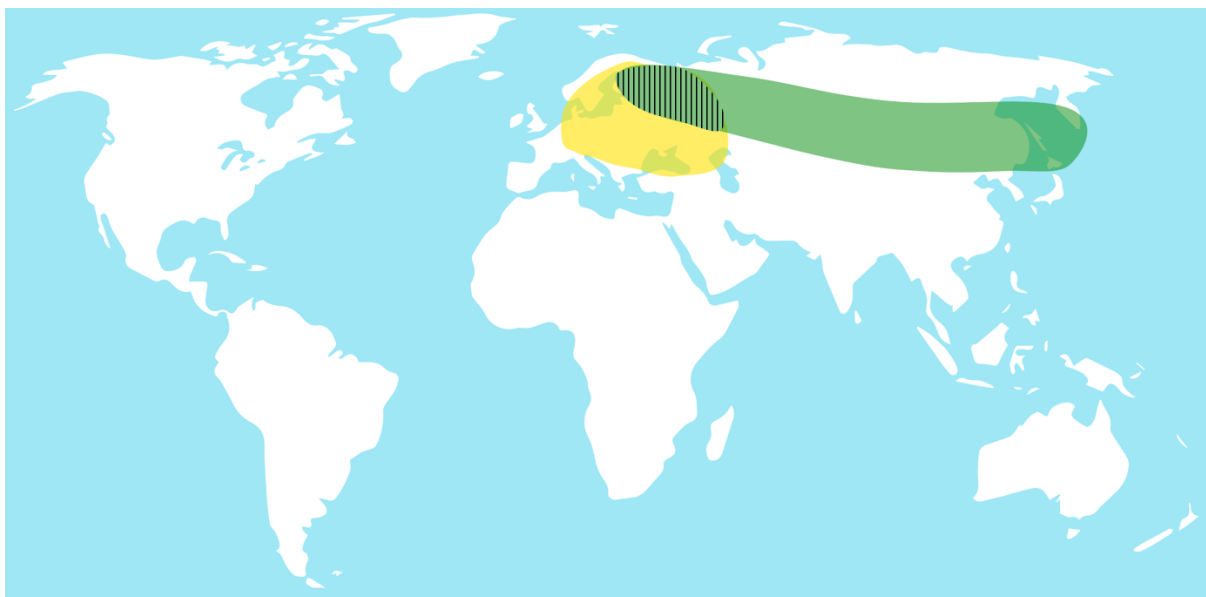


Figure 3. Répartition géographique approximative des différents sous-types de TBEV

La distribution géographique du sous-type européen de TBEV est représentée en jaune tandis que la distribution géographique des sous-types orientaux est représentée en vert. La zone hachurée représente la zone de coexistence des sous-types occidentaux et orientaux. (Réalisée avec Biorender)

1.3.2. Le virus louping ill

LIV est l'un des premiers virus transmis par les tiques à avoir été identifié. En effet, isolé chez le mouton dans le comté de Selkirk en Ecosse en 1929 [37], LIV est associé à une maladie décrite chez les moutons écossais depuis plus de 200 ans [38]. Les moutons alors atteints d'encéphalites, effectuaient des « petits bonds » (« to loup » en écossais), donnant ainsi le nom « louping ill » au virus. A la fin du XIXe siècle, la tique *I. ricinus*, également nommée la tique du mouton, est soupçonnée d'être impliquée dans la transmission du pathogène alors suspecté d'être responsable de cette pathologie. Deux ans après l'identification du virus louping ill, l'implication de la tique *I. ricinus* dans la transmission de l'agent étiologique viral est confirmé. Dès lors, différentes études révèlent la présence d'infection par LIV chez un certain nombre d'animaux de rentes comme les ovins [39], les bovins [40] et les porcins [41], [42]. D'autres espèces de la faune sauvage ou des animaux domestiques sont également infectées par LIV. C'est le cas des Lagopède d'Ecosse (perdrix) [43], [44], du chien [45], des chevaux [46], des cervidés [47], [48], des caprins [49] ou des lièvres [50].

1.4. Historique et épidémiologie de TBEV & LIV

Qu'il s'agisse des flavivirus transmis par les tiques (TBFV : Tick-Borne FlaviVirus) ou les moustiques (MBFV : Mosquito-Borne FlaviVirus), ils semblent descendre d'une ligne ancestrale commune et avoir divergé il y a 5 000 ans [30], [31]. Les flavivirus transmis par les tiques trouvent leur origine en Afrique et ont évolué de l'Asie vers l'Europe pendant les derniers milliers d'années jusqu'à atteindre l'Europe de l'ouest il y a entre 1 000 et 2 000 ans [51]. Les flavivirus transmis par les tiques semblent évoluer plus lentement que d'autres virus à ARN n'étant pas transmis par des arthropodes (VIH, virus Influenza), traduisant ainsi la contrainte d'un système à deux hôtes. Ces TBFV évoluent également plus lentement que les MBFV du fait du cycle de vie plus lent de la tique [51].

TBEV est endémique en Europe, en Sibérie et en Extrême-Orient. Depuis ces dernières décennies, les zones endémiques pour le virus se sont étendues, tout comme le nombre de cas rapportés. L'augmentation de l'incidence peut être expliquée de façon multifactorielle : facteurs écologiques, anthropiques tout comme les avancées de la recherche (diagnostique) [52].

Jusqu'à cette année, TBEV n'avait jamais été identifié au Royaume-Uni. En effet, une étude de surveillance a révélé la présence d'anticorps anti-TBEV chez des cervidés puis a mis en évidence l'ARN de TBEV chez des tiques collectées sur ces mêmes cervidés [53].

Entre 10 000 et 15 000 cas humains sont reportés chaque année à travers l'Europe et l'Asie [54]. Ce nombre paraît pourtant sous-estimé puisque les infections à TBEV ne sont à déclaration obligatoire que dans certains pays. Toutefois, en 2012, l'ECDC décide d'ajouter l'encéphalite à tique à la liste des maladies à déclaration obligatoire en vue d'harmoniser sa surveillance au sein de l'UE mais aussi de développer des mesures de prévention appropriées. En juin 2020, 33 cas confirmés de personnes infectées par TBEV après avoir consommé du fromage au lait cru ont été identifiés [55], [56]. Le Haut Conseil de la santé publique français émet par ailleurs un avis favorable à l'inscription de l'encéphalite à tiques sur la liste des maladies à déclaration obligatoire en France [57]. En 2018, 3 212 cas suspects de TBE ont été rapportés en Europe et 3 092 ont été confirmés. Sur 2 539 cas, 16 sont morts (0,6%) et 4 pays ne rapportent aucun cas (Bulgarie, Irlande, Luxembourg et Espagne). Le taux de déclaration était le plus élevé pour la Lituanie (13,6 cas pour 100 000 habitants), la Slovénie (7,4) et la République Tchèque (6,7). Le nombre de cas confirmés était le plus important en République Tchèque (712), en Allemagne (583) et en Lituanie (384). Globalement en Europe, le taux de déclaration de 0,6 pour 100 000 habitants est resté similaire depuis ces 3 dernières années [58], [59].

LIV aurait quant à lui évolué durant ces 800 dernières années. Suite à son introduction en Irlande, LIV a émergé aux Pays de Galles avant de s'étendre à travers toutes les îles britanniques et de gagner la

Norvège et le Danemark [38]. Trois hypothèses sont alors exposées par McGuire et *al.*, qui pourraient expliquer de quelle façon LIV aurait réussi à se propager de la sorte. La 1^{ère} explication fait intervenir des hôtes mammifères terrestres comme les cervidés ou les lièvres qui auraient transporté des tiques infectées vers de nouvelles zones géographiques. Cette hypothèse, recevable pour des zones géographiques restreintes, ne permet pas d'envisager la distribution de LIV à travers la mer d'Irlande par exemple. Ainsi, la seconde hypothèse se penche sur l'existence d'oiseaux migrateurs infestés par des tiques qui auraient conduit à la distribution de LIV sur de plus vastes étendues géographiques et à travers les mers. Enfin, le dernier mode de transmission s'appuie quant à lui sur les mouvements de bétails très importants entre le 15^e et 17^e siècle entre l'Irlande et les autres pays d'Europe [60].

En vue d'étudier la diversité génétique de LIV, une récente étude s'est attachée à séquencer 22 isolats de LIV ayant été collectés sur une période de 80 ans à travers le Royaume-Uni [61]. Les analyses phylogénétiques indiquent qu'un clustering géographique existe entre ces différents isolats et que des déplacements du virus ont eu lieu récemment sur des longues distances géographiques.

En se basant sur la protéine de l'enveloppe, les analyses de phylogénie moléculaire indiquent qu'il existe 4 lignées géographiques distinctes de LIV. Le génotype 1 (Ecosse et Angleterre), le génotype 2 (Ecosse), le génotype 3 (Pays de Galles) et le génotype 4 (Irlande). Il existe moins de 5% de différences nucléotidiques entre les différentes souches utilisées pour étudier la phylogénie de LIV [62].

D'autres flavivirus génétiquement très proches de LIV et engendrant également des encéphalites chez les ovins ont été isolés dans différents pays européens. C'est le cas du Turkish sheep encephalitis virus (TSEV) [63], du Spain sheep encephalitis virus (SSEV) [64], [65] ou du Greek goat encephalitis virus (GGEV) [66]. Bien que des analyses phylogéniques suggèrent une nouvelle classification de ces virus [31], la classification taxonomique actuelle définie par l'ICTV établie que ces virus sont tous des sous-types (variants/sous-espèces) de LIV [19], [67]. La classification de ces virus apparenté à LIV ainsi que leur évolution est toujours soumise à débat au sein de la communauté scientifique. En effet, la question d'une évolution par recombinaison des virus du sérocomplexe TBEV a récemment été soulevée par [68]. Néanmoins, Norbeg et *al.*, [69] rappellent que les événements de recombinaison nécessitent une présence géographique commune des deux virus qui se trouve de fait être un frein à cet événement. En effet à ce jour une seule étude rapporte la détection de LIV et TBEV au sein d'une même tique [70]. Les raisons d'une telle séparation géographique ne sont pas claires, tout comme le fait que LIV soit responsable d'encéphalites essentiellement chez les ovins contrairement à TBEV qui provoque la maladie uniquement chez les hommes [71].

En effet, certaines études font état d'infections humaines par LIV et le premier cas humain a été recensé en 1934 [72] et en 1991, Davidson et *al.* la caractérise de maladie oubliée après avoir dénombré 31 cas chez l'homme [73]. Jusqu'en 2011, 45 cas humains ont été rapportés dans le monde [74]. Bien que ces chiffres rapportent un faible nombre de cas humains, certains groupes d'individus

semblent plus exposés à l'infection par LIV. En effet, sur les 45 cas rapportés, plus de la moitié sont dus à des expositions en laboratoire tandis que les autres touchent principalement des sujets exposés professionnellement à des animaux infectés. Ainsi, les éleveurs, les bouchers et les vétérinaires sont des personnes plus à risque. Dès les années 90, Davidson et *al.*, s'interrogent d'ailleurs sur le rôle de la tique dans la transmission du virus à l'homme [73]. Néanmoins, une récente étude ayant détecté TBEV et LIV au Royaume-Uni rappelle l'importance de conduire des programmes de surveillance [53] corroboré par le fait que dans près de 60% des encéphalites au Royaume-Uni l'agent étiologique n'est pas identifié [75].

1.5. Pathogenèse et réponse de l'hôte

L'essentiel des cas d'encéphalites à tique induites par TBEV surviennent suite à une piqûre de tique. Toutefois, plusieurs cas d'infections humaines ont été relevés suite à la consommation de produits laitiers contaminés [76], [77]. Alors que les mécanismes par lesquels le TBEV induit une méningo-encéphalite suite à la consommation de produits au lait cru contaminé ne sont pas connus, un modèle de pathogenèse de TBEV inoculé lors d'une piqûre de tique a été proposé [78] : le virus est inoculé par la salive de tique et se réplique au niveau du site d'inoculation, dans les cellules dendritiques de la peau, aussi appelées cellules de Langerhans, et dans les macrophages. L'augmentation du nombre de cellules de Langerhans dans les nœuds lymphatiques suggère alors que ces cellules infectées migrent vers les nœuds lymphatiques [78], [79]. Ces sites constituent un haut lieu de la réplication virale et contribuent au développement d'une virémie. Le virus se propage alors aux tissus et organes périphériques jusqu'à traverser la barrière hémato-encéphalique et atteindre le système nerveux central (SNC) [80]. Les premières cellules du SNC ciblées par TBEV sont les neurones [81], et la réplication au sein du SNC conduit à une inflammation et à des dommages cellulaires [82], [83]. Les mécanismes moléculaires contrôlant la sensibilité des cellules neuronales à l'infection par TBEV demeurent peu connus, tout comme les processus conduisant une infection aiguë à évoluer vers des encéphalites sévères voir fatales. Quelques hypothèses sont toutefois proposées, notamment celle concernant la délétion du récepteur à la chimiokine de type 5 (CCR5) qui serait associée à une forme plus sévère d'encéphalite [84].

Cette infection virale de l'hôte conduit à une réponse immunitaire de ce dernier. Suite aux premiers symptômes neurologiques, le liquide cébrospinal se concentre en cellules mononuclées de type lymphocytes T CD4⁺ en majorité, en CD8⁺ dans une moindre mesure, ainsi qu'en cellules NK (natural killer) et en lymphocytes B [85]. Une production d'anticorps anti-TBEV est observée et augmente à la

fois dans le sérum et dans le liquide cébrospinal. La quantité d'IgM est ainsi très élevée au début de la maladie et peuvent persister jusqu'à 6 semaines post-infection. La production d'IgG survient de manière progressive et un pic est observé en phase tardive (à partir de la semaine 6) [86]. Ces IgG persistent au cours de la vie de l'individu et fournissent une immunité prévenant de réinfections (Figure 4).

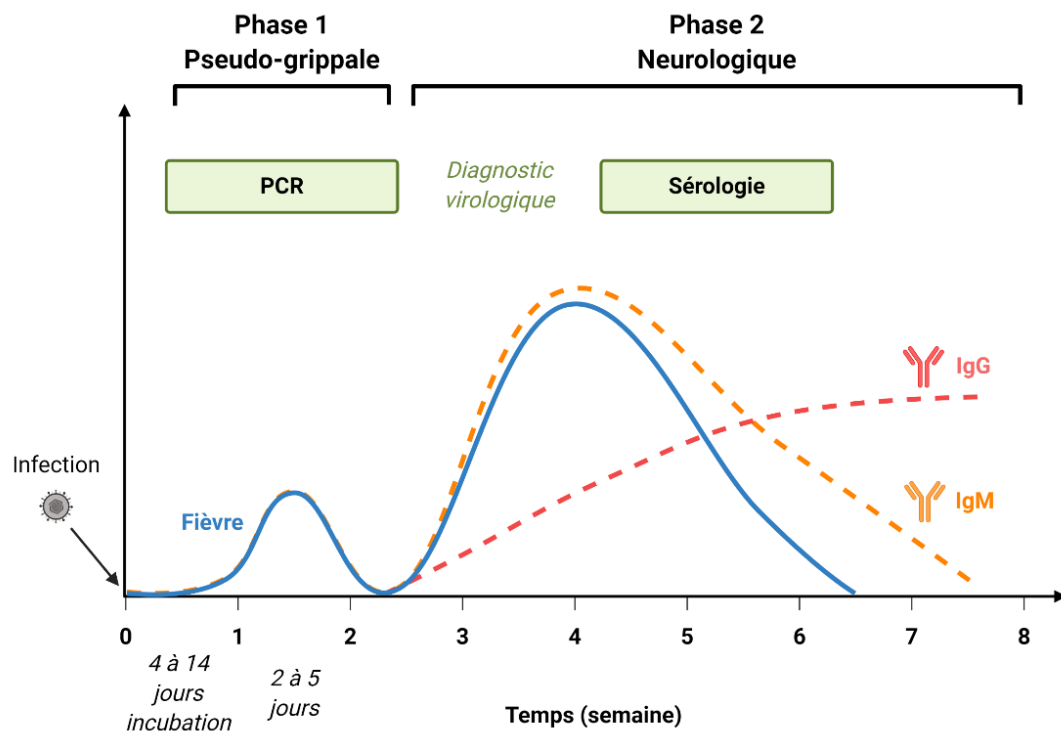


Figure 4. Infection biphasique de l'infection à TBEV

La phase 1 coïncide avec un syndrome pseudo-grippal et s'accompagne d'une virémie qui peut être détectée par RT-PCR. A l'issue de cette première phase, certains patients évoluent vers la forme neurologique de l'infection qui coïncide avec l'apparition d'anticorps IgM et IgG pouvant être détectés grâce à une sérologie. (Réalisé avec Biorender et inspirée de Holzmann, 2003).

La pathogenèse de LIV chez les ovins, et chez les quelques cas humains, suit le même schéma que TBEV chez l'humain [87], [88].

1.6. Caractéristiques cliniques et pathologiques

1.6.1. Chez l'humain

1.6.1.1. Caractéristiques cliniques

Entre 70 et 98% des infections à TBEV sont asymptomatiques bien que cette proportion soit difficile à évaluer puisque certains patients avec des symptômes légers ne sont jamais diagnostiqués.

Pour les individus infectés, la période d'incubation oscille entre 2 et 28 jours mais est généralement comprise entre 1 et 2 semaines [89] (**Figure 4**).

Dans 75% des cas, les patients infectés par TBEV développent une maladie ayant une évolution biphasique. La première phase correspond à une période virémique et s'accompagne généralement de symptômes non-spécifiques de la maladie tels qu'une fièvre modérée, des maux de tête, des douleurs musculosquelettiques, de la fatigue ou encore des nausées. Cette phase dure entre 2 et 7 jours et est suivie d'une phase dite d'amélioration, pendant environ 1 semaine et pouvant être totalement asymptomatique. Apparaît alors la seconde phase qui dans 50% des cas se traduit par des méningites, dans 40% par des méningoencéphalites et dans 10% par des méningoencéphalomyélites [90] (**Figure 5**).

La méningite et l'encéphalite sont les formes cliniques les plus fréquentes d'infection par TBEV. Ordinairement, la méningite se manifeste par une fièvre élevée, des maux de tête, des nausées et des vomissements. Certains patients développent aussi une photophobie et des vertiges. L'encéphalite se traduit par une altération de la conscience allant de la somnolence au coma (dans de rares cas). Elle peut aussi se manifester par des troubles de la personnalité, des perturbations de la concentration et des fonctions cognitives. La méningoencéphalite est associée à une détérioration du système nerveux central (SNC). Les patients deviennent léthargiques et développent de multiples symptômes comme une bradycardie, une bradykinésie, une hémiparésie et une hémiplégie. La paralysie flasque est une caractéristique typique de la méningoencéphalomyélite. Les membres supérieurs sont davantage touchés que les membres inférieurs, ainsi que les membres proximaux par rapport aux membres distaux. Par ailleurs, la poly radiculite est un syndrome pouvant être observé chez les patients atteints par TBEV [91].

L'existence d'une forme chronique d'infection par TBEV n'est pas établie. Néanmoins, des cas d'infections progressives chroniques ont été rapportés en Sibérie et en Extrême-Orient russe qui suggèrent que cette forme serait associée au sous-type sibérien de TBEV. Cette forme chronique présente des différences en terme de période d'incubation, d'apparition des symptômes et dans la période de rétablissement en comparaison aux formes aiguës de la maladie [92]. Les symptômes

d'une infection chronique à TBEV peuvent survenir plusieurs années après la piqûre de tique. Une souche de TBEV a été isolée d'une patiente décédée d'une forme progressive de l'encéphalite à tique (2 ans) et qui avait été piquée 10 ans au préalable [93].

De manière générale, les infections par TBEV s'accompagnent d'un rétablissement lent avec une certaine morbidité sur le long terme appelé syndrome post-encéphalique. Ce syndrome apparaît chez 40 à 50% des patients ayant développé une forme aiguë, et se caractérise par des maux de tête ainsi que des troubles de la mémoire et de la marche.

L'incidence de ces différentes formes d'infections par TBEV varie en fonction des régions et donc des sous-types impliqués. En effet, le taux de mortalité peut ainsi atteindre 40% avec le sous-type d'Extrême-Orient [90]. En Sibérie, 80% des infections à TBEV se traduisent par une simple fièvre sans séquelles neurologiques, et 7% des patients succomberont à une forme aiguë de la maladie. En Autriche, le taux de mortalité atteignait 1% lorsque la vaccination n'était pas encore disponible. Désormais les infections fatales à TBEV sont extrêmement faibles dans les pays européens où la vaccination est fortement recommandée.

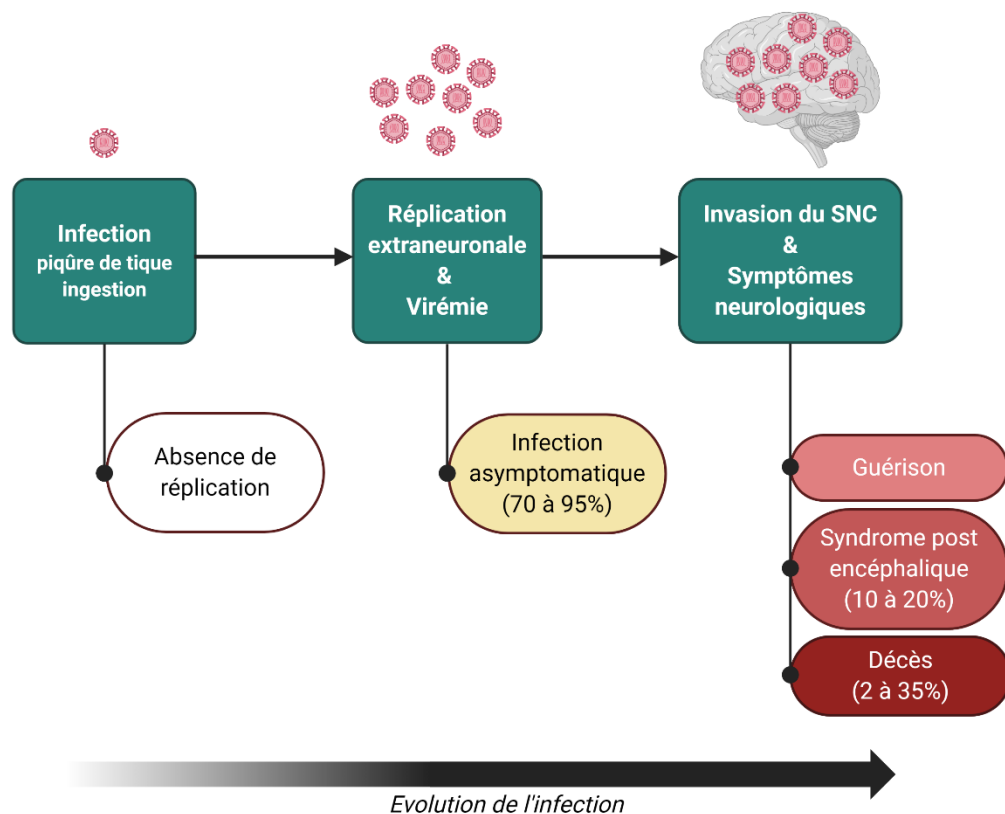


Figure 5. Représentation schématique des différentes issues possibles suite à l'infection par TBEV

(Figure inspirée de Monath, 1986 et réalisée avec Biorender)

1.6.1.2. Caractéristiques pathologiques

Les observations macroscopiques des cerveaux des patients ayant succombé à l'infection par TBEV révèlent la présence d'œdèmes et de congestions. A l'échelle microscopique, ces lésions sont réparties de façon hétérogène à travers le SNC mais se concentrent au niveau du tronc cérébral, du thalamus, du cervelet, des ganglions de la base et de la moelle épinière. Les méninges cérébraux et spinaux montrent une infiltration diffuse essentiellement de lymphocytes. Au sein du parenchyme cérébral et de la moelle épinière, une nécrose des neurones, ainsi que des nodules microgliales et des infiltrations périvasculaires sont observées. Les cellules de Purkinje semblent préférentiellement ciblées par TBEV au niveau de la moelle épinière et du cervelet.

Bien que les infections humaines par LIV soient rares, elles peuvent se manifester de 2 façons. Dans la majorité des cas, l'infection est asymptomatique mais certaines personnes infectées présentent un état similaire à celui observé lors d'une infection à TBEV [30]. La période d'incubation est estimée entre 4 et 7 jours et l'évolution clinique est généralement biphasique. La première phase s'apparente à un état pseudo grippal, perdurant quelques jours, avec une fièvre modérée, des maux de têtes, des douleurs musculaires suivies d'une rémission d'environ une semaine. Une forte fièvre survient ensuite pouvant alors s'accompagner de symptômes neurologiques qui ont été fatals dans de rares cas [94]–[96].

1.6.2. Chez l'animal

L'infection des animaux par TBEV est en grande majorité asymptomatique et est révélée soit par des enquêtes sérologiques conduites dans des élevages [97]–[103], soit par des cas d'encéphalites humaines dus à la consommation de produits au lait crus d'animaux contaminés [76], [77], [104]. Néanmoins, de rares cas d'infections d'animaux par TBEV ont été rapportés. Ces infections, avec des symptômes neurologiques, ont été décrites chez le chien [105], [106], le cheval [107] et le singe [108], une chèvre en Suisse [109], un mouflon en Autriche [110] et un mouton en Allemagne [111].

A l'inverse de TBEV n'entraînant que très rarement des manifestations cliniques chez les animaux, LIV est un problème en santé publique vétérinaire au Royaume Uni. Les ovins sont particulièrement sensibles à l'infection par LIV et le taux de mortalité, qui dépend de l'âge, du statut sérologique et de la race de l'animal, peut varier entre 5 et 60% [112]. La majorité des cas rapportés touchent les agneaux récemment sevrés qui gagnent des pâturages de collines et dont le taux d'anticorps maternels est en décroissance. Suite à l'infection par une tique infectée, la maladie se caractérise comme chez l'humain,

par une fièvre biphasique. Les premiers signes de l'infection sont aspécifiques et ne sont généralement pas détectés au sein du cheptel. La phase initiale se traduit par une virémie élevée due à la réplication du virus dans les tissus lymphoïdes durant 1 à 5 jours. Les signes cliniques se manifestent généralement au moment de la seconde phase de l'infection, une fois que le virus a envahi le système nerveux central. L'étendue des dommages neuronaux causés par la réplication virale vont déterminer la sévérité des signes cliniques qui peuvent être très variables.

En effet, cela peut aller d'une absence de symptômes à des degrés variables de dysfonctionnements neurologiques pouvant conduire à la mort de l'animal. L'invasion du système nerveux par le virus s'illustre par le développement d'ataxie, d'apathie, de tremblements, d'hyperesthésie, d'incoordination motrice et de « petits bonds ». Les animaux qui parviennent à survivre à l'infection, des torticolis et de parésies résiduelles peuvent persister.

La plupart des animaux de la faune sauvage ne montre pas de symptômes de la maladie bien que des études de séroprévalence, notamment chez les cervidés [113], indiquent que le virus LIV est bien présent. Par ailleurs, les chèvres sont capables d'excréter un titre important de virus dans leur lait ce qui représente un risque potentiel pour l'homme lors de la consommation de produits laitiers (fromage...). Le développement de l'infection est similaire chez les différentes espèces infectées (bovins, équidés) et ne varie seulement qu'en terme d'intensité de virémie et de fréquence à laquelle les signes cliniques se développent [114].

En plus des pertes économiques pouvant être dues à l'infection des animaux de rente, l'infection des Lagopèdes d'Ecosse représente un problème de taille. En effet, ces animaux sont extrêmement sensibles à l'infection par LIV. Ils développent une virémie élevée et contribuent à la persistance du virus dans la nature. L'étude de l'infection chez ces animaux a permis de mettre en évidence que l'infection ne se produit pas uniquement lors d'une piqûre par une tique infectée mais aussi par leur ingestion, augmentant ainsi le taux de transmission du virus [115].

1.7. Vaccination et traitements

A ce jour, il n'existe pas de traitements spécifiques pour lutter contre TBEV [116]. L'administration de corticostéroïdes chez quelques rares patients a été effectuée sans pour autant que leur utilisation ait été validée [117]. Plus récemment, un jeune patient infecté par TBEV s'est rétabli après un traitement au favipiravir, antiviral utilisé en thérapie contre la grippe au Japon [118]. Ce rapport de cas suggère une évaluation plus accrue de cet antiviral dans le traitement aux infections TBEV. La piste des anticorps anti-TBEV produits par des donneurs vaccinés et administrés aux malades semble prometteuse mais requiert des études plus approfondies [119], [120]. L'utilisation d'antioxydants comme la cytoflavine, l'emoxypine et le panavir font également l'objet de recherches avancées [121]–

[123]. Une étude russe a identifié 17 composés inhibant TBEV, POWV et OHFV en se basant sur un modèle de glycoprotéine d'enveloppe homologue aux flavivirus transmis par les tiques [124].

Ainsi, la vaccination s'avère être le moyen de protection le plus efficace pour prévenir de l'infection à TBEV. Quatre vaccins produits à partir de virus inactivé au formaldéhyde sur des cellules de fibroblastes embryonnaires de poulets inactivés sont disponibles. Le vaccin autrichien FMSE-Immun® (Pfizer), équivalent du vaccin commercialisé en France sous le nom de Ticovac®, le vaccin allemand Encepur® (GlaxoSmithKline), et deux vaccins russes [14] sont utilisés chez l'humain. Les vaccins européens sont produits à partir de la souche Neudörfl (Autriche) et K23 (Allemagne) qui appartient au sous-type européen. Les vaccins russes sont quand eux produits à partir des souches virales 205 et Sofjin appartenant au sous-type d'Extrême-Orient. Ces vaccins induisent une réponse protectrice contre des sous-types homologues mais offrent également une protection croisée contre d'autres sous-types [125]–[127]. Des réactions croisées sont également observées avec d'autres flavivirus comme LIV [128], [129]. L'efficacité de ces vaccins a d'ailleurs été évaluée entre 95 et 99% [130]. La campagne de vaccination ayant eu lieu dans les années 90 en Autriche a démontré les bénéfices économiques de la vaccination contre TBEV [131]. Une étude récente a révélé que les vaccins FSME-Immun® et Encepur® comportaient la protéine NS1 en plus des protéines formant la particule virale. Suite à la vaccination de souris, des anticorps anti-NS1 ont été produits et jouaient un rôle protecteur contre l'infection à TBEV [132].

Dans les zones endémiques pour LIV, la vaccination des ovins avec le vaccin louping-ill BP vaccine (MSD Animal Health) était fortement encouragée jusqu'à ce que le vaccin soit récemment retiré du marché [87].

1.8. Génomique et organisation structurale

1.8.1. Caractéristiques et propriétés

TBEV et LIV sont des flavivirus et partagent par conséquent les propriétés physiques et structurales inhérentes à ce genre viral. Ainsi la particule virale infectieuse est de forme sphérique, mesure environ 50 nm de diamètre et possède une enveloppe lipidique. La surface extérieure du virion comprend 2 protéines virales, la protéine d'enveloppe (E) et la protéine de membrane (M) (**Figure 6**). Cette enveloppe renferme la nucléocapside formée de la protéine de capsid (C) et du génome viral constitué d'un ARN simple brin de polarité positive. Cet ARN viral mesure environ 11 kilobases et possède une coiffe de type m⁷GpppAmN à l'extrémité 5'. Cette coiffe a pour rôle d'initier la traduction

et de contourner les défenses antivirales innées. A la différence des ARN messagers cellulaires, l'ARN viral est dépourvue d'une queue polyadénylée en 3' [133].

Le génome viral code un seul cadre de lecture d'environ 3400 acides aminés qui est flanqué en 5' et en 3' de régions non codantes d'environ 100 nucléotides pour l'extrémité 5' et entre 400 et 700 pour l'extrémité 3'.

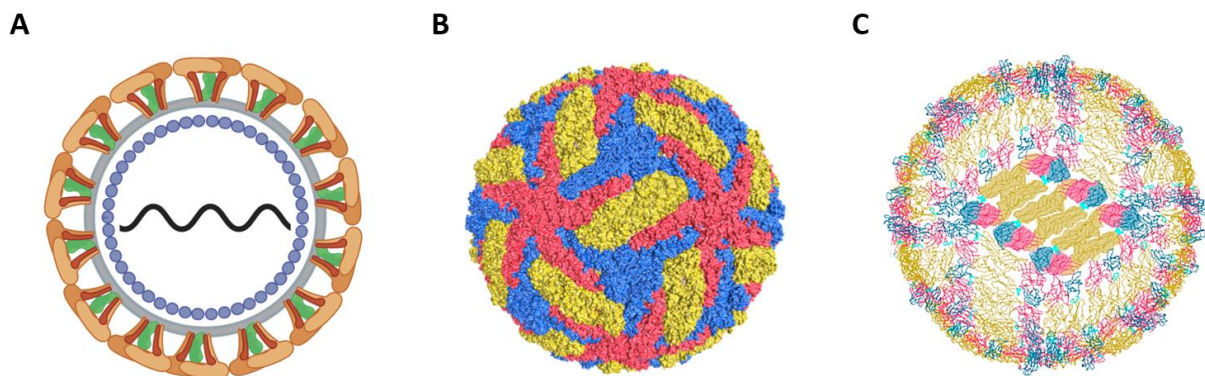


Figure 6. Structure du virion de TBEV

(A) Représentation schématique de la particule virale. L'ARN génomique viral (noir) est empaqueté par plusieurs protéines de capsid (bleu). La nucléocapside est entourée d'une membrane lipidique (gris) dans laquelle s'insèrent les protéines d'enveloppe et de membrane (orange et vert). (B) Représentation de la surface du virion de TBEV (wwPDB : 5O6A). Chaque unité asymétrique de la protéine E est représentée en rouge, jaune et bleu. (C) Trois hétérotétramères E-M-M-E à la surface de la particule virale de TBEV. Les domaines I, II et III de la protéine E sont représentés en rouge, jaune et bleu et le peptide de fusion est représenté en turquoise. (A. Réalisé avec Biorender, B & C issues de Pulkkinen et *al.*, 2018)

1.8.2. Liaison au récepteur et entrée

Le cycle de réplication d'un flavivirus commence par une étape d'entrée (**Figure 7**) et implique l'interaction de la glycoprotéine E avec des facteurs cellulaires. Cette phase permet le recrutement et la concentration de particule virale à la surface de la cellule qui va induire l'attachement de la particule virale à la surface de la cellule puis son endocytose [134], [135].

Les flavivirus sont capables d'infecter une large variété de cellules comme les cellules de Langerhans au niveau de l'épiderme, ou les cellules dendritiques dermales au niveau du derme, jusqu'à des cellules du système nerveux central pour les flavivirus neuro-invasifs comme TBEV [79], [136]. Toutefois, les récepteurs aux flavivirus ne sont à ce jour pas complètement caractérisés bien que l'utilisation d'une pléiade de facteurs d'entrée différents soient nécessaires à l'infection de différents types cellulaires.

L'essentiel de ces facteurs d'entrée ont été identifiés chez les mammifères mais quelques découvertes sont issues du moustiques [137], [138].

L'héparane sulfate par exemple, est une molécule ubiquitaire servant à l'attachement initial d'un très grand nombre de virus. Son rôle dans la liaison et l'entrée de TBEV a pu être démontré bien qu'elle s'accompagne d'une diminution de la virulence [139]. Les lectines de type C sont des protéines également impliquées dans l'infection des cellules dendritiques (CD) par des flavivirus. En effet, la molécule DC-SIGN (C-type lectin Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) semble jouer le rôle de récepteur pour l'infection des CD par le DENV [140]. Le récepteur au mannose, également de la famille des lectines de type C, est internalisé de façon constitutive lors du processus d'endocytose par vésicules de clathrine. Ainsi, il jouerait un rôle dans l'endocytose de TBEV mais aussi de DENV et JEV. Enfin, d'autres molécules additionnelles semblent impliquées dans l'entrée des flavivirus comme le récepteur à la lamine [141], des récepteurs à la phosphatidylsérine [142], ou l'intégrine $\alpha\beta 3$ [143]. Les protéines chaperonnes Hsp70 et Hsp90, interagissant à la surface des monocytes, semblent également impliquées dans l'étape d'entrée du DENV dans les monocytes [144].

Ainsi, après sa liaison au récepteur approprié, la particule virale est internalisée par un mécanisme d'endocytose dépendante de la clathrine. Le virion est ensuite acheminé vers des endosomes précoces ou intermédiaires qui vont maturer jusqu'au stade tardif. La fusion entre la membrane virale et la membrane de l'endosome s'effectue pendant le trafic endosomal suite à l'acidification du pH. Ainsi, le résidu His323, situé entre les domaines I et III de la protéine E, subit une protonation [145]. Cette modification chimique induit des modifications conformationnelles au sein de la protéine dimérique E, la réorganisant alors en trimères [146]. Le peptide de fusion jusqu'alors enfoui au sein de l'homodimère E est finalement exposé et s'insère dans la membrane de l'endosome permettant ainsi la fusion. L'efficacité de ce processus est influencée par la composition en lipide des membranes. A l'issue de la fusion des membranes virale et endosomale, le génome viral est libéré dans le cytosol, acheminé jusqu'au réticulum endoplasmique (RE) et l'étape de traduction débute alors immédiatement.

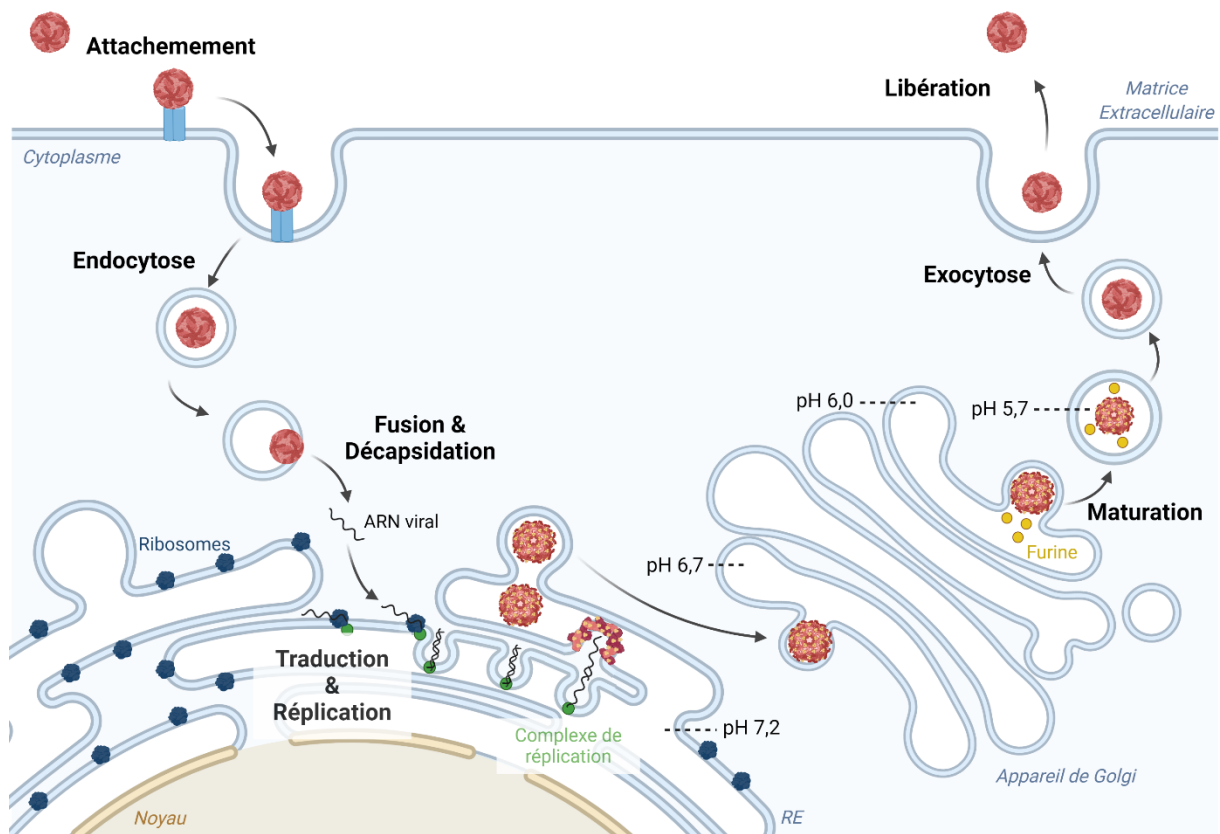


Figure 7. Cycle de réplication de TBEV et LIV

Les différentes étapes de réplication de TBEV et LIV décrites en cellules de mammifère. Le cycle débute par l'attachement du virus à son récepteur à la surface de la cellule. Le virus est endocyté et l'ARN viral libéré suite à l'acidification du pH de l'endosome qui permet la fusion de la membrane virale avec celle de l'endosome. L'ARN viral est alors traduit en différentes protéines virales qui permettent la réplication du génome viral au niveau de vésicules de réplication ainsi que la morphogenèse de nouvelles particules virales. Ces particules néoformées subissent une maturation à travers l'appareil de Golgi via des modulations de pH. De nouvelles particules virales infectieuses sont alors libérées dans le milieu extracellulaire. (Réalisée avec Biorender et Inspirée de Pierson et Diamond, 2012).

1.8.3. Traduction de la polyprotéine

L'ARN génomique viral joue le rôle d'ARNm et est traduit en une polyprotéine (**Figure 8**) qui subit alors des modifications co- et post-traductionnelles via des protéases cellulaires et la protéase virale NS2B/NS3 [147]. Ces clivages génèrent la formation de 10 protéines virales dont 3 sont dites protéines structurales et 7 sont des protéines non structurales (NS). La protéine de capsid (C), la protéine

d'enveloppe (E) et la protéine de membrane (M) sous la forme d'un précurseur (prM) forment les protéines structurales, elles sont impliquées dans la constitution de la nouvelle particule virale. Les protéines non structurales NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B et NS5 et le peptide signal 2K sont impliqués dans la réplication de l'ARN viral. Les clivages entre C/prM, prM/E, E/NS1 et 2K/NS4B sont effectués par des peptidases de la cellule hôte tandis que les clivages entre NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4A/2K et NS4B/ NS5 sont effectués par NS2B/NS3. A ce jour l'enzyme responsable du clivage entre NS1/NS2A n'est pas connue.

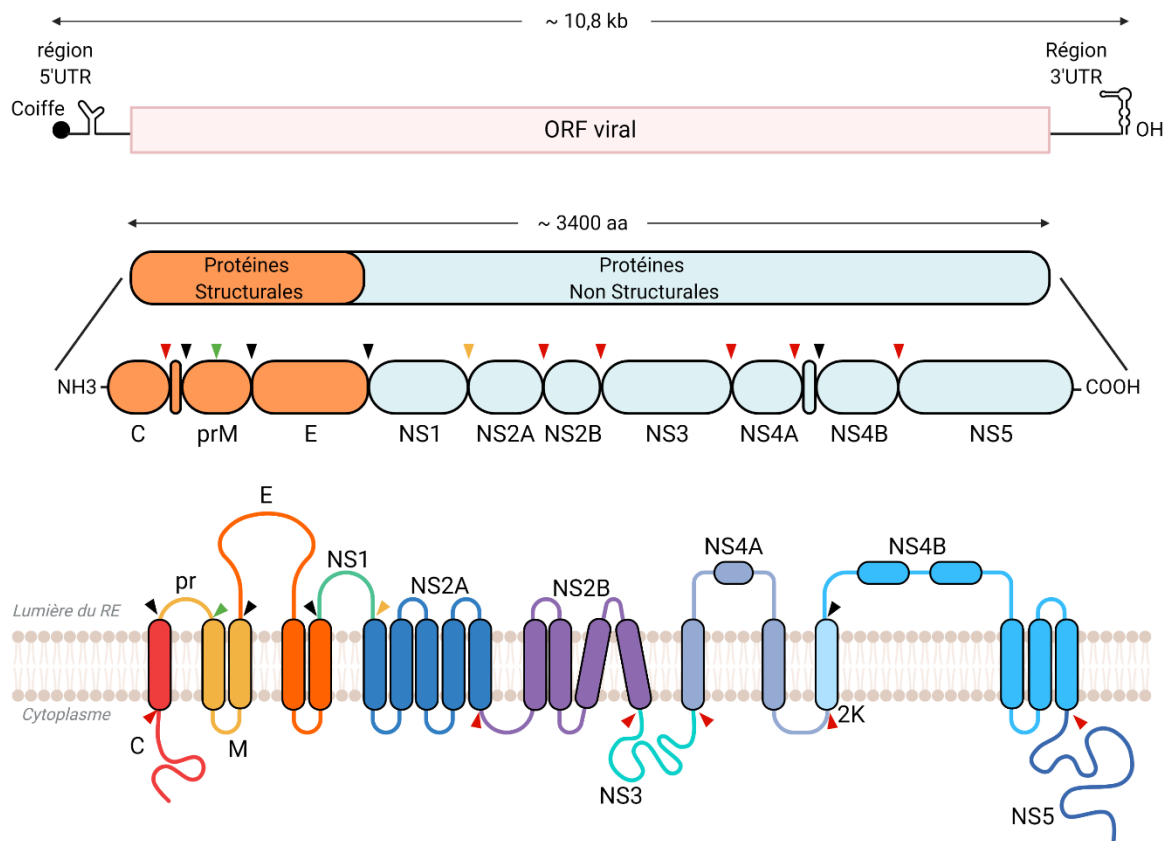


Figure 8. Représentation schématique du génome de TBEV et LIV et structure de leur polyprotéine

Le génome de TBEV et LIV est constitué d'une seule ORF virale codant une polyprotéine d'environ 3400 acides aminés. Cette polyprotéine est clivée par différentes protéases qui aboutit à la formation des protéines virales structurales et non structurales. Les triangles représentent les différents sites de clivage par les protéases de l'hôte (noir) comme la furine (vert), la protéase virale (rouge) ou une protéase inconnue (jaune). (Inspirée de Lindelbach et al., 2013).

1.8.3.1. Les protéines structurales

La structure de la particule virale des flavivirus est obtenue grâce à 3 protéines structurales. Deux d'entre elles, la protéine de membrane M et la protéine d'enveloppe E, sont localisées sur la surface extérieure de la particule virale. Elles sont ancrées dans la membrane virale via leurs domaines C-terminaux transmembranaires. La nucléocapside contenue à l'intérieur de la particule virale est quant à elle constituée de la protéine virale de capsid C et de l'ARN génomique viral. Ces protéines structurales jouent un rôle clé dans l'encapsidation de l'ARN viral ainsi que dans la liaison aux récepteurs cellulaires et dans l'infectiosité.

1.8.3.1.1. Protéine de capsid C

Avoisinant 11 kDa, la protéine C est la protéine structurale la moins conservée entre les différents flavivirus transmis par les tiques ou les moustiques [148]. La protéine C est située à l'extrémité N-terminale de la polyprotéine des flavivirus et par conséquent elle est la première protéine virale synthétisée. Sa région C-terminale contient une extrémité hydrophobe servant de peptide signal permettant la translocation de la prM dans la lumière du RE. Cette séquence d'adressage, qui permet également l'ancrage de la protéine C à la membrane du RE, est clivée par la protéase virale NS2B/NS3. Ce clivage est nécessaire pour permettre la libération de la partie N-terminale de la prM via les peptidases de la cellule hôte. Des études de microscopie électronique ainsi que l'organisation icosaédrale de la surface du virion suggèrent que la capsid formée de la protéine C aurait une symétrie icosaédrale [149].

La protéine C mature s'organise en dimère dont chaque monomère contient 4 hélices α . L'arrangement de ces hélices induit la formation d'une région hydrophobe possiblement impliquée dans les interactions avec les membranes de la cellule hôte [150], [151]. Par ailleurs, en délétant jusqu'à 16 résidus la protéine C de TBEV en C terminal, et donc en altérant son domaine hydrophobe, le virus devient fortement atténué mais reste hautement immunogène suggérant ainsi la possibilité d'envisager la protéine C comme cible pour l'atténuation des flavivirus [152].

1.8.3.1.2. Protéine de prémembrane prM, précurseur de la protéine de membrane M

La protéine M est issue d'un précurseur glycoprotéique, prM, d'environ 26 kDa. La région N-terminale de cette protéine est constituée de six résidus cystéine conservés qui forment des ponts disulfures et contient des sites de glycosylation (1 à 3) [153]. Cette prM est transloquée dans le RE grâce à la séquence d'adressage portée par la queue hydrophobe de la protéine C. L'une des principales fonctions de la prM est d'assurer le bon repliement de la protéine E et d'empêcher sa fusion au cours du transit du virion à travers la voie de sécrétion [154]. L'acidité du compartiment transgolgien induit un réarrangement exposant le site de clivage par la furine [155]. Le clivage protéolytique de prM en deux fragments, pr et M, coïncide ainsi avec la conversion des particules immatures en particules matures capables de fusionner.

1.8.3.1.3. Protéine d'enveloppe E

La protéine E est la principale protéine de surface des flavivirus et constitue le principal déterminant antigénique de la particule virale. Cette protéine de 53 kDa est impliquée dans la liaison au récepteur ainsi que dans la fusion des membranes de l'endosome et du virion [156]. Elle est formée d'une partie membranaire et d'une partie hydrophile se divisant en 3 domaines structuraux (DI, DII et DIII) et organisée sous formes d'homodimères antiparallèles dans les virions matures (**Figure 9**).

Le DI constitue le domaine central articulant DII et DIII. DII est un long domaine finger-like qui s'étend le long de la surface du virus et contient le peptide de fusion à son extrémité. Ce peptide enfouit dans une poche hydrophobe formée par DI et DIII du monomère partenaire est impliqué dans la fusion de l'enveloppe virale avec les membranes des endosomes. DIII adopte quant à lui un repliement similaire à celui des immunoglobulines et est la principale cible des anticorps neutralisants produits chez un hôte infecté ou immunisé [157]. Ce domaine est également suspecté d'être impliqué dans la liaison au récepteur [158]. Deux conformations structurales caractérisent la protéine E, une conformation pré-fusion et une conformation post-fusion [159]. Dans sa conformation pré-fusion, la protéine E, forme un homodimère qui se positionne parallèlement à l'enveloppe du virus [160]. La conformation post-fusion survient lorsque la protéine E se trouve dans un environnement à pH acide. Dans de telles conditions, les homodimères se dissocient en sous-unités monomériques puis se réorganisent en un trimère fusogénique [146]. Les peptides de fusion sont alors exposés vers la membrane avec laquelle le virus va fusionner.

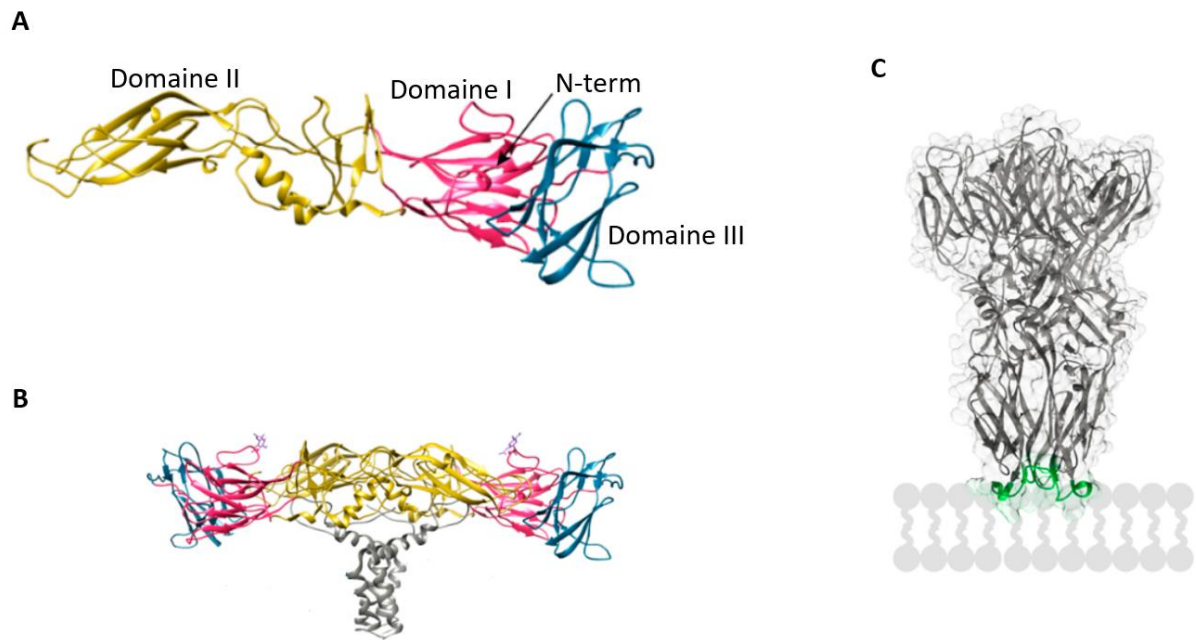


Figure 9. Représentation schématique de la protéine E

(A) Structure d'un monomère d'enveloppe E. Le domaine I est représenté en rose, le domaine II en jaune et le domaine III en bleu. (B) Hétérotétramère de deux protéines E et M. Le code couleur de la protéine E est identique à celui utilisé en A. La protéine M est représentée en gris. (C) Conformation post-fusion d'un trimère E (wwPDB : 1URZ). La protéine E est représentée en gris et le peptide de fusion en vert. (A, B & C issues de Pulkkinen et *al.*, 2018).

1.8.3.2. Les protéines non structurales

Les protéines non structurales (NS) interviennent dans la réplication virale, l'assemblage de la particule virales mais semblent surtout impliquées dans l'échappement au système immunitaire de l'hôte.

1.8.3.2.1. Protéine NS1

NS1 est une protéine d'environ 46 kDa qui est transloquée dans le RE au cours de sa synthèse. Elle est clivée à son extrémité N-terminale par une peptidase de la cellule hôte. En revanche le mécanisme permettant la séparation entre la NS1 et la NS2A est effectué par une enzyme de l'hôte qui à ce jour demeure inconnue [161], [162].

La NS1 possède 2 ou 3 sites de N-glycosylation ainsi que 12 cystéines qui lui permettent de former des ponts disulfures [163].

La NS1 ne possède pas de domaine d'interaction à la membrane, pourtant, cette protéine virale forme des homodimères rapidement après sa synthèse, lui conférant alors une affinité pour les membranes [164].

A la surface des cellules de mammifères infectées, des compartiments contenant la protéine NS1 sont présents et prêts à sécréter cette protéine virale. La NS1 est ainsi libérée sous une forme soluble prenant la structure d'une particule lipoprotéique hexamérique d'environ 10 nm qui apparaît comme 3 dimères [165]. Cette forme sécrétée est capable de se lier aux cellules via une interaction avec des glycosaminoglycanes sulfates. Elle est alors internalisée et s'accumule dans les endosomes tardifs. Ce processus pourrait ainsi favoriser l'infection ultérieure des cellules par le virus.

Des niveaux élevés de protéines NS1 sécrétées sont retrouvés dans le sérum et les tissus des patients infectés par les flavivirus. D'autre part, la forme extracellulaire de NS1 est hautement antigénique et induit une réponse humorale forte [166]. Cette protéine peut ainsi servir au diagnostic des infections à flavivirus aux étapes précoces de l'infection.

La forme intracellulaire de NS1 est quant à elle retrouvée au niveau du lieu de synthèse de l'ARN viral où elle joue un rôle essentiel dans la réplication du génome viral [167].

1.8.3.2.2. Protéines NS2A et NS2B

NS2A est une petite protéine hydrophobe de 22 kDa localisé au niveau des sites de réplication du RE. NS2A se lie à la région 3'UTR de l'ARN viral et à d'autres composants du complexe de réplication comme la NS3 et la NS5 [168]. NS2A semble également avoir un rôle dans la modulation de la réponse interféron chez l'hôte ainsi que dans l'empaquetage de l'ARN viral [169]. Le clivage de l'extrémité C-terminale de NS2A est effectué dans le cytoplasme sous l'action de la NS2B/NS3.

NS2B est une petite protéine de 14 kDa associée à la membrane du RE. Elle forme un complexe avec la protéine NS3 et est un cofacteur indispensable au rôle de protéase à sérine de la NS3 [170]. Ce rôle de cofacteur est assuré par une région centrale hydrophile de 40 résidus [171]. Ce complexe NS2B/NS3 est ancré à la membrane grâce aux régions hydrophobes de la NS2B [172].

1.8.3.2.3. Protéine NS3

La protéine NS3 des flavivirus est une protéine multifonctionnelle portant plusieurs activités enzymatiques. En effet, la région C-terminale de cette protéine de 70 kDa possède à la fois une activité nucléoside triphosphatase (NTPase) ainsi qu'une activité hélicase [173]. Cette région possède également une activité RNA triphosphatase impliquée dans la déphosphorylation de l'extrémité 5' du

génomique avant l'ajout de la coiffe [174]. En plus de ces 3 actions sur l'acide nucléique, le domaine hélicase de la NS3 est impliqué dans l'assemblage du virus [175].

La région N-terminale est quant à elle pourvue d'une activité sérine protéase nécessaire au clivage de la polyprotéine [176]. Ainsi le complexe NS2B/NS3 permet la disjonction de NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A, NS4B/NS5 en plus de générer l'extrémité C-terminale de la protéine C mature [177] et de la NS4A [178].

1.8.3.2.4. Protéines NS4A et NS4B

Les protéines NS4A et NS4B sont de petites protéines hydrophobes respectivement de 16 et 27 kDa. La NS4a interviendrait dans la formation du complexe de réplication en réarrangeant les membranes du RE avec ou sans le peptide 2K selon les flavivirus [179], [180]. Cette protéine virale faciliterait également la réplication virale en prévenant la mort cellulaire [181]. Le peptide 2K, correspondant aux 23 résidus en C-terminale de la NS4A agit comme une séquence signal induisant la translocation de la NS4B dans la lumière du RE [179]. Cette séquence signal appelée fragment 2K, est séparée de la NS4B par une enzyme de l'hôte au sein du RE [182]. Elle joue également un rôle dans les invaginations de la membrane du RE [180] et est colocalisée au niveau des complexes de réplication. La protéine NS4B est une protéine transmembranaire localisée au niveau du site de réplication et du noyau [183] et semble impliquée dans l'inhibition de la réponse IFN [184].

1.8.3.2.5. Protéine NS5

NS5 est la plus grosse protéine des flavivirus (103 kDa). C'est une phosphoprotéine multifonctionnelle fortement conservée ayant une activité ARN polymérase ARN dépendante en région C-terminale. Elle permet ainsi la réplication de l'ARN viral dans le RE. Par ailleurs, l'activité méthyltransférase (MTase) portée par sa région N-terminale en fait une protéine impliquée, avec la NS3, dans l'ajout de la coiffe de l'ARN viral. Alors que le cycle de réplication des flavivirus n'implique pas de passage dans le noyau, la protéine NS5 est fréquemment localisée dans le noyau des cellules qu'elle infecte suggérant un autre rôle que celui de la réplication de l'ARN, à ce jour inconnu, dans le cycle des flavivirus [185]. NS5 constitue un régulateur essentiel de la réplication et de la synthèse d'ARN viral [186].

1.8.4. Réplication de l'ARN viral

Les protéines virales non structurales nouvellement synthétisées réarrangent la membrane du RE de façon à former des invaginations où le complexe de réplication peut alors s'établir (**Figure 7**) et devenir

la plaque tournante de la réplication virale [187], [188]. Les protéines NS3 et NS5 s'associent à la coiffe située en 5' de l'ARN viral et conduisent à la synthèse d'un ARN négatif qui va servir de matrice à la synthèse de nombreux ARN viraux simple brin de polarité positive [189], [190] (**Figure 10**). Lors de ce processus, des intermédiaires de réplication à ARN double-brin se forment entre les brins de polarité positive et ceux de polarité négative. La réplication chez les flavivirus est qualifiée de semi-conservatrice et asymétrique puisque les brins positifs sont en excès par rapport aux brins négatifs [191].

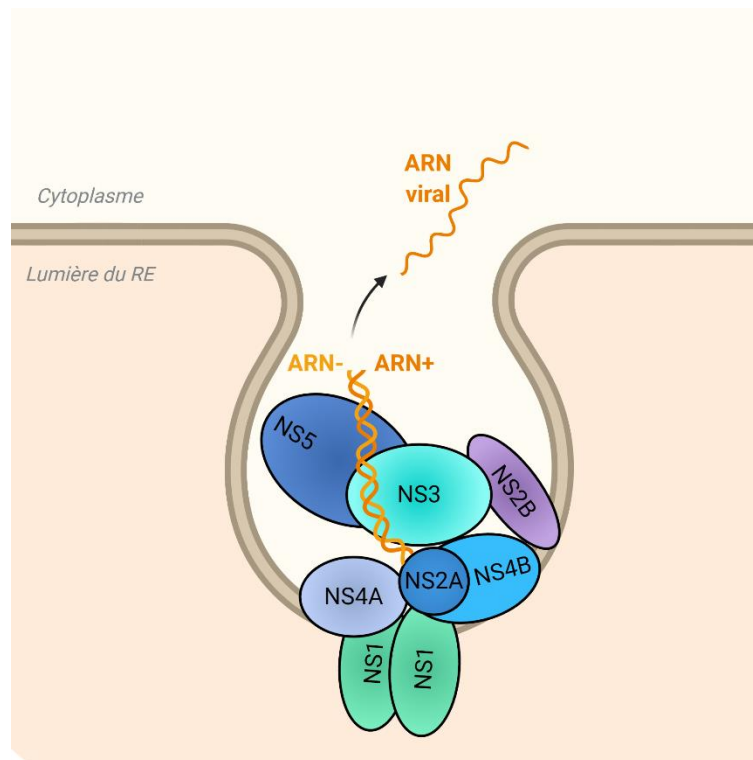


Figure 10. Complexe de réplication

Formation par les protéines virales non-structurales d'un complexe de réplication permettant la synthèse de nouveaux ARN viraux. Ces complexes s'établissent au sein d'invagination de la membrane du réticulum endoplasmique (RE). (Inspiré de Shi, 2014).

1.8.5. Assemblage et libération

L'étape d'assemblage est couplée à la réplication virale et débute par l'association des dimères de la protéine C avec l'ARN génomique viral néosynthétisé. Cette association prend place du côté cytoplasmique du RE et génère un précurseur de la nucléocapside qui va bourgeonner au sein du RE : la nucléocapside est alors entourée d'une enveloppe composée de la membrane du RE. Il s'accumule

alors au sein du RE une particule virale immature non infectieuse composée de la nucléocapside et des hétérodimères E-prM [192]. Cette particule est transportée via le système sécrétoire jusqu'au Golgi où l'acidification du pH conduit au réarrangement conformationnel de la protéine E [159] et au clivage de la prM [193]. Les particules virales infectieuses sont libérées dans la matrice extracellulaire grâce à la fusion de la vésicule de transport à la membrane plasmique (**Figure 7**). Bien que des particules virales non infectieuses et immatures puissent être libérées [194] (**Figure 11**), la libération de particules virales infectieuses prend place environ 12h après le début de l'infection [195].

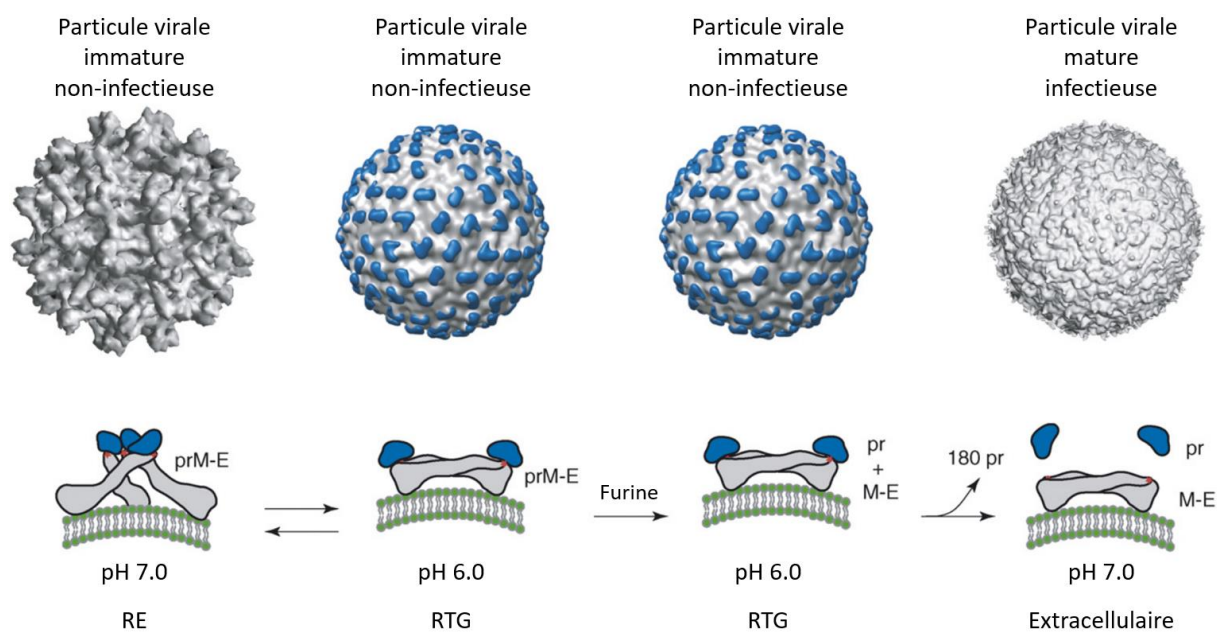


Figure 11. Maturation des particules de flavivirus

Reconstruction en cryo-microscopie électronique des différentes étapes de maturation de la particule virale impliquant un réarrangement conformationnel des protéines virales E (gris) et prM (bleu). Ces protéines de surface sont exposées à différents pH au cours du cheminement de la particule du réticulum endoplasmique (RE) jusqu'à la matrice extracellulaire en transitant par le réseau transgolgien (RTG). Le peptide de fusion (rouge) est masqué par le peptide pr. Le clivage de prM par la furine engendre la formation d'une particule mature infectieuse. (D'après Perera et Kunh, 2008).

2. Le vecteur tique

2.1. Importance sanitaire des tiques

Il est admis que les tiques sont les arthropodes qui transmettent la plus grande diversité de pathogènes au monde provoquant un nombre important de maladies à la fois chez l'homme et chez les animaux (de compagnie, d'élevage et sauvages). D'ailleurs, la menace de ces maladies transmises par les tiques au niveau mondiale a augmenté [196], [197]. Aussi, l'impact économique engendré par les tiques et les maladies qu'elles engendrent est considérable. Au Brésil, la babésiose bovine, maladie parasitaire liée aux tiques, provoquerait une perte économique estimée à plus de 3 milliards de dollars chaque année pour l'industrie agro-alimentaire [198]. Au Mexique, ce chiffre s'élève à plus de 500 millions de dollars [199]. Toutefois, la mise en place de programmes de surveillance ou d'éradication comme celui mis en place aux Etats-Unis permet de limiter ces pertes économiques. En effet, le « Cattle Fever Tick Eradication Program » a ainsi permis de prévenir une perte économique annuelle de 3 milliards de dollars ; le pays est ainsi exempt de babésiose bovine et des autres pathogènes transmis par les tiques responsables de fièvre chez les bovins depuis 1943. Parmi les maladies à tique responsables d'atteinte chez l'homme, la maladie de Lyme ou borréliose de Lyme est celle la plus communément évoquée. Cette maladie infectieuse d'origine bactérienne touche annuellement près de 300 000 personnes aux Etats-Unis et 230 000 en Europe [200], [201]. Ainsi, entre 700 millions et 1,3 milliards de dollars seraient dépensés chaque année aux Etats-Unis pour soigner cette maladie vectorielle [202].

2.2. Taxonomie

A ce jour, près de 900 espèces de tiques différentes ont été décrites [203]. Ces membres de l'ordre *Ixodida* sont divisés en 3 familles, les *Ixodidae*, les *Argasidae* et les *Nuttalliellidae* (**Figure 12**). La famille des *Ixodidae* aussi appelée tiques dures puisqu'elles possèdent une cuticule dorsale compte environ 700 espèces. La famille des *Argasidae* ou tiques molles comprend quant à elle près de 200 espèces [204]. Ces 3 familles de tique diffèrent de par leur morphologie, leur comportement, leur développement et les pathogènes qu'elles transmettent. La famille des *Argasidae* se divise en 4 genres (*Argas*, *Carios*, *Ornithodoros* et *Otobius*) alors que celle des *Ixodidae* comprend 14 genres. Une troisième famille, les *Nuttalliellidae*, constitue une famille plus atypique puisqu'elle ne comprend qu'un seul représentant (*Nuttalliella namaqua*). Parmi les *Ixodidae*, le genre *Ixodes* est le plus notable puisqu'il regroupe plus de 240 espèces. Toutefois, d'autres genres trouvent une importance en santé humaine et vétérinaire, c'est le cas des *Amblyomma*, des *Dermacentor*, des *Haemaphysalis*, des *Hyalomma*, des *Rhipicephalus* et des *Boophilus* [5].

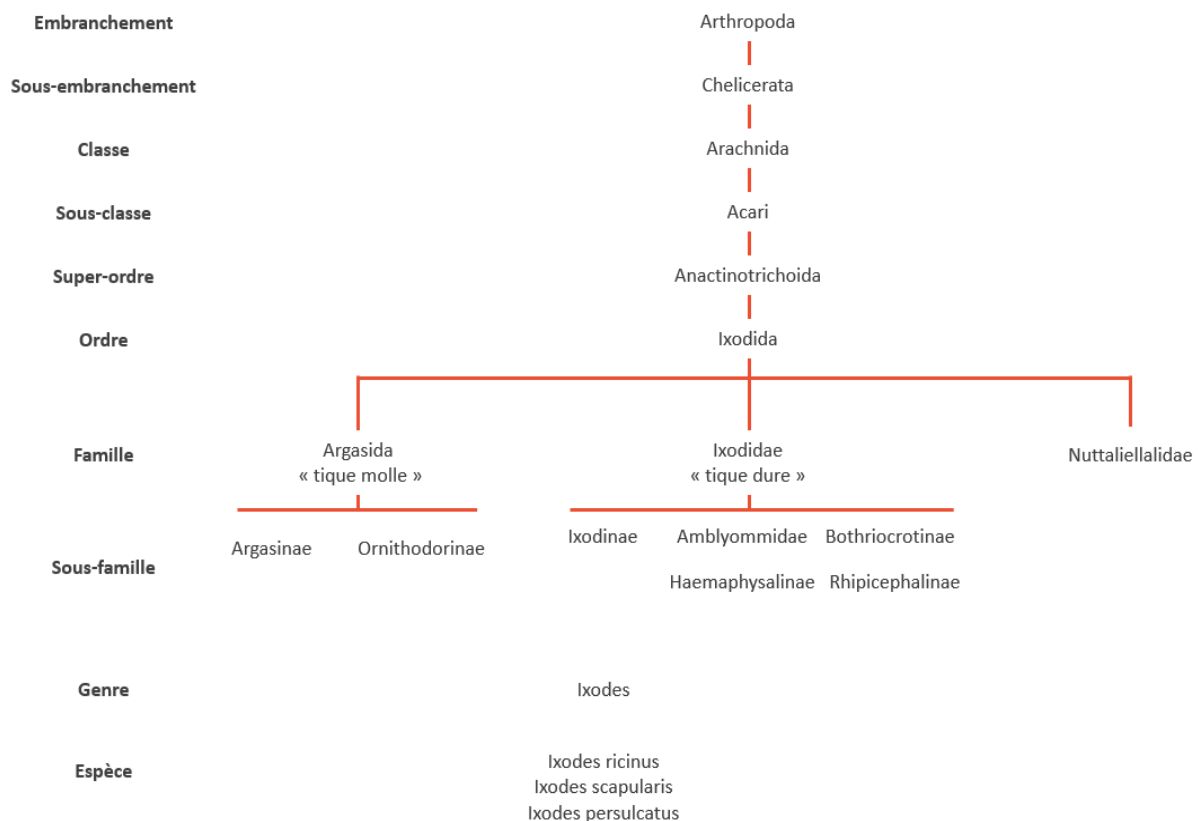


Figure 12. Classification systématique des tiques

2.3. Biologie de la tique

2.3.1. Rôles des hôtes vertébrés

Les *Ixodida* sont dépendantes d'une, de deux ou de trois espèces d'hôtes animales en fonction du nombre d'hôtes sur lesquelles elles s'attachent pour effectuer leur cycle de vie.

Certaines tiques se gorgent sur un unique hôte, c'est-à-dire que la prise du repas sanguin de chaque stade de développement de la tique s'effectue sur le même hôte. D'autres tiques effectuent leur repas sanguin sur deux hôtes différents, les stades immatures (larve et nymphe) sur un premier hôte puis le stade adulte sur un second hôte. Enfin, il arrive que des tiques se gorgent sur trois hôtes différents, dans ce cas la prise du repas sanguin s'effectue sur un hôte différent pour chaque stade de développement de la tique. Peu d'espèces de tiques prennent leur repas sanguin sur un seul individu, c'est notamment le cas des tiques molles. Chez les tiques dures l'un des exemples est celui de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) spp. Cette espèce se gorge souvent sur des hôtes effectuant des déplacements conséquents et avec une zone de vie relativement importante. Leur rôle épidémiologique est alors de maintenir le virus entre le vecteur et l'hôte. *I. ricinus* réalise quant à elle son cycle de vie sur 3 hôtes.

Le schéma de cycle de vie à deux hôtes est quant à lui principalement retrouvé chez des tiques évoluant dans des environnements plus arides (savanes, steppes). Dans ce cas de figure, la larve mue au stade nymphe sur l'hôte et les deux stades effectuent leur repas sanguin sur le même hôte tandis que l'adulte se gorge sur un second hôte. Ce schéma d'infection fournit ainsi la capacité à une nymphe infectée d'induire une virémie chez l'hôte, rendant ainsi possible l'infection d'une larve lors de son repas sanguin sur ce même individu. Une seule nymphe peut alors infecter un grand nombre de larves qui, en muant, deviennent des nymphes infectées qui peuvent se gorger sur un second hôte, l'infecter et ainsi perpétuer le cycle [205].

2.3.2. Stades de développement

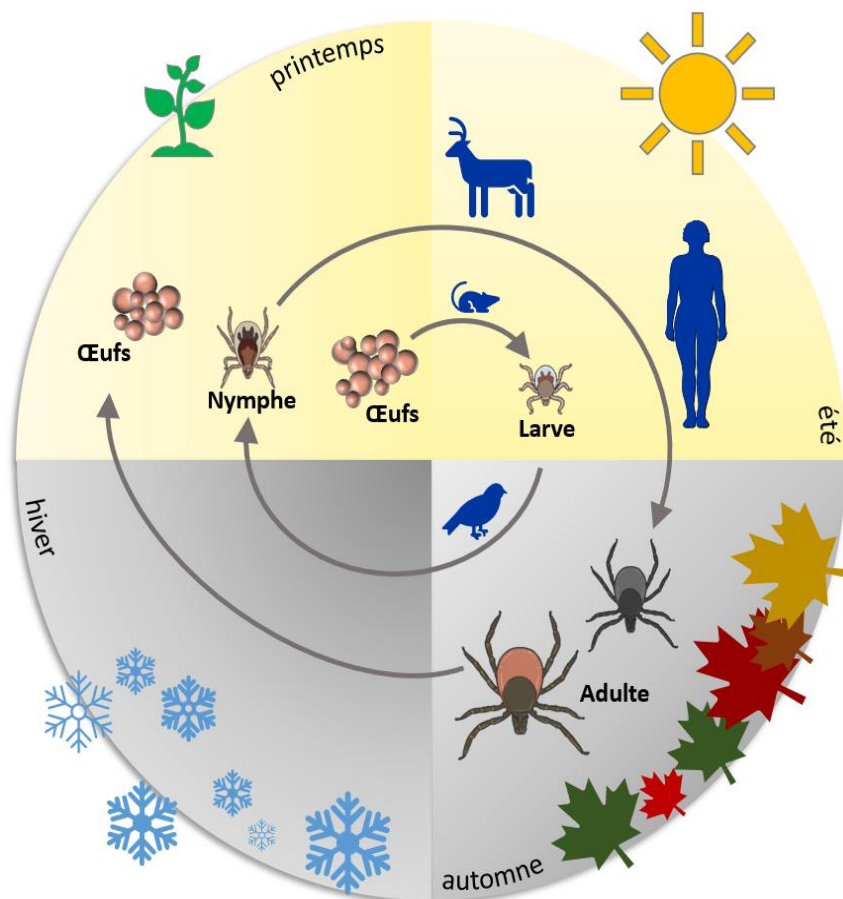


Figure 13. Cycle biologique de la tique

Il existe 4 stades de développement chez *I. ricinus* ; les stades œuf, larve, nymphe et adulte (**Figure 13**). Seuls les trois derniers stades de développement sont capables de prendre un repas sanguin sur un hôte. Chaque repas sanguin s'effectue sur un hôte différent appartenant ou non à la même espèce et sur une période de temps variant de 2 à 12 jours. Le stade œuf aboutit à la formation d'une larve à 3

paires de pattes qui se développe en une nymphe à 4 paires de pattes. Cette nymphe va alors muer en adulte, mâle ou femelle [206].

La taille d'une tique dépend de son état de gorgement ainsi que de son stade de développement. Une tique adulte femelle d'*I. ricinus* mesurera entre 3 et 4 mm contre 2,5 mm pour le mâle. Les nymphes mesurent entre 1 et 2 mm alors que les larves varient entre 0,6 et 1 mm (**Figure 14**).



Figure 14. Les différents stades évolutifs d'*Ixodes* spp.

(Adaptée de Straubinger, 2015)

2.3.3. Rôle du repas sanguin

Une tique dure gorgée est capable d'augmenter sa masse corporelle entre 10 et 200 fois au cours d'un repas sanguin [207]. Le repas sanguin s'articule en 3 phases majeures : la détection de l'hôte, la salivation associée au gorgement et enfin la digestion (**Figure 15**). La durée du repas sanguin est variable puisqu'une larve peut se gorger pendant 2 à 4 jours, une nymphe pendant 3 à 5 jours et une femelle adulte entre 6 et 10 jours. Il n'y a qu'un seul repas sanguin par stade à l'exception du mâle adulte qui ne se gorge pas. La tique nécessite un repas sanguin unique pour disposer de l'énergie nécessaire pour muer au stade suivant. Une fois arrivée au stade adulte, les femelles trouveront l'énergie dans le repas sanguin pour pondre les milliers d'œufs, le mâle quant à lui n'a pour rôle que de féconder la femelle et mourra une fois sa tâche accomplie.

Il est fréquent de retrouver plusieurs tiques qui effectuent leur repas sanguin à proximité sur un même individu.

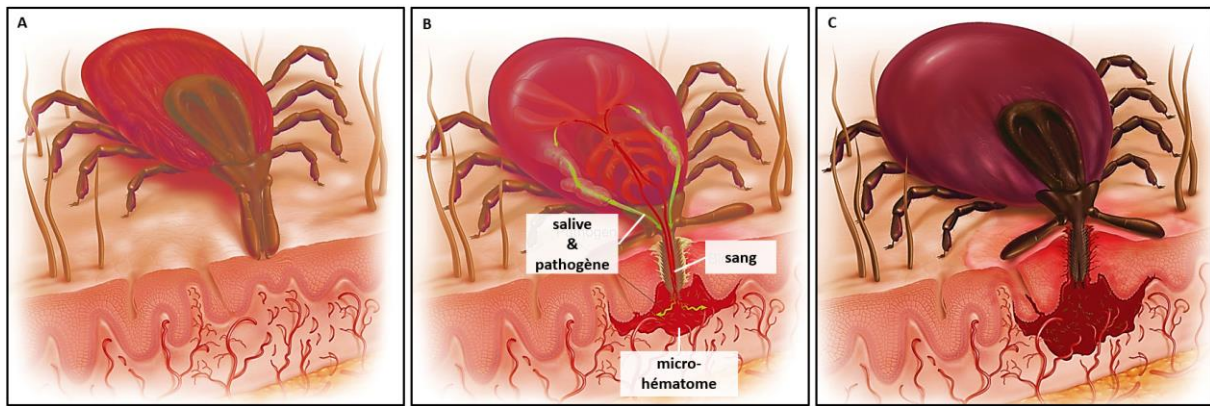


Figure 15. Les différentes étapes du repas sanguin

(A) Détection de l'hôte et piqure. (B) Attachement, salivation et gorgement. (C) Digestion (dessin de Bayer Inc©, 2017)

2.3.4. Durée d'un cycle de vie

Le passage d'un stade à un autre dure environ 1 an, un cycle de vie complet d'*I. ricinus* est donc d'environ 3 ans. Toutefois, les conditions climatiques, la répartition géographique et la disponibilité de l'hôte vertébré jouent un rôle essentiel dans le développement de la tique. Ainsi, le cycle de vie peut varier entre 2 et 6 ans.

La phase d'accouplement se déroule généralement sur un hôte juste avant la prise du repas sanguin et quelques semaines plus tard la femelle pond entre 1000 et 5000 œufs avant de mourir [208].

2.3.5. Conditions environnementales et habitats

Les tiques vivent sur le sol où elles sont sensibles aux fluctuations météorologiques et climatiques saisonnières. Leur distribution sur le globe permet de mettre en évidence les différents environnements dans lesquels elles évoluent. Les tiques sont souvent retrouvées en bordure de forêts, à proximité de prairies, clairières, en bordure de rivière, près d'arbustes, de broussailles, entre les forêts de conifères et de feuillus ou bien encore à la jonction entre les bois et les taillis. Leur développement est dépendant de la température et elles sont par ailleurs sensibles à la déshydratation. Ainsi, 92% d'humidité relative sont nécessaires au développement d'*I. ricinus* [208].

2.3.6. Comportement de prédation de la tique

Une tique à la recherche d'un hôte vertébré pour son repas sanguin est dite à l'affût. Cette dernière se perche au plus haut de la végétation et attend le passage d'un hôte pour s'y attacher et effectuer son repas sanguin. Plus la tique est à un stade avancé de son développement plus elle sera capable d'être à l'affût à des hauteurs plus imposantes (jusqu'à 1m50) et donc de se gorger sur des animaux de taille plus conséquente. En effet, les larves et les nymphes ont tendance à se gorger sur des petits mammifères et des oiseaux tandis que les adultes se gorgent sur des mammifères plus imposants comme des ovins, des cervidés, des bovins ou des caprins [208].

La tique n'est pas dotée de vision mais elle est capable de détecter des mouvements, des changements de températures, d'odeurs, le dioxyde de carbone et l'ammoniac. Ce sont les organes de Haller, situés au niveau de la première paire de pattes qui lui permettent alors de s'orienter pendant son gorgement [209], [210].

2.4. La compétence vectorielle

2.4.1. Définition

Pour qu'un arthropode soit considéré comme vecteur, il doit remplir plusieurs critères. Tout d'abord il doit être apte à acquérir le pathogène en question au cours de ce repas sanguin sur un hôte vertébré infectieux. Ensuite, il doit assurer la multiplication et/ou le développement du pathogène. Enfin, il doit pouvoir transmettre le pathogène à un nouvel hôte vertébré lors d'un nouveau repas sanguin [5] (Figure 16).

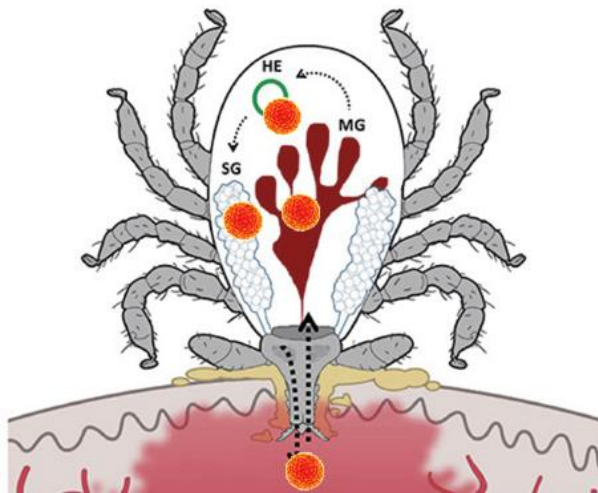


Figure 16. Compétence vectorielle d'*I. ricinus* pour un virus

(Adaptée de De La Fuente et *al.*, 2017)

La tique est considérée comme un vecteur efficace pour les pathogènes qu'elle transmet en partie grâce à la durée de son repas sanguin. En effet, plus le repas sanguin dure longtemps, plus le pathogène a de probabilités soit d'être transmis à l'hôte vertébré soit d'être assimilé par la tique [206]. La cinétique de ce transfert varie en fonction du pathogène considéré. Ainsi, il semblerait que le POWV soit transmis dès les premières minutes du repas sanguin à la différence des bactéries (*A. phagocytophilum* et *Bo. miyamoto*) qui seraient transmises plus tardivement [211], [212]. D'autre part, la tique subit une métamorphose incomplète à la différence d'autres arthropodes comme les moustiques. En effet, seuls les organes d'origine ectodermique subissent la mue, rendant ainsi la survie des pathogènes plus aisée pendant cette phase critique [206]. Par ailleurs, le volume de sang important assimilé et traité par la tique jouerait un rôle important dans l'acquisition du virus [213].

Une caractéristique biologique seule ne suffit pas pour établir qu'un vecteur est efficace. En effet, cette efficacité repose plutôt sur un panel varié d'éléments biologiques. Aussi, la compréhension fine de la physiologie et de l'écologie de la tique est nécessaire afin de mieux appréhender leur rôle en tant que vecteur [206].

2.4.2. *Ixodes ricinus* : un vecteur de TBEV et LIV

Les virus appartenant au sérocomplexe TBEV sont essentiellement transmis par des tiques du genre *Ixodes*. Le sous-type européen de TBEV est principalement transmis par *I. ricinus* en Europe tandis que les sous-types extrême-oriental et sibérien sont transmis par *I. persulcatus*. Sur le plan taxonomique et du développement, ces 2 espèces sont extrêmement similaires. *I. ricinus* est une tique des régions tempérées d'Europe, évoluant entre les latitudes 39° et 65° et s'étendant à l'est jusqu'à la longitude 60° (est de la mer Caspienne). Elle est également présente dans quelques régions au nord du continent africain (**Figure 17**). Les changements climatiques de ces dernières années ainsi que les modifications d'aménagement et d'utilisation des territoires ont eu pour conséquences le déplacement d'*I. ricinus* vers des latitudes plus élevées notamment en République Tchèque et en Bosnie-Herzégovine [214].

Selon les régions, l'activité d'*I. ricinus* débute en mars/avril et se termine à l'automne, en octobre/novembre, lorsque les températures diminuent. Ainsi, 2 pics d'activité sont en général observés ; un premier courant mai/juin et un second en septembre/octobre, lorsque les températures sont généralement comprises entre 6 et 25°C [34]. Dans des zones où les températures sont plus froides, un seul pic est observé au courant de l'été. L'activité *I. persulcatus* bien qu'extrêmement proche de celle d'*I. ricinus* peut être légèrement plus courte s'échelonnant de fin avril à début juin dans les biotopes les plus froids. Cette espèce s'étend quant à elle des pays baltiques jusqu'à l'Extrême-Orient.

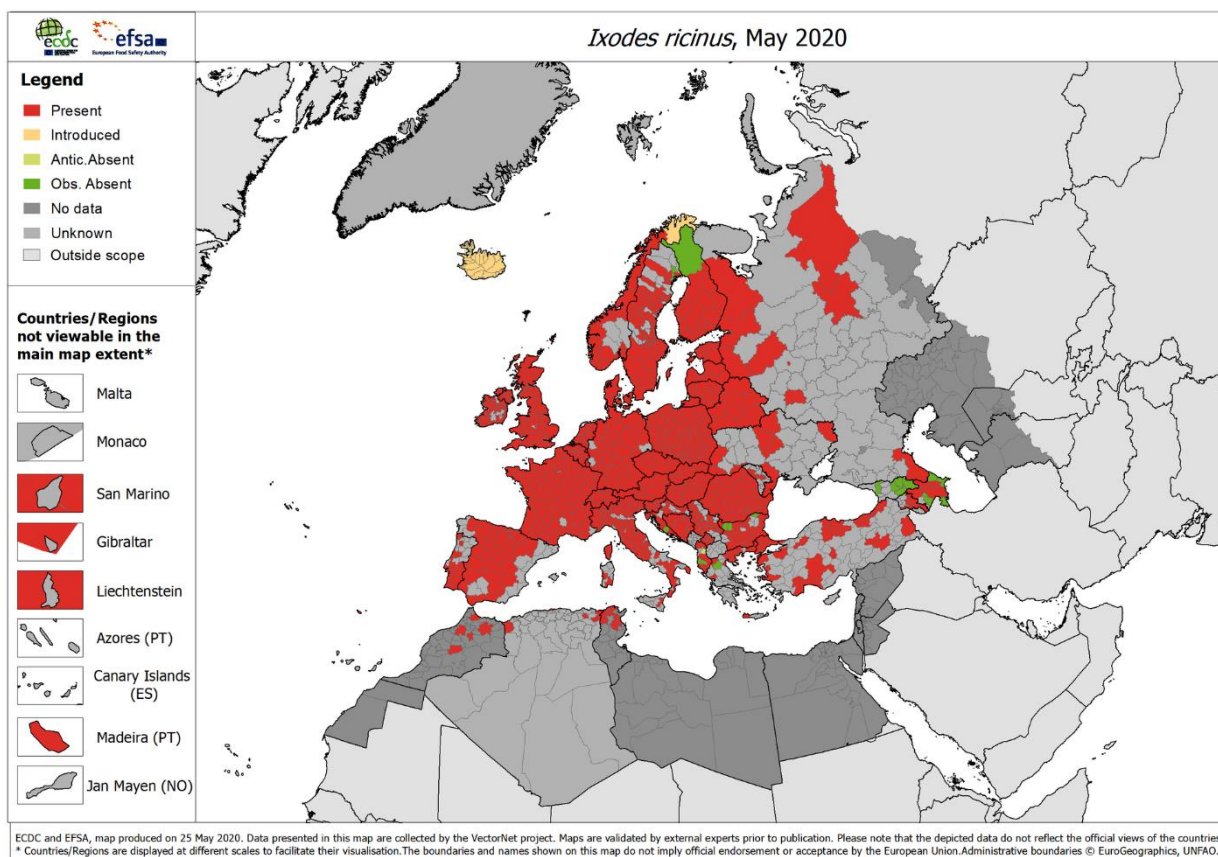


Figure 17. Répartition d'*I. ricinus* en Europe en mai 2020 d'après ECDC

En Europe d'autres tiques dures sont capables de transmettre TBEV, c'est notamment le cas *I. hexagonus*, *I. arboricola*, *Haemaphysalis punctata*, *Ha. concinna*, *Dermacentor marginatus*, *D. reticulatus* [215]. Aussi, la compétence vectorielle d'*I. ricinus*, d'*I. persulcatus*, *I. arboricola*, *Ha. concinna*, *Ha. inermis* et *Ha. punctata* a été démontrée *in vivo* ou à l'état naturelle. *I. scapularis* est une tique proche d'*I. ricinus*. Elle est essentiellement présente aux Etats-Unis (**Figure 18**) et est capable de transmettre le POWV. C'est à ce jour le génome de tique séquencé partiellement annoté se rapprochant le plus de celui d'*I. ricinus* [216].

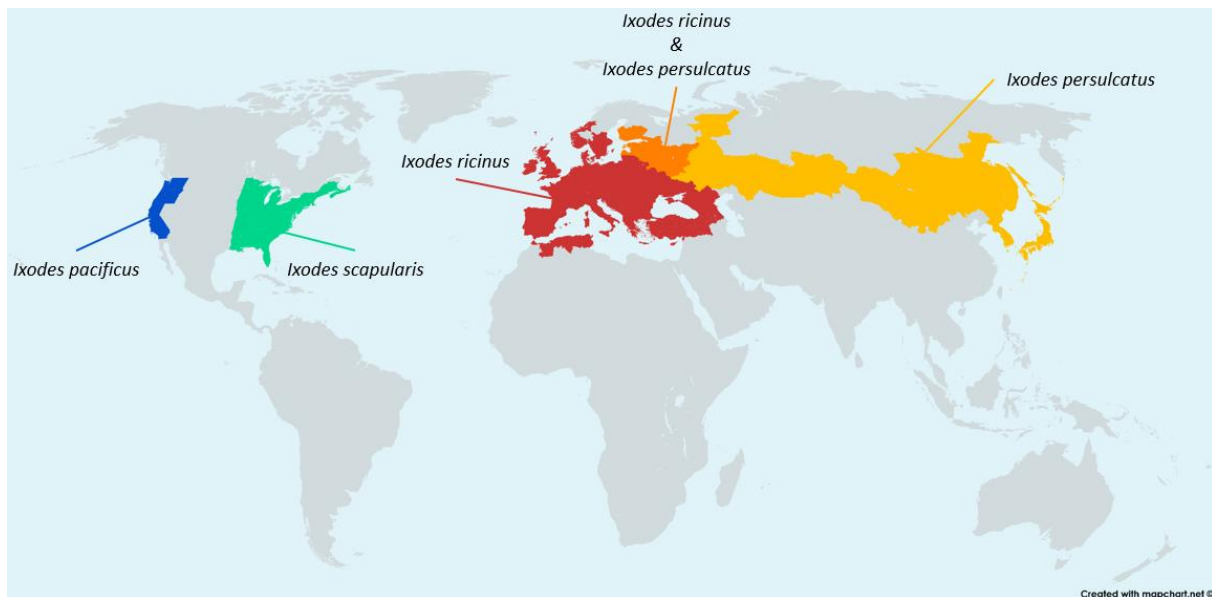


Figure 18. Répartition géographique mondiale des principales espèces de tique Ixodes

(D'après Stanek et *al.*, 2012 et Diuk-Wasser et *al.*, 2016)

I. ricinus est une tique qui est retrouvée sur une large diversité d'hôtes. Ses hôtes réservoirs peuvent être divisées en 3 catégories : les rongeurs, les insectivores et les carnivores (**Tableau 1**). En effet, elle est capable de parasiter plus de 300 espèces différentes allant du mammifère domestique ou sauvage de toutes tailles jusqu'aux oiseaux et aux reptiles [217].

Les hôtes réservoirs de TBEV sont bien souvent des petits mammifères de forêts de type rongeurs [208] (**Tableau 1**). Ayant un taux de reproduction élevé, ces hôtes réservoirs permettent de maintenir le virus et de l'amplifier [218], [219]. Lorsque l'on parle des pathogènes transmis par les tiques, la notion de réservoir définit un vertébré capable de supporter la circulation du pathogène dans son sang pour une période de temps suffisamment longue pour permettre à une tique d'acquérir le virus lors du repas sanguin. La tique possède la particularité d'être à la fois considérée comme hôte vecteur et comme hôte réservoir. En effet, TBEV se maintient dans une population de tique notamment grâce aux transmissions trans-stadiales et aussi grâce à la durée de vie de la tique. Trois hôtes réservoirs sont décrits pour LIV (**Tableau 1**) ; les ovins, les lièvres et Lagopède d'Ecosse [220], [221]. Paradoxalement, la virémie est très élevée chez les perdrix induisant par conséquent une forte mortalité (environ 80%). Ce qui remet en question son statut de réservoir.

Il existe également des hôtes sentinelles ou indicateurs comme les sangliers, les renards, les oiseaux ou les cervidés [222], bien que le rôle de certaines de ces espèces soient controversés. Ces hôtes, ayant des titres viraux très faibles, ne sont pas capables de transmettre le virus à de nouvelles tiques mais leur permettent de se multiplier de façon importante. La détection d'anticorps chez ces hôtes

sentinelles peut ainsi permettre le suivi de la propagation du virus dans une zone donnée [223], [224]. La fluctuation des populations de petits rongeurs influence la dynamique de développement des tiques et donc modifie la dynamique de transmission du virus. La plupart des hôtes infectés ne développeront jamais de maladie suite à l'infection par TBEV, ils sont qualifiés d'asymptomatiques.

La prévalence de TBEV chez la tique est extrêmement variable en fonction de la zone géographique étudiée, du stade de développement de la tique ou encore de la période temporelle choisie. Ainsi, dans certaines régions de Sibérie, la prévalence de TBEV chez son hôte vecteur peut atteindre 40% tandis que cette prévalence varie entre 0,3 et 2% en Bavière [208]. Plusieurs études ont révélé que la prévalence de TBEV chez les tiques *Ixodes* gorgées ou partiellement gorgées et collectées sur des hôtes mammifères (humains et animaux) était plus élevée que chez des tiques à l'affût collectées sur le terrain à partir de la végétation [225]. Différentes hypothèses tentent d'expliquer ce phénomène. La première explication serait que TBEV modifieraient le comportement des tiques en les rendant plus actives et plus agressives lors de leur quête d'un hôte vertébré (humain ou animal). Une seconde hypothèse évoque la possibilité lors du repas sanguin, que le virus se réplique davantage jusqu'à atteindre un titre viral détectable contrairement aux tiques à l'affût où TBEV se répliquerait à bas bruit [226].

LIV peut également être transmis par *Rhipicephalus appendiculatus*, *I. persulcatus*, *Haemaphysalis anatolicum* même si ces vecteurs ne semblent pas jouer un rôle prépondérant dans l'épidémiologie de la maladie [87].

Tableau 1. Résumé des hôtes réservoirs de la tique *I. ricinus*, de TBEV et de LIV

	Hôtes réservoirs		
	Nom scientifique	Nom vernaculaire	
<i>I. ricinus</i>	<i>Apodemus</i>	Mulot	Rongeurs
	<i>Myodes</i>	Campagnol	
	<i>Mus</i>	Souris	
	<i>Microtus</i>	Campagnol	
	<i>Micromys</i>	Rat des moissons	
	<i>Pitymys</i>	Campagnol des bois	
	<i>Arvicola</i>	Campagnol d'eau	
	<i>Glis</i>	Loir gris	
	<i>Sciurus</i>	Écureuil	
	<i>Citellus</i>	Souslik d'Europe	
	<i>Sorex</i>	Musaraigne	Insectivores
	<i>Talpa</i>	Taupe	
	<i>Esinaceus</i>	Hérisson	
	<i>Vulpes (jeunes)</i>	Renard	Carnivores
	<i>Mustela</i>	Belette	
	<i>Capreolus</i>	Chevreuril	Cervidés
TBEV	<i>Apodemus</i>	Mulot	
	<i>Myodes</i>	Campagnol	
LIV	<i>Ovis aries</i>	Mouton	
	<i>Lepus timidus</i>	Lièvre variable	
	<i>Lagopus lagopus scoticus</i>	Perdrix d'Écosse	

Tableau établi à partir des références suivantes : [208], [221], [227]–[229]

2.4.2.1. Acquisition et maintien du virus par la tique

Les cycles de transmission sont souvent représentés sous la forme d'un triangle (**Figure 20**). En effet, ils sont déterminés par des interactions entre les virus, leurs vecteurs et leurs hôtes vertébrés [230]. Il existe plusieurs modes de transmission du virus à la tique. Le premier est la transmission trans-stadiale, c'est dire que la tique acquiert le virus à partir de son stade d'évolution précédent. Le stade nymphe

est d'ailleurs probablement le stade qui est responsable de la transmission la plus importante de TBEV puisqu'elles sont plus nombreuses que les adultes et moins spécifiques d'hôtes. Le second type de transmission est dit trans-ovarienne. Dans ce cas, la tique transmet le virus à sa descendance. Très peu de larves infectées sont issues d'œufs pondus par une femelle infectée (moins de 0,5%). Bien que ce mode de transmission verticale existe pour TBEV et qu'il pourrait permettre, sur le plan théorique, de maintenir le virus dans un foyer donné, un tel processus pourrait aussi engendrer pour le virus, une perte de capacité d'infection d'un hôte vertébré [231], [232]. Ce mode de transmission jouerait un rôle important dans la circulation du virus sur le long terme [233]. Enfin un dernier mode de transmission a été décrit pour un jouer un rôle essentiel dans la transmission du virus : phénomène de cofeeding ou repas partagé. Ce mode de transmission non virémique se définit par le passage du virus d'une tique infectée à une tique saine lors d'un repas sanguin sur un même hôte vertébré qui ne développe pas quant à lui de virémie [234]. Initialement mis en évidence avec la transmission du THOV d'une nymphe de *R. appendiculatus* vers une tique adulte non infectée lors de leur gorgement sur un même cochon d'Inde [235], le cofeeding est également avéré pour TBEV et LIV [236], [237]. Les hôtes non virémiques, impliqués dans cette transmission, jouent un rôle épidémiologique essentiel dans le maintien et la circulation de ces virus dans un environnement [237], [238].

2.4.2.2. Interactions tique-virus

Le virus acquis pendant le repas sanguin va alors poursuivre sa réplication dans les différentes cellules de tique et gagner les glandes salivaires où il pourra être transmis avec la salive au cours d'un nouveau repas sanguin [239].

Le virus va rencontrer plusieurs barrières au sein de la tique qui vont tendre à limiter sa réplication. Ainsi, 2 barrières principales vont se dresser face au virus, la barrière intestinale et la barrière des glandes salivaires (décrites dans la partie 3 de l'introduction). Par ailleurs, le virus doit être capable d'exploiter les propriétés pharmacologiques de la salive de tique afin d'être transmis de façon efficace. La salive de tique contient des protéines et des composés chimiques qui lui permettent de contrôler les réponses immunitaires, inflammatoires et homéostatiques de l'hôte vertébré pendant la prise du repas sanguin. Ainsi, la salive de tique semble contenir une large variété de molécules bioactives comme des protéines se liant aux immunoglobulines ou aux histamines, des régulateurs de l'interféron, des cellules NK ou encore des inhibiteurs du complément.

2.4.2.3. Transmission du pathogène de la tique à l'hôte mammifère

Les agents pathogènes et plus particulièrement les virus, sont transmis à l'hôte via la salive de la tique. Il existe une corrélation entre la compétence vectorielle et les propriétés fonctionnelles de la salive. La transmission du virus s'effectue dès les premières minutes du repas sanguin [211], [212]. Le virus est transmis par la salive via les glandes salivaires. Le titre viral dans la salive augmente de 10 à 100 fois dans les 3 jours qui suivent le début du gorgement.

2.4.2.4. Interactions tique-mammifère

Cette salive est un mélange complexe de plusieurs centaines de molécules différentes. En effet, elle est composée d'eau, d'ions (Na^+ , Cl^-), de molécules non-peptidiques (adénosine, prostaglandines, endocannabinoïdes, microARNs), de protéines de tiques (Chitinases, mucines, ixostatines, cystatines, défensines, glycine-rich, hyaluronidases, Kunitz-type protéines, lipocalines, métalloprotéases) et de protéines de l'hôte (immunoglobulines, haptoglobine, transferrine), d'exosomes (pouvant contenir microRNA, peptides, protéines) et de peptides de tiques (variegines, hyalomines, madanines) [240], [241]. Cette composition est variable et évolue au cours du repas sanguin selon la réponse immunitaire de l'hôte. L'ensemble de ses composants salivaires permettent à la tique d'effectuer son repas sanguin tout en maintenant son homéostasie [242]. Différentes études ont ainsi montré que les pathogènes transmis par la tique utilisaient ces composants salivaires en vue de favoriser leur transmission, ce processus est appelé SAT pour « saliva-assisted transmission » [243]. Ce processus a été mis en évidence chez d'autres espèces d'arthropodes ; la protéine CLIPA3 d'*Aedes aegypti* favorise la réplication et la dissémination de DENV2 chez des souris knock-out pour l'interféron [244] tandis que la protéine LTRIN augmente la pathogénèse de ZIKV [245]. Ainsi, la salive des arthropodes hématophages influence la transmission des pathogènes qu'ils transmettent et ne joue pas seulement un rôle de « milieu de transfert ».

Lors du processus d'attachement, la tique endommage les tissus et les nerfs de l'hôte provoquant chez l'hôte une réponse immunitaire et inflammatoire pouvant se traduire par une vasoconstriction, une agrégation des plaquettes et la formation d'un caillot de fibrine [246], [247]. La plupart des composants salivaires servent à contre-carrer les réponses de l'hôte. On retrouve ainsi des inhibiteurs analgésiques de la bradykinine, des prostaglandines anti-hémostatiques, des modulateurs de la vasoconstriction, des anti-coagulants, des protéines anti-inflammatoires et des inhibiteurs de la cicatrisation [248]–[251].

La réponse immunitaire de l'hôte va évoluer au cours du repas sanguin tout comme les composants salivaires de la tique. Ainsi, neuf clusters de gènes ont été identifiés pour s'exprimer différemment chez la tique au cours du repas sanguin [252].

Les tiques utilisent les chélicères situées au niveau de leurs pièces buccales pour lacérer l'épiderme et le derme de l'hôte et permettre l'entrée de l'hypostome. La forme en harpon de l'hypostome ainsi que le ciment, substance adhésive sécrétée par certaines tiques dont *I. ricinus*, vont permettre un puissant ancrage de la tique sur son hôte (**Figure 19**). La dilacération des tissus induite par la piqûre provoque des dommages tissulaires se traduisant par la rupture de micro-capillaires irrigant le derme et par l'apparition d'un micro-hématome. La tique prenant son repas sanguin dans ce micro-hématome est ainsi qualifiée d'arthropode telmophage.

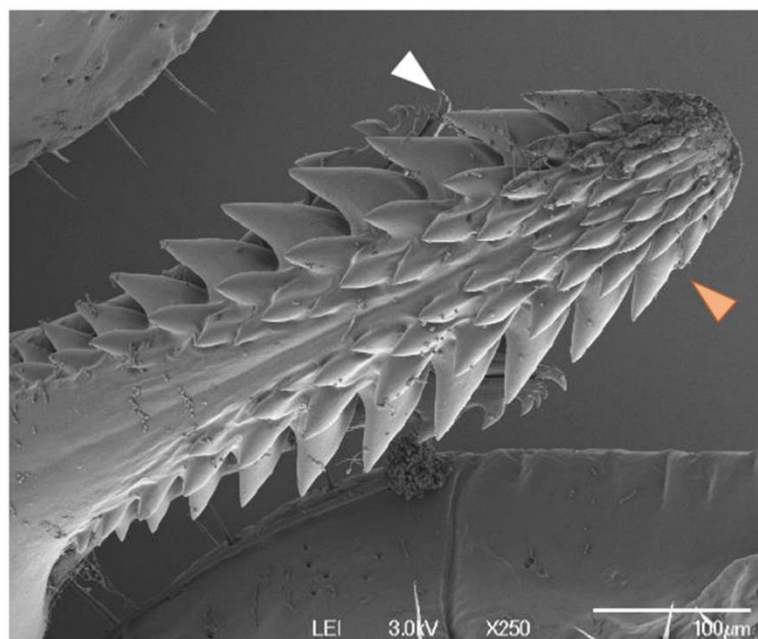


Figure 19. Rostre d'*I. ricinus* au microscope électronique à balayage (250x)

La flèche orange indique l'hypostome et la flèche blanche les chélicères (Photo de T. Blisnick, Unité Biologie Cellulaire des Trypanosomes, Institut Pasteur)

Le repas sanguin ne correspond pas à une ingurgitation de sang. En effet, la tique ne perce pas nécessairement les vaisseaux sanguins. Elle assimile un mélange de sang et de fluides de l'hôte. Le repas sanguin est en fait un échange bidirectionnel entre la tique et l'hôte vertébré. Il y a une alternance entre la phase d'assimilation (ou la tique va concentrer son repas sanguin puisque le sang est composé d'eau à 80%) et la phase de salivation [206].

2.4.3. Autres agents pathogènes

I. ricinus est une tique capable de transmettre un large éventail de pathogènes (**Tableau 2**). Les principaux virus transmis par *I. ricinus* sont essentiellement responsables d'encéphalites chez l'humain à l'exception de LIV qui est principalement symptomatique chez les moutons. Pour les bactéries, ces études ont révélé la sur-représentation de certaines co-infections à *Borrelia* chez la tique [253], [254]. La détection de tels pathogènes a notamment été rendue possible par des études utilisant du NGS et s'est enrichi grâce à des techniques de criblage à haut-débit d'*I. ricinus* collectées à travers plusieurs régions et pays [255]–[258].

Tableau 2. Principaux pathogènes transmis par *I. ricinus*, les maladies et leurs hôtes associés

Pathogènes		Maladie associée	Hôte
Virus	TBEV	Encéphalite à tique	Humain
	LIV	louping ill	Animal (ovins)
	Eyach	Encéphalite	Pouvoir pathogène soupçonné chez l'homme
	Uukuniemi	Neuropathie	Non pathogène pour l'homme mais séroprévalence élevée dans la population scandinave
	Thogoto	Méningo-encéphalite	Provoque des avortements chez les brebis 3 cas de méningoencéphalites humaines dont 1 décès causé par le virus Thogoto au Nigéria et 5 cas humains causés par la manipulation du virus Dhori en laboratoire
Bactéries	<i>Anaplasma</i>	Anaplasmose granulocytaire	Humain Animal (chiens, ruminants, chevaux)
	<i>Bartonella</i>	Bartonellose	Animal (chats) et humains lorsque transmis par les chats: maladie des griffes du chat
	<i>Borrelia</i>	Maladie de Lyme	Humain
	<i>Coxiella burnetii</i>	Fièvre Q (coxiellose)	Humain
	<i>Francisella tularensis</i>	Tularémie	Humain
	<i>Rickettsia</i>	Rickettsiose	Humain
Protozoaires	<i>Babesia</i>	Babésiose	Humain Animal (bovins)

2.4.4. Microbiote des tiques

L'étude des bactéries symbiotiques présentes chez les tiques et leurs rôles dans la structure des populations ainsi que leur influence dans les interactions entre les tiques et leurs hôtes est un pan de recherche essentiel. Chez les arthropodes, les bactéries symbiotiques sont notamment connues pour apporter un avantage nutritionnel de par l'apport d'acides aminés essentiels ou encore de vitamine B [259]. Ces symbioses fournissent aussi des avantages écologiques au vecteur comme une tolérance à la chaleur, la résistance à certains prédateurs, parasites, maladies ou tolérance à des insecticides [260], [261]. Par exemple, des tiques *Amblyomma hebraeum* et *I. persulcatus* infectées par TBEV seraient plus sensibles aux pesticides organophosphatés (Dursban) que des tiques non infectées [262]. Ainsi, il est envisageable que les endosymbiontes de tiques modulent la compétence vectorielle, la résistance à un stress abiotique, à un pathogène ou l'influence de l'affinité pour hôte. Depuis quelques années, le rôle du microbiote de plusieurs organismes sur leur biologie, leur écologie et leur évolution ne cesse d'être enrichi. Aussi, l'étude du microbiote de la tique pourrait fournir de nouvelles cibles dans la lutte antivectorielle [263]–[265].

2.5. Futurs défis dus aux changements climatiques

De nombreux paramètres entrent en jeu dans la distribution des différentes espèces de tique, comme les facteurs biotiques (interactions entre espèces), abiotiques (climat), historiques (phénomène de spéciation) et anthropogéniques (**Figure 20**) [266]. Toutefois, le climat est un facteur essentiel pour prédire la distribution des arthropodes vecteurs [267]. En effet, les changements climatiques influent indirectement et en partie sur l'émergence et la réémergence de certaines maladies à tiques rendant alors les populations humaines et animales plus vulnérables. L'émission de gaz à effet de serre est connue pour accélérer le processus de changement climatique ayant pour conséquence une augmentation des températures au niveau mondial [268]. Ces fluctuations climatiques influencent directement la distribution et la survie des tiques et donc par extension, les pathogènes qu'elles transmettent [214]. Ainsi, les modifications climatiques interfèrent dans l'épidémiologie des maladies à tique en changeant l'écologie des tiques [269].

Les tiques et les pathogènes qu'elles transmettent ont co-évolué avec différents animaux de la faune sauvage jusqu'à atteindre un certain niveau d'équilibre. Ces animaux, également appelés hôtes, constituent souvent un réservoir pour les tiques et les pathogènes qu'elles transmettent alors aux hommes et aux animaux d'élevage.

Cet état d'équilibre peut être perturbé lorsque les animaux réservoir de la faune sauvage entre en contact avec des animaux d'élevage. Ainsi, ce déséquilibre peut être induit soit par l'introduction

d'animaux d'élevage dans des régions où des tiques porteuses de pathogènes sont présentes soit par le déplacement d'animaux d'élevage infectés et porteurs de tiques dans des zones jusqu'alors dépourvues de ce pathogène. L'introduction de bovins dans des régions d'Afrique alors pourvues de tiques *Rhipicephalus appendiculatus* transmettant l'agent causal de la theilériose bovine illustre ce phénomène [270]. D'autre part, l'introduction des tiques *Rhipicephalus (Boophilus)* sur le continent américain illustre également l'implication de l'homme dans la perturbation de l'équilibre faune sauvage et faune domestique [5]. En effet, cette introduction des tiques *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* et *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aurait pris place suite à l'importation de bétail en provenance d'Espagne et arrivé au Texas via le Mexique et les Antilles lors de la conquête du Nouveau Monde par les colons espagnols. L'agent étiologique de la babésiose, aussi appelée fièvre du Texas, transmis par ces tiques s'est alors répandu au travers des Etats-Unis au cours du 18^{ème} siècle conduisant le gouvernement fédéral à prendre des mesures pour lutter contre cette épizootie. C'est dans ce contexte qu'est apparu en 1906 le programme d'éradication « Cattle Fever Tick Eradication Program » imposant la mise en quarantaine des animaux importés et le traitement par bain d'acaricides des animaux à risque. A ce jour et depuis 1943, les Etats-Unis sont exempts de babésiose bovine à l'exception d'une zone située à la frontière entre le Texas et le Mexique, appelée zone tampon, où la maladie continue de sévir [271]–[273].

Ainsi, la présence d'un pathogène est corrélée à celle de son vecteur elle-même en lien avec des facteurs biotiques et abiotiques.

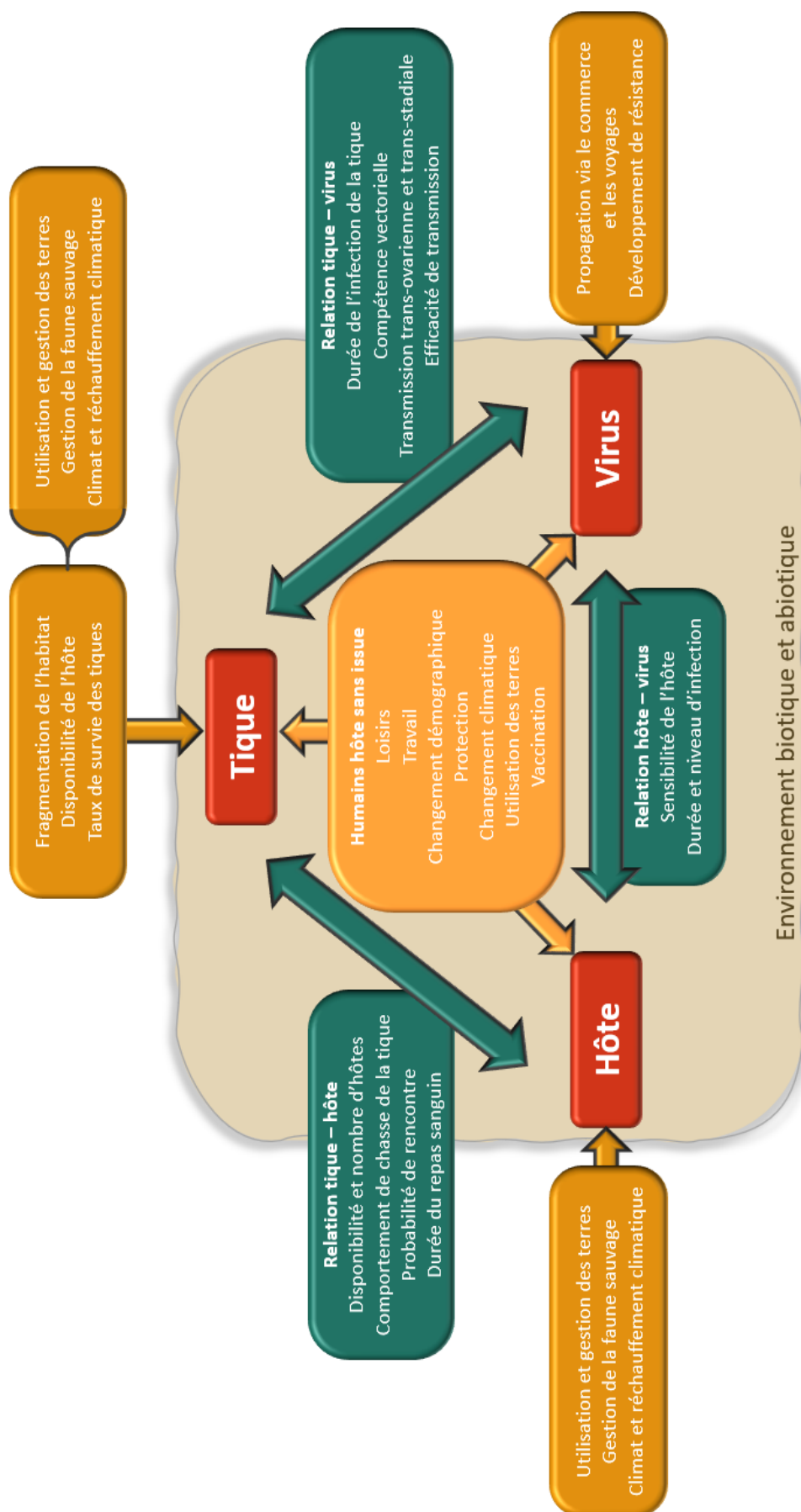


Figure 20. Influence des facteurs biotiques et abiotiques sur les interactions tique – hôte – virus
(Adapté de Rizzoli et al., 2014)

2.6. Les moyens de lutte contre les tiques

Une des premières façons de lutter contre les maladies à tique a été d'établir des stratégies de contrôle ou d'éradication des populations de tiques [274], [275]. Les acaricides ont été largement utilisés à ces fins, avec pour conséquence, l'apparition de populations de tiques résistantes à ces traitements chimiques [276].

C'est après la seconde guerre mondiale que les pesticides issus des premières molécules de synthèse sont utilisés dans la lutte contre les tiques. Les organochlorées (DTT, Lindane, Dieldrine, Toxaphène) et les dérivés arsenicaux voient peu à peu le jour et avec eux, l'apparition de tiques résistantes et des effets néfastes sur l'environnement. Dans les années 1960, ce sont les organophosphorées (chloropyrifos, chlorfenvinphos, coumaphos, malathion, diazinon, ethion, ...) qui entrent en jeu dans la lutte chimique contre les tiques mais là aussi, l'apparition de résistances en font des composés dont l'utilisation se raréfie [277]. La recherche dans ce domaine a conduit à l'élaboration de molécules de synthèse comme la deltaméthrine et la perméthrine, inspirée de la pyrèthrine naturelle mais plus stables que cette dernière [278]. L'amitraz et le fipronil sont également deux substances actives de pesticides utilisés dans la lutte contre les tiques [279]. Le DEET (N,N-Diethyl-meta-toluamide) a montré une certaine efficacité contre *I. ricinus* [280], bien qu'une infection de cette espèce de tique par TBEV la rende moins sensible à ce répulsif [226].

Ces composés utilisés depuis 70 ans sont principalement des neurotoxiques agissant au niveau neuronal chez la tique via l'atteinte de différents systèmes comme le système GABAergique, dopaminergique, ou encore dans les mécanismes de dégradation de neurotransmetteurs comme l'acétylcholine. L'utilisation de phéromones, molécules permettant aux tiques et aux insectes de communiquer, pourrait permettre une lutte chimique plus ciblée. En effet, l'attraction des tiques, de par ces phéromones, combinée à l'utilisation d'acaricides au niveau des sites d'émission, permettrait de mieux maîtriser l'exposition aux acaricides [281]–[283]. Dès lors, des méthodes de lutttes plus respectueuses de l'environnement et évitant la sélection de tiques résistantes aux acaricides, en somme des méthodes de lutttes plus durables, sont privilégiées. Elles font ainsi appel à des connaissances interdisciplinaires allant de la chimie à l'écologie, en passant par la biologie de la tique et la pharmacologie [284], [285].

Peu de vaccins contre les maladies virales à tiques sont disponibles aujourd'hui. Une des limites des vaccins antiviraux conventionnels contre celles-ci est la diversité des espèces virales transmises. Un concept se développe alors avec l'idée d'un vaccin ciblant le vecteur et non les pathogènes qu'il transmet [286]. Deux concepts de vaccins anti-tiques sont alors proposés, ceux ciblant les antigènes

exposés au système immunitaire de l'hôte lors du repas sanguin, c'est le cas des antigènes salivaires, et à l'inverse ceux visant les antigènes qui ne sont pas exposés au système immunitaire comme les antigènes de l'épithélium intestinal [287]. En 1988, la découverte d'un antigène exprimé à la surface de l'épithélium intestinal des tiques et nommé Bm86 [288] marque un tournant dans le développement d'un vaccin contre les tiques. Deux vaccins dirigés contre Bm86 sont ainsi développés au début des années 1990 [289] et commercialisés sous les noms de Gavac™ à Cuba et TickGARD™ en Australie [290], [291]. Néanmoins, des questions relatives au coût et à l'efficacité de ces vaccins se sont posées. En effet, plusieurs injections étaient nécessaires et l'efficacité apparaissait comme dépendante des espèces (taux de protection variant de 0 à 80% en fonction des populations tiques). Ces éléments ont alors conduit à l'arrêt de la commercialisation de TickGARD™.

Différentes molécules impliquées dans la transmission des pathogènes ou dans la modulation des réponses de l'hôte au site d'infection de la tique ont été découvertes et représenteraient des potentiels candidats vaccin [292]. D'autres molécules influent quant à elles sur les populations de tique, et représenteraient une autre stratégie vaccinale. La ferritine par exemple, est une protéine essentielle impliquée dans le transport de du noyau hème de l'hémoglobine de l'intestin vers l'hémolymphe. Une vaccination contre cette molécule a révélé un impact sur la fertilité, l'oviposition et le gorgement de la tique *I. ricinus* [293], [294]. La vaccination de souris avec un vaccin dérivant de la protéine de tique 64TRP de *R. appendiculatus* a montré une efficacité contre la transmission de TBEV par *I. ricinus* [295]. En somme, l'utilisation de plusieurs antigènes pourraient s'avérer être une stratégie de vaccination plus efficace, de par le blocage du gorgement et/ou de la transmission d'agents pathogènes. Ces vaccins « cocktails » permettraient également de diminuer l'éventuelle sélection de souches de tiques résistantes [296].

La lutte contre les tiques passe également par des moyens biologiques en utilisant différents organismes néfastes pour ces dernières. L'hyménoptère *Ixophagus hookeri* est un organisme délétère retrouvé chez la tique. Des lâchers de ce parasite ont ainsi eu lieu sur le terrain mais l'opération nécessite d'être répétée fréquemment car il s'est avéré que cet hyménoptère persistait mal dans cet environnement [297]. Les recherches d'organismes entomopathogènes se sont alors portées sur des bactéries du genre *Bacillus* [298] et des champignons *Beauveria bassiana* et *Metarhizium anisopliae* [299], [300]. Bien que ces recherches démontrent une efficacité relative, la production et la diffusion à grande échelle de tels organismes dans la nature pose question avec notamment le risque d'atteindre des espèces non ciblées.

Des populations de tiques ayant des différences génétiques peuvent varier dans leur capacité à héberger un agent pathogène, modifier leurs comportements et leurs préférences de prédation ainsi

que leur affinité pour l'homme. Ainsi, comprendre et étudier la façon dont les variations génétiques des vecteurs tiques s'établissent permet de concevoir des stratégies de contrôles et de luttes efficaces et durables. Ces différentes populations génétiques de tiques peuvent également répondre de manière différente à ces stratégies de lutte en étant par exemple plus ou moins résistantes à un acaricide, en fonction de leur préférence d'hôte ou dans la probabilité de rencontrer un hôte vertébré [301]–[303]. La lutte génétique repose sur des lâchers de tiques génétiquement modifiées devant prendre le dessus sur des populations sauvages. Ainsi, l'extinction de l'expression de la subolesin, protéine impliquée dans de nombreuses voies métaboliques [304] par ARN interférence génère la production de mâles stériles [305]. Ce moyen de lutte soulève toute fois la question des lâchers d'arthropodes génétiquement modifiés dans la nature.

3. Immunité antivirale des arthropodes

A la différence des vertébrés où la lutte contre les infections virales se décline en 2 volets, réponse innée et réponse adaptative [306], [307], l'immunité des arthropodes est fréquemment résumée par la seule réponse immunitaire innée. Toutefois, quelques exemples tendent à suggérer qu'une réponse immunitaire adaptative, s'apparentant à celle des vertébrés, pourrait exister chez les arthropodes. Par exemple, les hémocytes de *Drosophile* sont capables de convertir l'ARN viral génomique en ADN viral qui sert alors de matrice à la synthèse *de novo* d'ARN viral et conférant ainsi une protection systémique à la drosophile [308], [309].

Lorsqu'un arthropode vecteur effectue son repas sanguin et acquiert un arbovirus, ce dernier doit s'affranchir de plusieurs barrières physiques au sein du vecteur et faire face aux réponses cellulaires et humores avant de pouvoir être transmis à un nouvel hôte vertébré [310]. Ainsi, les virus transmis par la tique doivent cheminer à travers différentes barrières physiques de la tique telles que l'intestin, les glandes salivaires et les ovaires (**Figure 21**). Chacun de ces éléments joue un rôle clé dans la compétence vectorielle, en particulier l'intestin. En effet, bon nombre de virus persistent au niveau de cet organe pendant les phases de mue du vecteur mais également au cours des repas sanguins. Après avoir franchi la barrière intestinale, les virus vont être confrontés à des mécanismes de défense cellulaires et humores au niveau de l'hémolymphe de la tique. L'intestin des arthropodes est riche d'une large variété de bactéries qui influencent la compétence vectorielle de l'arthropode [311]–[314]. L'infection de l'intestin par un pathogène induit la production de peptides antimicrobiens (PAMs), l'augmentation du nombre d'hémocytes et l'activation de cascade de signalisation et de la phagocytose [315]. Il est donc essentiel pour le virus d'être capable de faire face aux réponses

immunitaires de la tique et de les contourner afin de survivre, sans toutefois induire une importante pathogénicité.

L'efficacité de transmission de l'ensemble des agents pathogènes repose sur différents aspects de la physiologie du vecteur, notamment le volume de sang ingéré lors du repas sanguin ainsi que la durée de ce dernier. De plus, l'acquisition et la transmission de ces agents sont facilitées par différentes molécules présentes dans la salive de la tique et qui sont impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire de l'hôte et dans la réponse inflammatoire.

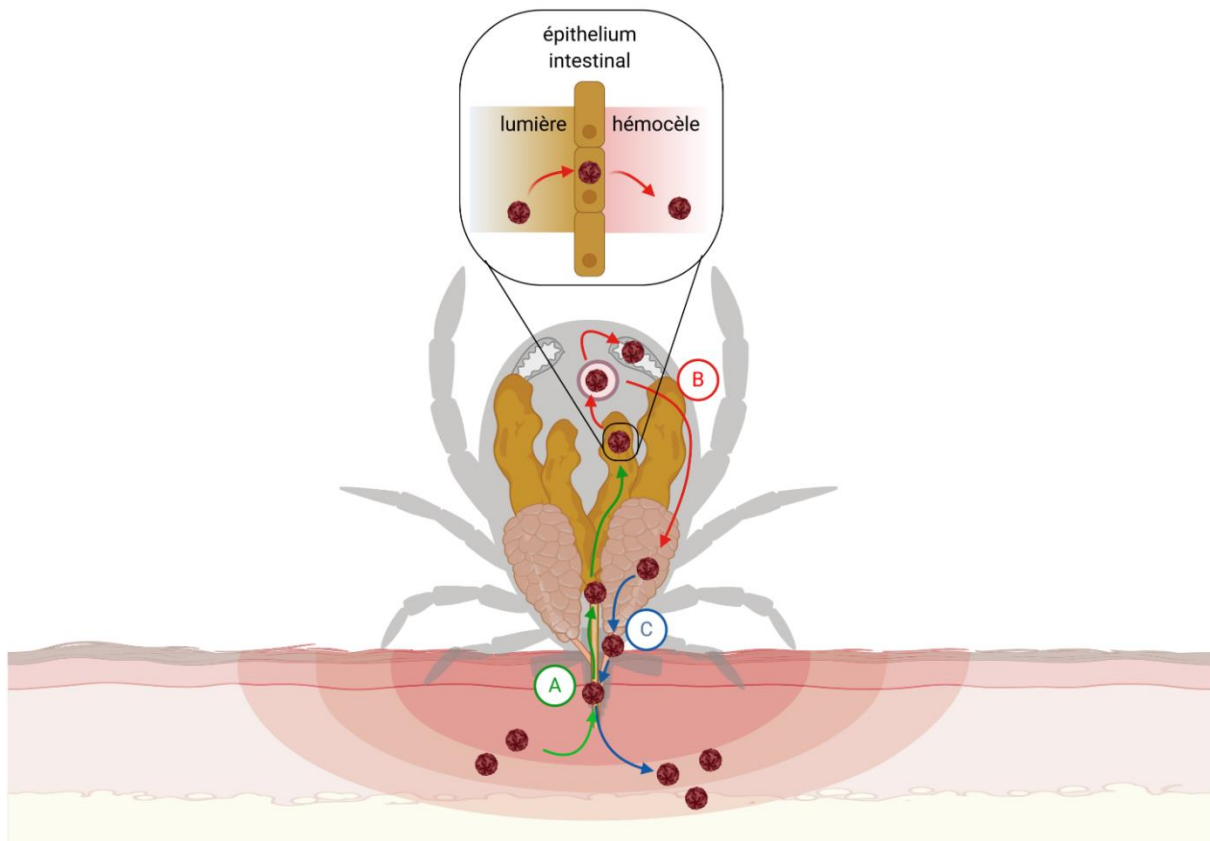


Figure 21. Représentation schématique du cycle de vie d'un arbovirus chez la tique.

Le cycle de vie d'un arbovirus au sein du vecteur tique peut se résumer en 3 phases majeures. **(A)** La première consiste en l'acquisition du virus. Cette étape débute par la prise d'un repas sanguin sur un hôte infecté. **(B)** Le virus atteint ensuite l'intestin où il va devoir franchir la barrière intestinale pour gagner l'hémocèle afin de se disséminer via l'hémolymphes dans tout l'organisme et de se multiplier. **(C)** Une fois dans les glandes salivaires, le virus peut alors être transmis à un nouvel hôte lors d'un repas sanguin. Au cours de ces différentes étapes, le virus est soumis à de multiples mécanismes de défenses immunitaires mis en place par la tique.

Les tiques possèdent ainsi des mécanismes de défenses leur permettant de maintenir les virus à un niveau d'équilibre de telle sorte que le vecteur soit infecté pendant une longue période sans effets néfastes apparents sur son développement et son cycle de vie [316]. Cet état d'équilibre permet

d'établir des infections virales plus bénignes et durables rendant la tique capable d'agir comme réservoir pour le virus [317] (**Figure 22**).

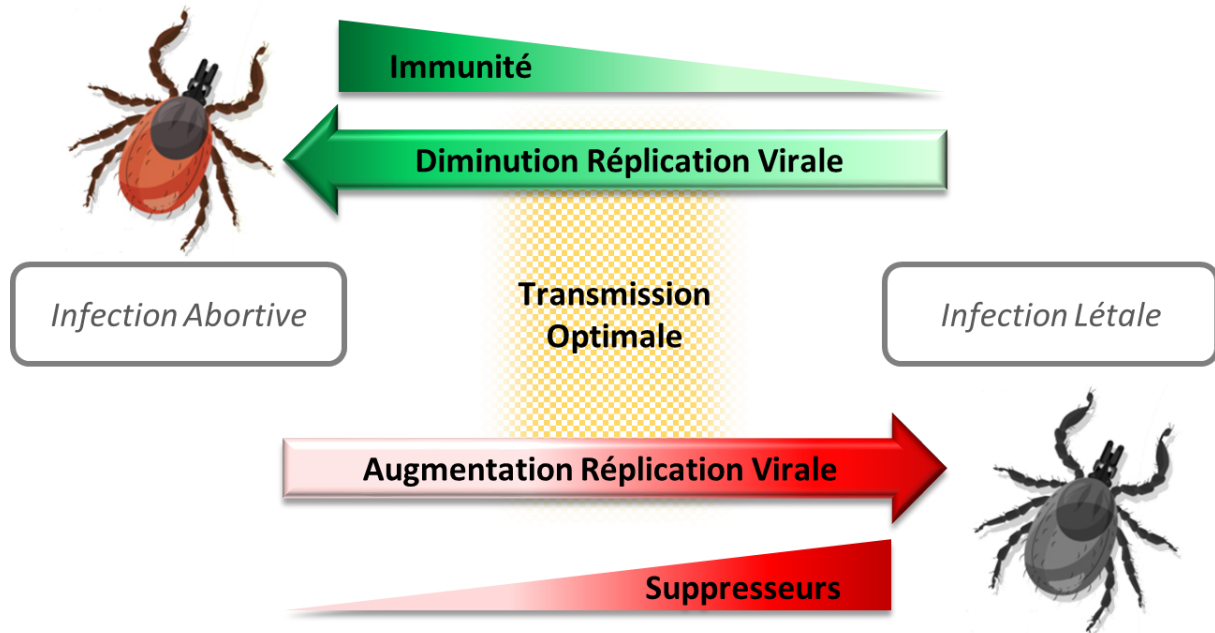


Figure 22. Modèle simplifié des conditions d'infection optimales nécessaires à la transmission de virus par les tiques.

La transmission d'un virus par une tique à un hôte vertébré nécessite des conditions spécifiques. En effet, si les processus de défense antivirale mis en place par l'arthropode sont trop importants, l'infection virale ne persistera pas à au sein de l'organisme et conduira à l'élimination total du virus aussi appelé infection abortive. Au contraire, si les supresseurs viraux parviennent à déjouer la réponse immunitaire antivirale, alors l'infection deviendra létale pour la tique. La transmission optimale se situe donc à un état d'équilibre entre la réponse immunitaire et la réplication virale (Adapté de Samuel et *al.*, 2018).

La majorité des connaissances sur l'immunité antivirale des arthropodes a principalement été générée par des études portant sur les insectes comme la mouche du vinaigre *Drosophila melanogaster* et les moustiques [318]–[322]. Toutefois, certains résultats émanent de travaux réalisés sur les crustacés [323], [324], qui sont plus proches de la tique phylogénétiquement que les insectes [216].

La réponse immunitaire innée se caractérise communément par la reconnaissance de motifs moléculaires associés aux pathogènes (pathogen-associated molecular patterns ; PAMPs) via des récepteurs de reconnaissance de motifs moléculaires (pattern recognition receptors ; PRR) qui initient des cascades de signalisation conduisant à la production de molécules effectrices antimicrobiennes. Les arthropodes possèdent un spectre de mécanismes antiviraux pour prévenir et contrôler l'infection.

Cela inclut les voies de l'ARN interférence (ARNi) [325], les peptides antiviraux comme les défensines [326] et la détection des pathogènes via les récepteurs Toll [327].

3.1. Les voies de l'ARN interférence (ARNi)

Chez les eucaryotes, les petits ARNs jouent un rôle essentiel dans la régulation de mécanismes biologiques. A ce jour, trois classes de petits ARNs ont été décrits : les petits ARN interférents (siARN ; small interfering RNA), les microARN (miARN) et enfin les petits ARN associés à PIWI (piARN). L'ensemble de ces petits ARNs possède des fonctions et des caractéristiques différentes comme leur biogenèse, leur taille, leur modification et leur cible. Ces trois classes de petits ARNs entrent en jeu dans les interactions hôtes-virus chez les arthropodes.

Chez la tique, les mécanismes de l'ARNi sont peu connus toutefois le génome de l'espèce *I. scapularis* contient tous les éléments nécessaires à la machinerie endogène et exogène de l'ARNi telles que les protéines Dicer, Argonautes, les protéines de liaison au ARNdb, les exonucléases et les ARN polymérases ARN dépendantes [328].

Cette voie de réponse antivirale, présente chez les arthropodes, est également retrouvée chez de nombreux organismes tels que les plantes et les invertébrés [329].

3.1.1. Dicer et Argonaute

Les trois voies de l'ARNi font intervenir diverses protéines dont les protéines DCR (uniquement dans les voies des siARN et miARN), endoribonucléases qui vont cliver les acides nucléiques. Le rôle clé de DCR2 et AGO2 dans la voie des siARN, et donc dans la défense antivirale, a été mis en évidence par l'établissement de différentes mutations chez Ago2 et Dcr2 de la drosophile. Ces mutations sont associées à une perte de contrôle sur la réplication virale [330]–[332].

Les voies de l'ARNi reposent également sur une famille de molécules appelée Argonaute (AGO). Au nombre de 5 chez la drosophile, (AGO1, AGO2, AGO3, Aubergine (AUB), PIWI), ces facteurs interagissent avec des petits ARNs et s'en servent de guide afin de reconnaître les séquences complémentaires des transcrits ciblés. Ces facteurs vont ainsi inhiber la traduction de ces transcrits ou induire leur dégradation [333].

3.1.2. siARN

Les siARN peuvent être classés en 2 catégories, les siARN d'origine endogène et ceux d'origine exogène [333]. Les siARN endogènes dérivent de rétrotransposons et d'ARN génomique pouvant former des

ARNdb par chevauchement ou en raison de structures secondaires locales. La production de siARN dépend de la voie de l'ARNi de l'hôte. Ils vont ainsi permettre de réguler les éléments génétiques mobiles (transposons) et les transcrits de l'hôte. Les siARN d'origine exogène sont quant à eux issus d'acides nucléiques étrangers principalement viraux. La voie des siARN exogènes est considérée comme la voie antivirale majeure chez les vecteurs d'arbovirus, notamment chez les moustiques [334], avec un mécanisme proche de celui observé chez la drosophile [318], [335].

La voie des siARN débute par la reconnaissance d'un ARNdb en tant que PAMP par DCR2. Plusieurs parties du génome viral peuvent alors servir de matrice à l'élaboration de ces siARN viraux (viARN). En effet, la matrice peut provenir d'ARNdb issus d'intermédiaires de réplication, de structures secondaires ponctuelles au sein du génome viral, de virus codant des siARN ou encore de chevauchement de transcrits viraux [336]. Associée à la protéine R2D2 [337], l'ARNdb est clivé par DCR2 en viARN [338] mesurant généralement 21 nucléotides chez les arthropodes. Lors du clivage, le viARN double-brin est recruté par le complexe RISC (RNA-induced silencing complex) composé de la protéine AGO2. Cette protéine se charge alors d'incorporer le brin d'ARN dit « guide » au sein du complexe RISC [339] tandis que l'endonucléase C3PO se charge de cliver le brin ARN dit « passager » [340]. Le brin guide est alors utilisé pour reconnaître les séquences d'ARN complémentaires tels que les ARNsb viraux. Lors de l'hybridation avec l'ARN cible, AGO2 clive cette cible conduisant à la suppression de l'intermédiaire de réplication dans le cas où l'ARN ciblé est d'origine virale [341] ou induisant l'extinction de gène, si l'ARN ciblé est cellulaire (**Figure 23**).

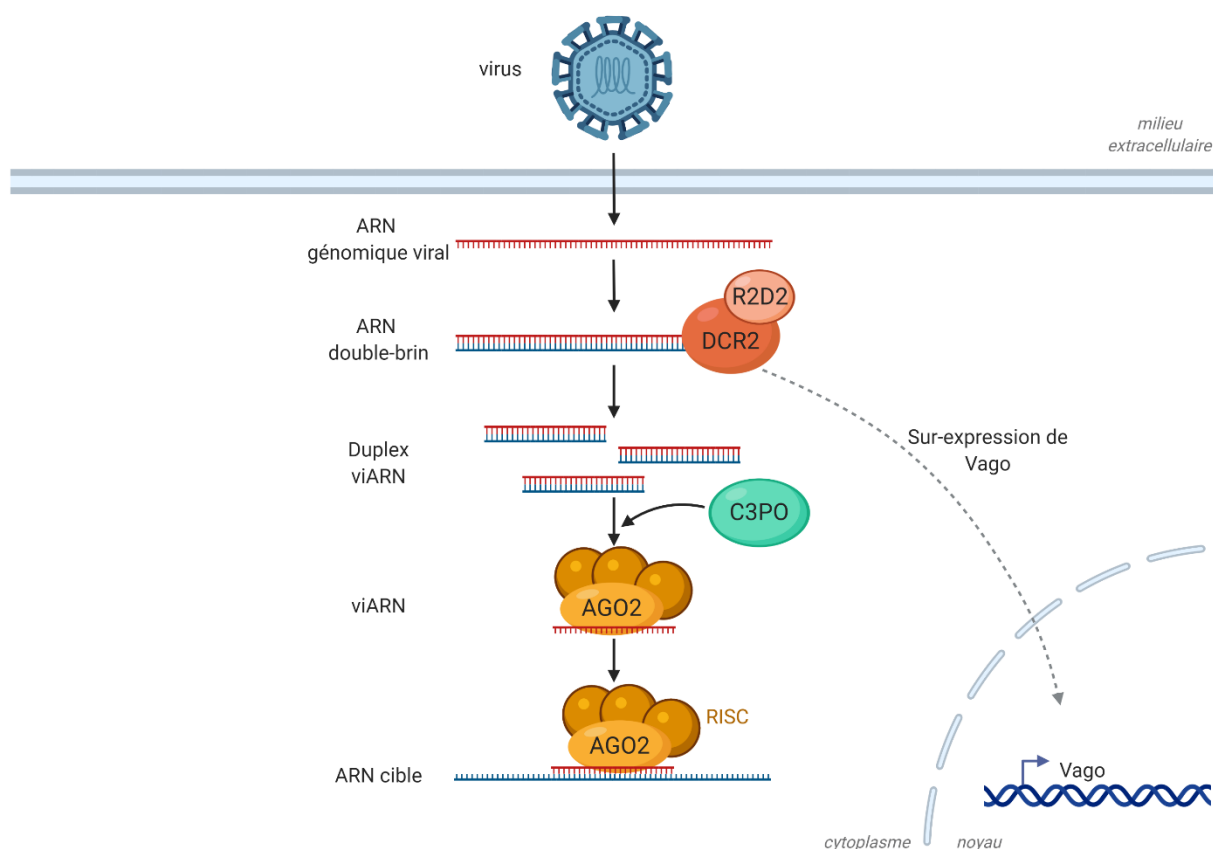


Figure 23. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des siARN chez les arthropodes

L'importance de la voie des siARN dans le système de défense antivirale a notamment été mise en évidence par l'inhibition de cette voie chez le moustique infecté par le SINV. Une augmentation de la pathogénèse a ainsi été observée accompagnée d'une hausse de la production virale [342]. Chez *D. melanogaster*, la prise en charge de siARN au niveau du complexe RISC requerrait l'intervention de la machinerie des protéines de choc thermique HSP70/HSP90. Ces résultats obtenus *in vitro* suggèrent que les HSP joueraient un rôle antiviral en appuyant la voie des siARN [343]. Le rôle de DCR2 en tant que PRR a été décrit chez les moustiques du genre *Culex* notamment de par sa capacité à induire la sécrétion d'une cytokine, appelée VAGO, dont les fonctions seraient similaires à celles de l'interféron chez les mammifères. DCR2 permettrait ainsi d'activer indirectement la voie JAK/STAT (Janus Kinase/Signal Transducers and Activators of Transcription), accentuant alors le rôle des siARN dans la réponse antivirale [344]. Toutefois, les mécanismes d'activation de VAGO par DCR2 sont encore peu connus. Chez *Ae. aegypti*, la protéine p400, orthologue de l'hélicase Domino chez la drosophile, régule la voie antivirale des siARN exogènes et l'expression d'Ago2 [345].

Chez l'abeille *Bombus terrestris*, les virus de la paralysie aigüe israélienne (IAPV) et le virus de la paralysie lente de l'abeille induisent l'expression de DCR2 (Niu et al., 2016).

L'efficacité d'une immunité antivirale basée sur siARN repose sur une propagation systémique du signal ARNi à l'ensemble de l'organisme [346]. Une ARNi systémique ainsi que l'amplification de petits ARNs par une ARN polymérase ARN dépendante (RdRp) ont été observés chez les plantes [347]. Les tiques semblent posséder des séquences codant une RdRp mais son rôle dans l'amplification de petits ARNs n'a jusqu'alors pas été démontré [328]. Par ailleurs, des composants de la prise en charge des ARNdb ont été identifiés dans des cellules de drosophile [348]. Cet insecte ne possède pas de RdRp mais l'hypothèse d'un mécanisme d'amplification du signal ARNdb via l'intégration d'une copie d'ADN dans le génome des cellules infectées a été proposée [349]. Une étude menée chez la tique *Haemaphysalis longicornis* a constaté le rôle essentiel du récepteur CD36 dans la propagation systémique de l'ARNi au sein de la tique [350].

De plus, le séquençage à haut débit des siARN produits consécutivement à une infection virale a permis d'établir que leur taille est quasi-exclusivement de 21 nucléotides chez la drosophile et le moustique tandis que la tique *I. scapularis* génère des siARN de 22 nucléotides après une infection *in vitro* par le virus Langat (LGTV) [325]. Bien que des observations similaires puissent être attendues chez la tique *I. ricinus*, il semble qu'aucune étude, *in vitro* ou *in vivo*, ne se soit attachée à caractériser cette voie des siARN apparaissant au cours de l'infection par TBEV et LIV.

Différentes études ont ainsi permis d'établir que la voie des siARN joue un rôle primordial dans la défense contre les infections virales, en particulier chez la drosophile. Ce processus a pu être démontré avec différents virus à ARN au génome simple ou double brin et de polarité positive ou négative. Néanmoins, l'implication de la voie des siARN dans le contrôle de l'infection par des virus à ADN a été mise en évidence chez les plantes mais pas chez la drosophile [351].

3.1.3. miARN

Chez les mammifères, les plantes et les invertébrés, les miARN jouent un rôle crucial dans la régulation de l'expression de gènes au niveau post-transcriptionnel [352]. Ces petits ARNs sont connus pour réguler finement l'expression des gènes en modulant la disponibilité des ARNm pour leur traduction en protéine.

La biosynthèse des miARN débute dans le noyau, par la transcription des ARNm cellulaires par l'ARN polymérase II. Ces ARNm cellulaires forment des structures secondaires appariées qui servent alors de matrice à la synthèse de miARN. Ces ARNdb possédant des structures tige-boucle appelés miARN primaires (pri-miARN). Au sein du noyau, ces pri-miARN sont reconnus et clivés en précurseurs de miARN (pré-miARN) d'environ 70 nt par un complexe protéique formé de la RNaseIII Drosha et de la protéine de liaison au ARNdb appelée Pasha. Ce clivage aboutit à la formation d'un excédent de 2 nt en 3' de la séquence. Une fois exporté dans le cytoplasme, le pré-miARN voit sa transformation se

poursuivre via la protéine DCR1 et son cofacteur Loquacious libérant alors un duplex de miARN/miARN de 21-24 nt. A la différence des siARN, ce duplex n'est pas entièrement double-brin. L'un des brins, appelé guide, est pris en charge par AGO1, un constituant du complexe RISC. Ce brin sert ainsi à la dégradation d'ARN ou à l'inhibition de leur traduction grâce à une hybridation partielle ou complète avec l'ARN ciblé [353] (**Figure 24**).

Bien que ce mécanisme soit largement conservé chez de nombreux organismes, quelques différences notables ont été relevés entre certains arthropodes comme les moustiques [354], [355] et les tiques [356]. L'existence des miARN a été rapportée chez différentes espèces de tiques à savoir *Ha. longicornis* [357], *H. anatolicum* [358], *R. haemaphysaloides* [359], *R. microplus* [356] et *R. sanguineus* [360]. Une analyse des miARN exprimés dans les glandes salivaires et dans l'intestin d'*I. ricinus* semble indiquer qu'ils pourraient moduler la réponse de l'hôte intervenant dans l'attachement de la tique et le repas sanguin [361]. En cellules d'*I. scapularis*, *A. phagocytophilum* modifie l'expression des miARN facilitant ainsi l'infection [362]. Une étude récente portant sur la caractérisation des miARN exprimés dans les glandes salivaires d'*I. scapularis* en condition infectieuse a mis en évidence une expression différentielle des miARN des glandes salivaires lorsqu'elles étaient infectées avec POWV comparé à une condition non infectée. Ainsi, la présence de certains miARN (isc-miR-124 et isc-miR-184) dans les glandes salivaires favoriseraient l'infection à POWV tandis que d'autres miRNA (isc-miR-315, isc-miR-5307, miR-nDS630914_20990, and miR-nDS752087_3745) pourraient limiter la réplication virale et la transmission à l'hôte [363]. Chez les moustiques *Ae. aegypti*, certains miARN contrôlent des gènes impliqués dans l'immunité tels que Rel1 et Cactus tandis qu'un miARN semble favoriser l'infection des cellules de moustique par DENV-2 [364]. Chez *A. gambiae*, le processus de mélanisation est en partie contrôlé par des miARN [365].

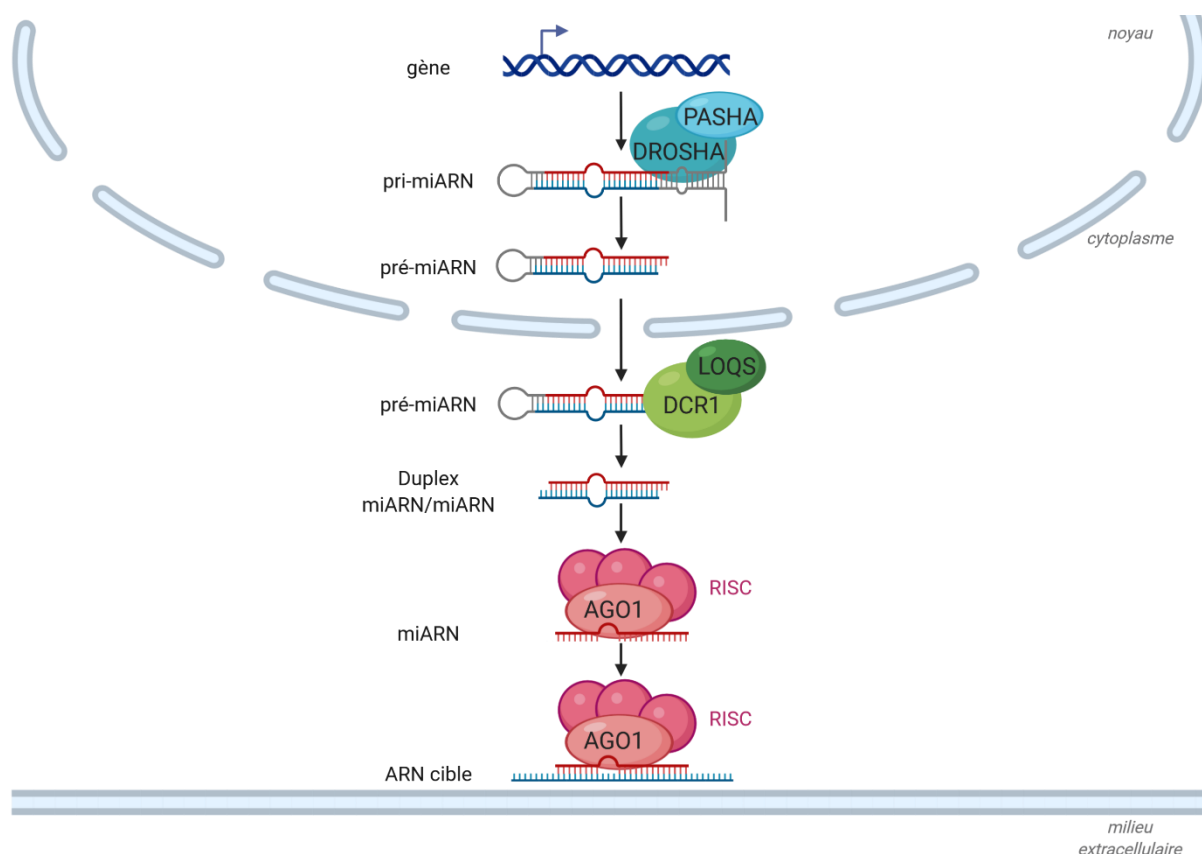


Figure 24. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des miARN chez les arthropodes

3.1.4. piARN

La voie des piARN diffère des mécanismes de biosynthèse des miARN et siARN puisqu'elle est indépendante des précurseurs ARNdb et des enzymes DCR [366], [367]. Néanmoins, cette voie des piARN fait intervenir 3 protéines Argonautes : PIWI, AUB et AGO3. Le mécanisme exact de biosynthèse des piARN n'est pas complètement connu et semble varier en fonction de l'origine des cellules, somatiques ou germinales, [368] et en fonction des espèces, drosophile, moustique ou vers à soie [369], [370]. Les piARN ont une origine intracellulaire et sont issus d'un nombre limité de locus localisés dans des régions intergéniques ou riches séquences répétées. Toutefois, l'hypothèse d'une origine extracellulaire virale est questionnée.

A ce jour, deux mécanismes de biosynthèse sont décrits pour les piARN : la voie des piARN primaires et la voie des piARN secondaires apportés par un cycle d'amplification dit « ping-pong » [371].

Au cours du processus primaire, l'hélicase Armitage (ARMI) et l'endonucléase Zucchini (ZUC), dans un mécanisme encore mal défini, génèrent des précurseurs de piARN (pré-piARN) [372] qui deviennent des piARN primaires. Ces piARN matures d'une taille pouvant varier entre 24 et 32 nt, possèdent

majoritairement un uracile en 5'. La protéine PIWI, guidée par le piRNA, s'apparie totalement ou partiellement à sa cible engendrant sa dégradation.

Le processus secondaire, également appelé boucle d'amplification « ping-pong », ne semble pas intervenir dans tous les types cellulaires [372]. Ce mécanisme permet notamment d'amplifier les piARN produits au cours de la voie primaire. Ainsi, les piARN primaires synthétisés s'associent à AUB qui clive le transcrite ciblé par le piARN. Ce clivage engendre la formation d'un piARN dit secondaire et présentant préférentiellement une adénosine en position 10, c'est-à-dire en face de l'uracile du piARN guide. Ce piARN secondaire est ensuite pris en charge par AGO3 et oriente ce dernier vers des transcrits complémentaires qui sont eux-mêmes clivés. Ce clivage génère des piARN secondaires identiques aux piARN primaires. La présence de transcrits sens et anti-sens au sein de la cellule est indispensable à l'amplification des piARN et permettent de réguler précisément la quantité de piARN synthétisés [372], [373] (**Figure 25**).

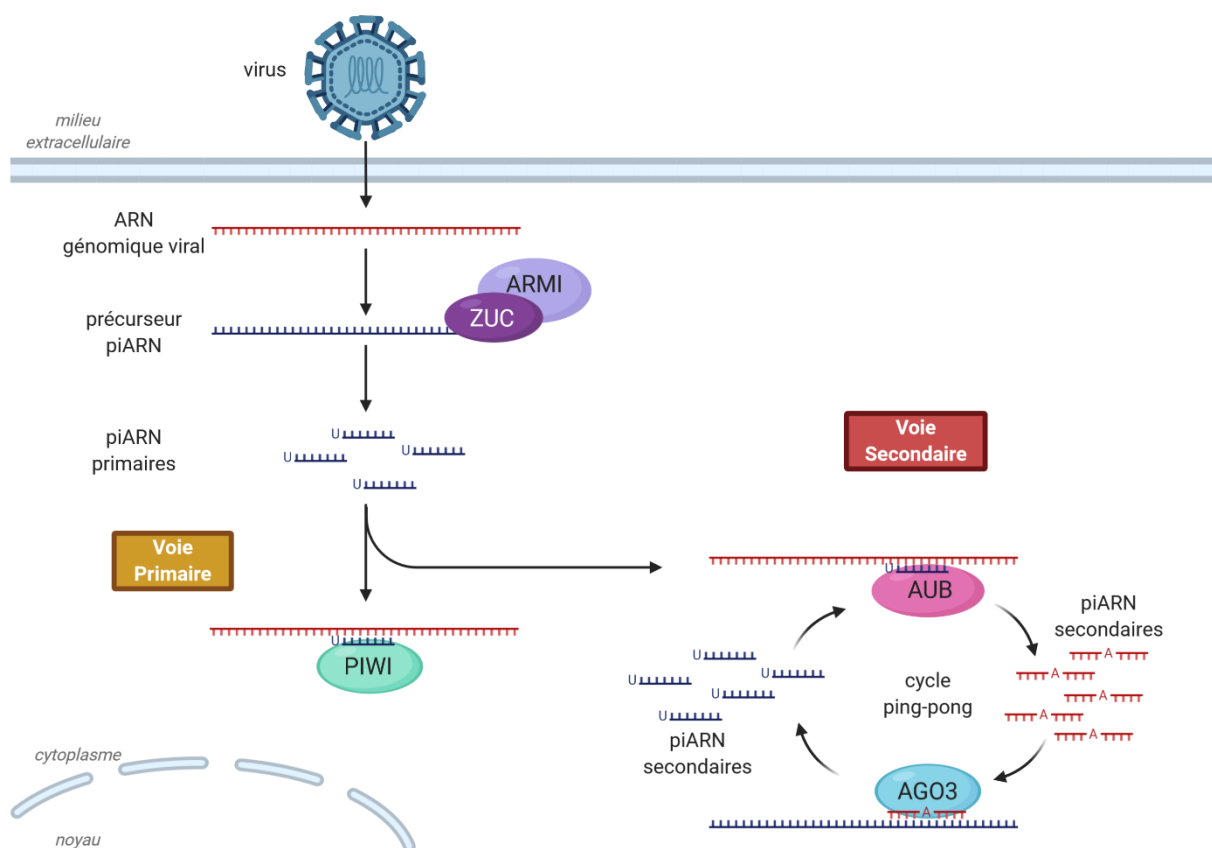


Figure 25. Représentation schématique de la voie de biosynthèse des piARN d'origine virale chez les insectes

Les piARN ont initialement été décrits pour jouer un rôle dans le maintien de l'intégrité du génome via la régulation de l'expression de transposons. Toutefois, de récentes études se sont intéressées au possible rôle antiviral de cette voie chez les arthropodes. Chez la drosophile, cette voie ne semble pas

essentielle à la défense du vecteur contre les infections virales [374]. En revanche, plusieurs études portant sur différentes espèces de moustiques ont mis en évidence l'importance de la voie des piARN dans la stratégie de lutte antivirale. Ainsi, la caractérisation des piARN en tant que réponse antivirale a été conduite avec différentes familles virales en cherchant notamment à identifier l'existence ou non des différentes voies de biosynthèse des piARN. Les cellules d'*Ae. aegypti* infectées par des virus de la famille des *Orthobunyavirus*, des *Phasivirus*, des *Phlebovirus* et des *Alphavirus* a ainsi permis de mettre en évidence le rôle de la voie secondaire de biogénèse des piARN dans la réponse antivirale [375]–[382]. L'infection de moustiques et de lignées cellulaires par des *Flavivirus* n'a cependant pas permis de confirmer l'existence d'une voie de synthèse de piARN secondaires bien qu'une voie de production primaire ait pu être observée [381], [383]–[387]. L'hypothèse proposée serait que la quantité de piARN primaire ne serait pas suffisante pour engendrer la production de piARN secondaire [388]–[390]. L'ensemble de ces résultats semble indiquer que la voie des piARN interviendrait peu dans la défense des insectes face aux infections à flavivirus. Plus récemment, une étude a rapporté l'existence d'un lien complexe entre la voie des piARN et des siARN chez *Ae. aegypti* par le biais de la protéine PIWI4 [391]. En effet, cette protéine serait à la fois associée à la voie des piRNA via son interaction avec les protéines AGO3, PIWI5 et PIWI6, mais également reliée à la voie des siARN en interagissant avec AGO2 et DCR2.

3.2. Réponses antivirales déclenchées par des voies de signalisation de l'immunité innée

En plus de l'ARNi, il existe d'autres voies de signalisation chez les arthropodes impliquées dans la lutte contre les infections virales. En effet, les voies JAK/STAT, Toll et IMD sont décrites pour intervenir dans la défense face aux infections virales [318], [322], [327]. Tout comme pour la réponse ARNi, ces voies sont essentiellement caractérisées chez la drosophile et bien que le cœur de ces cascades de signalisation soient partagées chez divers arthropodes, des différences peuvent exister entre les différentes espèces [392], [393].

3.2.1. JAK/STAT

La voie JAK/STAT possède une activité antivirale ayant été majoritairement décrite chez le moustique et la drosophile lors d'infection par différents arbovirus comme DENV, SINV et WNV [394], [395]. Suite à une infection virale, DCR2 joue le rôle de senseur de l'immunité qui reconnaît, à la manière de RIG-I (retinoic acid-inducible gene 1) et de MDA5 (melanoma differentiation-associated protein 5) chez les mammifères, l'ARN viral sous sa forme double brin, induisant une cascade de signalisation indépendante des composants de l'ARNi et conduisant à l'expression et à la sécrétion de la cytokine

VAGO. Le niveau d'expression de cette petite protéine est augmenté suite à l'infection de drosophile par DCV et SINV [396] ainsi qu'en cellules de moustiques du genre *Culex* sous infection WNV [395]. Il semblerait que l'expression de VAGO soit dépendante de DCR2 [395], [397], même si le processus d'activation est à ce jour inconnu. Par ailleurs, l'orthologue de NFκB, REL2, joue un rôle significatif dans la voie de signalisation permettant l'activation de VAGO. REL est d'ailleurs lui-même activé grâce aux protéines TRAF [398].

VAGO se lierait ensuite à un récepteur cellulaire conduisant à l'activation STAT. Ce récepteur n'est à ce jour pas identifié mais un récepteur JAK/STAT chez les crevettes a été découvert récemment [399], [400]. Une fois activée, la protéine STAT se dimérise et est transloquée dans le noyau où elle agit comme un facteur de transcription en induisant l'expression de peptides antimicrobiens (PAMs) tel que le peptide vir-1 suite à l'infection par WNV [401], ou des facteurs de restrictions viraux sous une infection DENV [402] (**Figure 26**).

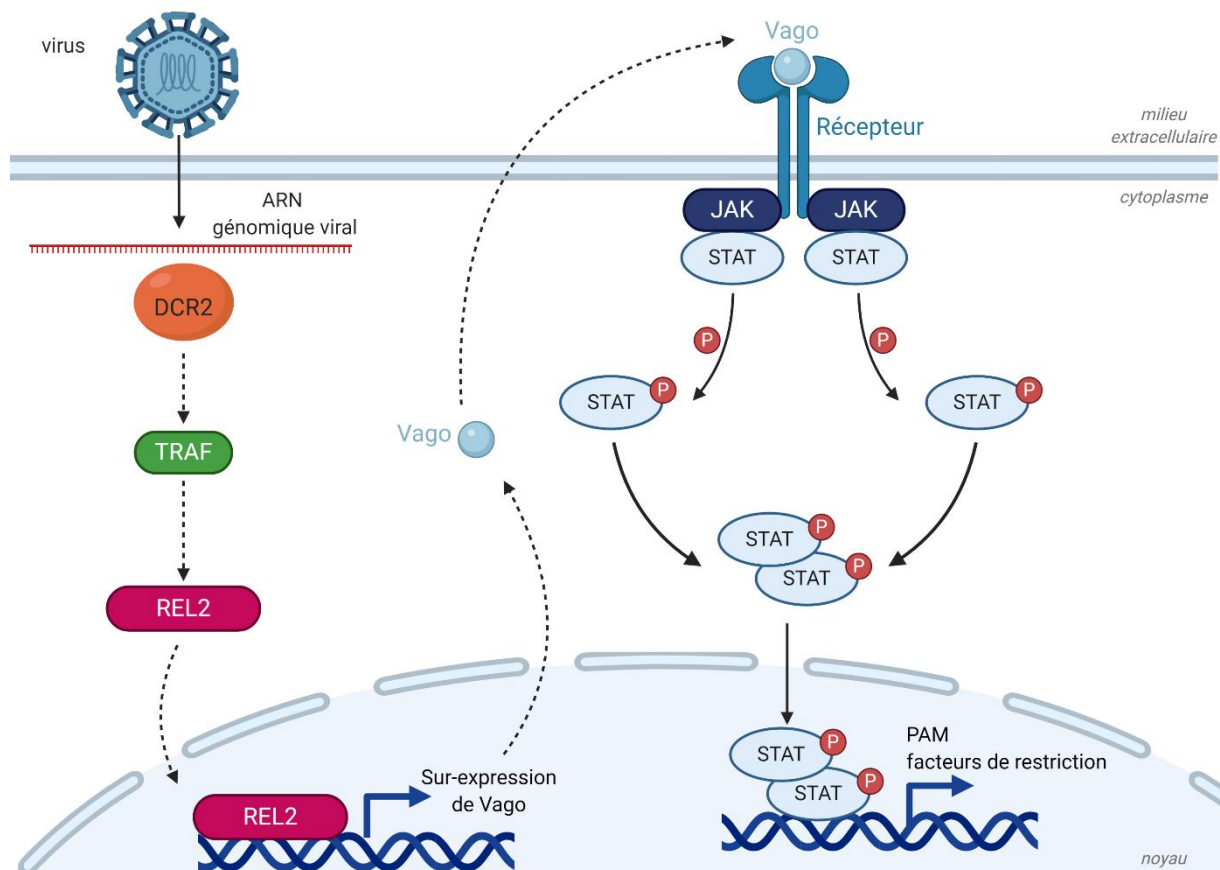


Figure 26. Représentation schématique de la voie de signalisation JAK/STAT chez les arthropodes

Les flèches en pointillés représentent une hypothétique activation de l'expression de VAGO

Bien que l'activation de cette voie JAK/STAT chez le moustique confère une résistance à 2 sérotypes de dengue (DENV2 et DENV4), cela ne semble pas être le cas lors d'une infection par CHIKV et ZIKV,

laissant ainsi supposer que le système JAK/STAT du moustique *Ae. aegypti* pourrait varier subtilement en fonction du virus impliqué [403]. Une augmentation de l'expression de Vago et du PAM attacin-C a été observée chez *D. melanogaster* suite à une infection par le SINV [404].

Chez d'autres arthropodes comme les crevettes, l'existence de la voie JAK/STAT ainsi que son rôle antiviral, notamment contre le virus du syndrome des taches blanches (white spot syndrome virus ; WSSV), ont été mis en évidence [405], [406]. La voie JAK/STAT est contrôlée par des régulateurs positifs et négatifs. L'un d'eux est la protéine SOCS (suppressor of cytokine signaling) qui exercent une boucle de rétrocontrôle négative sur la voie JAK/STAT [407]. Il existe également un boucle de rétrocontrôle positive de la voie JAK/STAT faisant intervenir la protéine JAK [408] ou encore STAT92E qui s'auto régule chez la drosophile et joue un rôle de régulateur positif sur la voie JAK/STAT [409]. Chez la tique *I. scapularis*, la voie JAK/STAT est impliquée dans le contrôle de l'infection de la bactérie intracellulaire *A. phagocytophilum* en régulant l'expression PAMs [410]. Quant au rôle antiviral de cette voie JAK/STAT chez la tique, il n'a pas été démontré à ce jour.

3.2.2. Toll

La voie Toll est une voie qui a été largement étudiée. Les TLR pour « Toll-like receptors » sont des récepteurs appartenant à la famille des PRR (« pattern recognition receptor ») et permettant la reconnaissance de pathogènes dans le milieu extracellulaire. Ils sont capables de reconnaître différents motifs et d'induire une cascade de signalisation générant une réponse immunitaire contre l'infection. Ces protéines Toll-like sont retrouvées chez de nombreux organismes pluricellulaires dont les vertébrés contrairement à d'autres protéines immunitaires telles que RIG-I, MDA5, et LGP2, responsables de la reconnaissance cytoplasmique des virus, dont les séquences respectives n'ont pas été isolées dans le génome des arthropodes [411], [412].

Bien que les gènes TLR soient impliqués dans l'immunité [413], [414], le mécanisme d'action de la voie Toll chez les arthropodes diffère de celui décrit chez les mammifères notamment dans la partie amont de la voie de signalisation. En effet, une différence majeure réside au début de la cascade de signalisation, puisqu'à la différence des mammifères, la reconnaissance de pathogènes par les arthropodes ne s'effectue pas via un récepteur PRR transmembranaire mais par un PRR extracellulaire [415]–[417]. Suite à la reconnaissance de PAMPs provenant de bactéries, de champignons ou de débris viraux [321], la cytokine Spaetzle est activée par le clivage de son prodomaine permettant sa liaison avec Toll [418], [419]. Cette liaison induit une cascade de signalisation aboutissant à la dégradation de la protéine Cactus, orthologue de la protéine inhibitrice κB (I κ B) chez les mammifères. Cette

dégradation permet l'activation du facteur de transcription Dorsal/Diff (REL1). Une fois transloqué dans le noyau, Dorsal/Diff conduit à l'initiation de la transcription de PAMs (**Figure 27**).

Le rôle de la voie Toll dans réponse antivirale du moustique *Ae. aegypti* a pu être mis en évidence lors de l'infection de cellules de moustique par le DENV. En effet lors de l'infection, une surexpression des transcrits liés à la voie Toll a pu être observée. De plus, l'extinction de l'expression de gènes codant des protéines impliquées dans la cascade de signalisation ont conduit à une diminution du titre viral dans le cas de Cactus et à une augmentation dans le cas de MYD88 [420], [421].

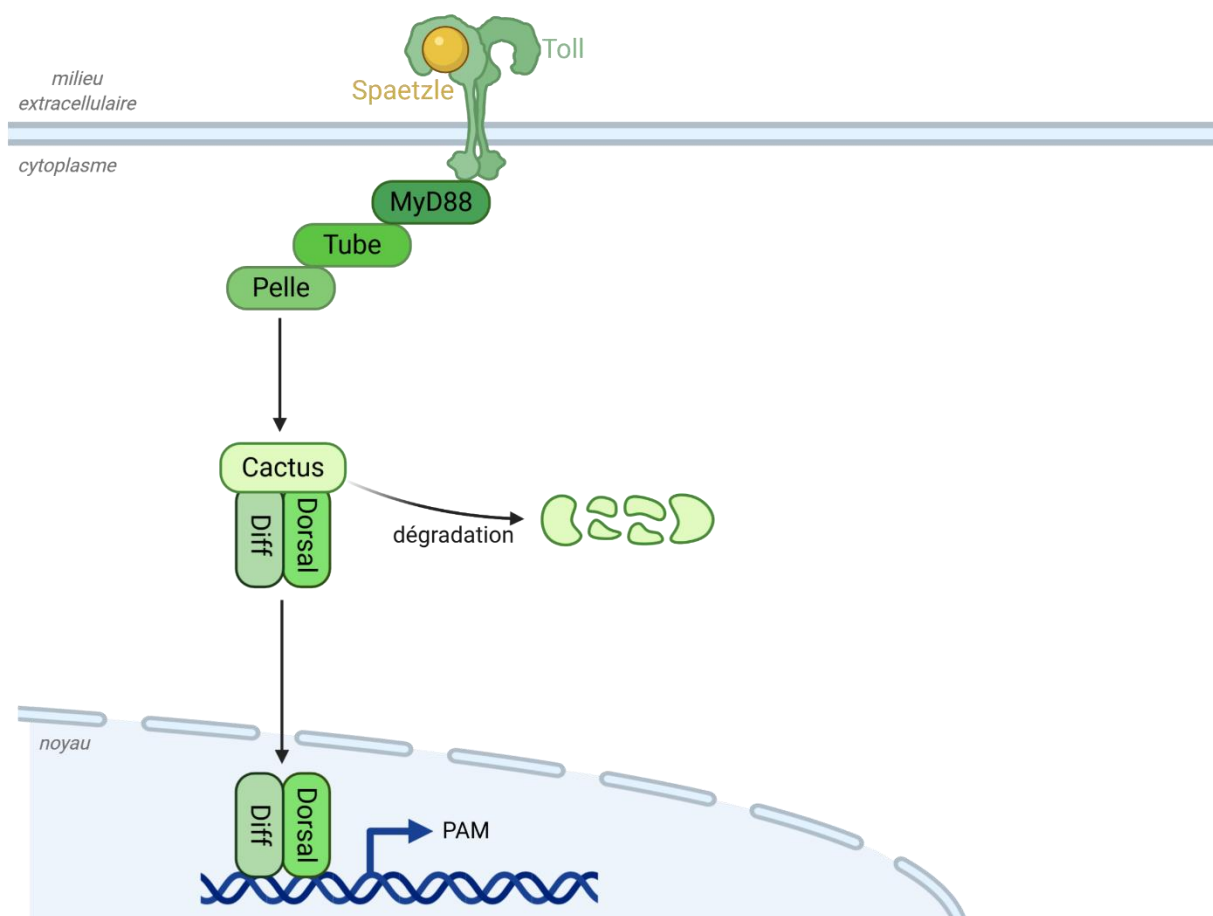


Figure 27. Représentation schématique de la voie de signalisation Toll chez les arthropodes

Côté tique, l'annotation du génome d'*I. scapularis* a permis d'identifier 13 copies du gène Toll et 2 copies du gène Spaetzle [422]. Toutefois, des études supplémentaires sont nécessaires avant de conclure que ces gènes aboutissent à la production de protéines fonctionnelles jouant un rôle dans l'immunité. En effet, il pourrait s'agir de gènes impliqués dans le développement ou de pseudogènes. Une étude récente a ainsi permis de mettre en évidence que le transcrit correspondant à une protéine Toll (ISCW0227040) était surexprimé suite à une infection par LIV ou TBEV chez une lignée cellulaire

d'*I. ricinus* (IRE/CTVM20) suggérant ainsi l'implication de cette protéine dans la réponse immunitaire antivirale [423]. Cette réponse s'apparente à celle observée chez les mammifères avec la surexpression du TLR3 [424]. Toutefois, l'implication de cette voie Toll dans le contrôle des infections aux alphavirus comme SVF, SINV et ONNV chez les vecteurs moustiques ou chez la drosophile n'a pas été mise en évidence [425]–[427].

Chez d'autres arthropodes comme l'abeille, la voie Toll est impliquée via la sur-régulation de Toll6 suite à l'infection par IAPV [428]. Chez les crevettes, plusieurs composants de la voie Toll ont été identifiés [429] et l'implication de cette voie dans la défense antivirale est suggérée par la sur-régulation d'orthologues de Toll et de Spaetzle lors de l'infection par WSSV [430].

3.2.3. IMD

La voie de signalisation IMD (« Immune Deficiency ») joue un rôle critique dans la réponse humorale des arthropodes [431]. Cette cascade de signalisation est analogue à celle des TNF (« Tumor necrosis factor ») présente chez les mammifères.

Chez les insectes, le récepteur PGRP-LC reconnaît de façon spécifique le peptidoglycane des bactéries Gram négatives (PGN). Cette reconnaissance conduit à l'interaction de PGRP-LC avec la protéine IMD qui recrute alors une protéine adaptatrice appelée FADD (« *Fas-Associated protein with Death Domain* »). FADD s'associe à la protéine DREDD, homologue de la caspase 8, qui clive la protéine IMD, permettant ainsi la libération d'un site de polyubiquitynilation via l'ubiquitine ligase E3 appelée IAP2 (« Inhibitor of Apoptosis Protein »). Avec l'aide d'autres protéines, IAP2 polyubiquityle IMD, conduisant alors au recrutement de la kinase TGF- β activée (TAK1) qui va s'associer au complexe IKK (I κ B Kinase). DREDD est également impliquée dans le clivage de l'extrémité N-terminale du facteur de transcription Relish, orthologue de NF κ B chez les mammifères [432]. La translocation de ce facteur dans le noyau conduit à l'activation transcriptionnelle de PAMs telle que la Diptericine (**Figure 28**).

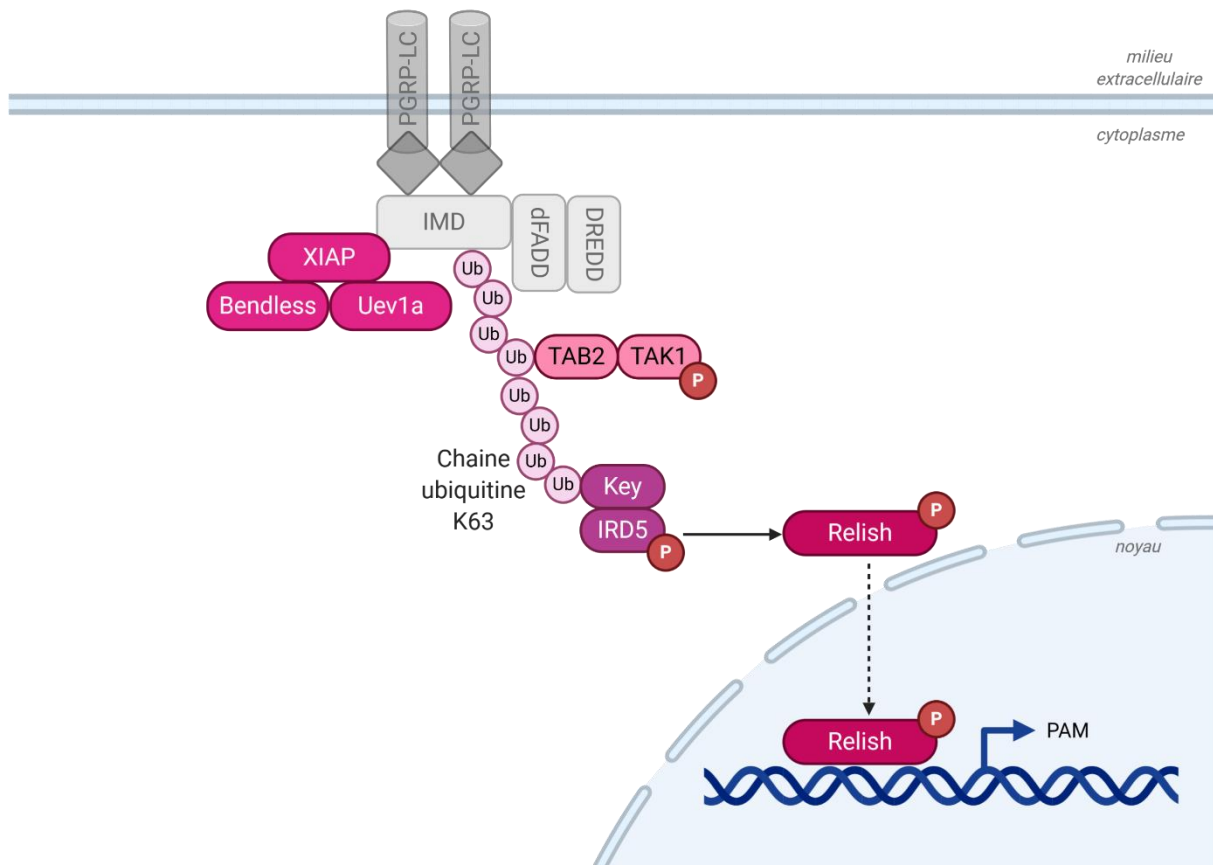


Figure 28. Représentation schématique de la voie de signalisation IMD chez les arthropodes

Les études de génomiques comparatives de la voie IMD suggèrent l'existence d'une certaine plasticité de cette voie chez les arthropodes, notamment chez la tique, qui présenterait une voie IMD atypique [216], [433]. En effet, l'existence d'orthologues de REL2 et Caspar a pu être mise en évidence mais certains acteurs de la voie IMD tels que le récepteur transmembranaire PGRP, la protéine FADD et la protéine IMD n'ont pas pu être identifiés chez la tique [434]. Toutefois, la cascade de signalisation moléculaire fonctionne et induit une réponse immunitaire. Dans la lignée cellulaire de tique *I. scapularis* ISE6 infectée par *A. phagocytophilum*, les orthologues RelA et RelB de NFκB présentent une augmentation de leur capacité de liaison en tant que facteur de transcription [435]. De plus, le facteur de transcription Relish, impliqué dans la voie IMD, joue un rôle capital dans le contrôle de l'infection d'*A. marginale* chez la tique *R. microplus* et la voie IMD régule l'expression de gènes codant le PAM microplusine [436]. Cette voie protégerait également *I. scapularis* de certaines infections bactériennes comme *B. burgdorferi* et *A. phagocytophilum* [437]. Enfin, à l'aide d'analyses structurales, biochimiques et interactomiques, il semblerait que la protéine XIAP, protéine inhibitrice de l'apoptose, interviendrait dans la voie IMD via son interaction avec l'enzyme d'ubiquitine-conjugaison nommée Bendless.

La voie IMD est décrite pour être une voie anti-bactérienne et son rôle antiviral chez de nombreux organismes reste à déterminer.

Toutefois, chez la drosophile, la voie IMD est impliquée dans la défense antivirale contre différents virus d'insectes tels le rhabdovirus sigma (SIGMAV) et le virus nora [438]. A la différence des infections bactériennes, lorsque la voie IMD est activée par un virus, celle-ci n'engendre pas d'induction robuste de PAMs. Toutefois, l'absence de certains acteurs de la voie chez la drosophile la rend plus susceptible aux infections par le SINV et le CrPV [426], [439]. Le microbiote du moustique *Ae. aegypti* activerait la voie IMD permettant ainsi de restreindre l'infection au SINV [440] tandis que chez la drosophile, la cytokine Dieldel (*Die*) jouerait un rôle de suppresseur de cette voie IMD. En effet, les drosophiles mutantes pour ce gène *Die* ont une durée de vie plus courte et succombent plus rapidement à une infection par le SINV [441]. L'activation de cette voie IMD par le SINV s'accompagne d'une augmentation du PAM diptéricine B ayant un effet antiviral sur le SINV [404].

Chez *A. gambiae*, une expression différentielle des composants de la voie IMD ont été observés suite à l'infection par le ONNV bien que l'extinction de l'expression de l'acteur REL2 n'ait pas conduit à de modifications des titres viraux, suggérant alors que la voie IMD aurait une contribution mineure dans la réponse antivirale de cet arthropode contre cet alphavirus [427].

En cellules d'*Ae. aegypti*, l'activation constitutive de Toll et IMD via l'extinction de l'expression de leurs modulateurs respectifs, Cactus et Caspar, conduit à l'augmentation du nombre de gouttelettes lipidiques au niveau de l'intestin. De plus, ces gouttelettes lipidiques s'accumulent dans les cellules de moustiques infectées par le DENV et le SINV. Ces résultats tendent à suggérer que les gouttelettes lipidiques pourraient jouer un rôle dans la réponse immunitaire antivirale [442]. Un nombre important de gouttelettes lipidiques ont été observées dans les glandes salivaires de larves d'*I. ricinus* sans que leur potentiel rôle antiviral ait été caractérisé [443]. Par ailleurs, une étude récente a démontré que les infections faisant intervenir des lipides (infection de bactéries à Gram négatif) stimulaient la voie IMD chez la tique [444]. Les auteurs proposent par la même occasion l'existence de deux cascades de signalisation IMD différentes entre les insectes et les tiques. Le promoteur de Vago chez les *Culex* possède un site de liaison à NFκB qui semble conservé chez différentes espèces de moustiques et qui est responsable de l'induction de l'expression de Vago suite à l'infection par le WNV.

Chez les crevettes, des orthologues d'IMD et de Relish ont été identifiés et sont tous deux différentiellement exprimés lors d'une infection virale, suggérant un possible rôle antiviral de la voie IMD chez les crustacées [445]–[447].

Les voies Toll et IMD sont deux voies entremêlées de par un acteur commun, l'orthologue de NFκB. Toutefois, une dichotomie existe puisque la voie Toll joue un rôle antiviral dans la défense contre les flavivirus et pas contre les alphavirus, et inversement pour la voie IMD qui est quant à elle impliquée dans la réponse antivirale face aux alphavirus mais pas aux flavivirus [448]. Cette opposition suggère

que les voies de signalisation se sont adaptées afin de contrôler les virus issus de familles virales diverses.

3.3. Autres réponses antivirales

En plus de l'ARNi et des voies induites par l'immunité innée telles que Toll, IMD et JAK/STAT, il existe d'autres processus de réponse à une infection virale chez les arthropodes comme la mélanisation ou des mécanismes de réponse au stress cellulaire telles que l'autophagie et la régulation des protéines de choc thermique (HSP).

La mélanisation, également appelée système phénoloxydase (PO), est un processus impliqué dans la cicatrisation des plaies ainsi que dans la réponse à l'infection par des pathogènes chez certains arthropodes et invertébrés [449]. Cette réponse immunitaire humorale se déroule dans l'hémolymphe et est initiée par la reconnaissance d'un pathogène induisant alors une cascade de protéases à sérine. L'activation de cette cascade aboutit au clivage et à l'activation d'une enzyme appelée « phenoloxidase activating protein » (PAP) catalysant la prophénoloxydase (ProPO) en phénoloxydase (PO). La PO permet la production de composés cytotoxiques telle que la mélanine [450]. La première étude décrivant le système PO comme un mécanisme de défense antivirale chez le moustique a ainsi montré qu'en éteignant l'expression d'un précurseur de PO lors d'une infection par le virus Sindbis, une diminution de l'activité PO est observée chez le moustique *Armigeres subalbatus* ainsi qu'une augmentation de la réplication virale [451]. Des travaux plus récents ont confirmé ces résultats initiaux en observant une augmentation de la réplication du virus de la forêt de Semliki (SFV) accompagnée d'une augmentation du taux de mortalité du moustique *Ae. aegypti* lors de l'inhibition du système PO chez ce dernier [452]. Enfin, l'infection d'*A. gambiae* par le virus O'nyong-nyong (ONNV) conduit à une surexpression des inhibiteurs de la mélanisation suggérant alors une suppression du processus de mélanisation [427].

Le rôle de la mélanisation dans le contrôle de l'infection virale chez les arthropodes continue de faire l'objet de plusieurs études [453]–[457], et l'existence de la mélanisation chez la tique demeure controversée. Bien qu'une activité phénoloxydase ait été identifiée chez la limule [458], arachnides plus proche phylogénétiquement de la tique que les insectes, ainsi que chez une nymphe d'*Ornithodoros moubata* [459], à ce jour aucune preuve de l'existence d'un tel processus antiviral n'a été mise en évidence chez les tiques dures.

L'autophagie est un processus biologique intervenant dans la dégradation et le recyclage de composants cellulaires en périodes de stress [460]. Ce processus de survie se manifeste par l'initiation

de la voie de signalisation appelée phosphoinositide 3-kinase/AKT/mTOR (PI3K/AKT/mTOR). Chez *D. melanogaster*, l'autophagie est un mécanisme de défense antivirale contre le virus de la stomatite vésiculaire (VSV) [461] à l'inverse des résultats obtenus chez des cellules d'*A. albopictus* et de *D. melanogaster* lors d'une infection par le SINV, où la voie PI3K/Akt/mTOR semble endosser une action provirale [462].

En plus de ces voies antivirales présentes chez les arthropodes, il existe une réponse immunitaire antivirale inductible. Plusieurs analyses de transcriptomes d'arthropodes ont ainsi été menées et l'une d'entre elles a notamment montré que près de 1200 gènes étaient différentiellement exprimés suite à l'infection de cellules d'*Ae. aegypti* par le DENV-2 [463]. Des réponses transcriptomique et protéomique impliquées dans l'immunité innée ont également été observées suite à l'infection de cellules d'*I. scapularis* et d'*I. ricinus* par les flavivirus TBEV, LIV et LGTV [423], [464]. Ces résultats suggèrent que le virus est capable d'induire une réponse cellulaire contrôlée chez la tique.

3.4. Les supprimeurs viraux

L'ensemble de ces mécanismes cellulaires élaborés par les arthropodes leur permettent de lutter contre les multiples infections virales dont ils sont les cibles. De leur côté, les virus échafaudent également des processus afin de contourner cette réponse immunitaire de l'hôte.

La capacité des virus d'insectes et de plantes à échapper ou à supprimer la réponse RNAi a été mise en évidence par plusieurs études [322], [369]. Les arbovirus sont capables d'établir des infections persistantes avec une faible pathogénèse de par leur capacité à se soustraire à la réponse RNAi. Toutefois, les mécanismes permettant de parer une telle réponse ne sont pas encore bien définis. L'infection par un flavivirus (MBFV et TBFV) aboutit à l'amplification d'ARN génomique d'une part mais aussi à la production d'ARN sous-génomique non codant appelé « subgenomic flavivirus RNA » (sfRNA ou ARNsf) [465]. Ces ARNsf, issus de la région 3'UTR de l'ARN génomique viral, sont capables d'interagir avec différentes protéines cellulaires comme les protéines Dicer afin de contourner la réponse ARNi [466], [467]. L'inhibition de cette réponse ARNi pourrait également s'appuyer sur l'intervention de protéines virales et la production de gènes supprimeurs de l'ARNi et/ou des leurres d'ARN et manipuler l'expression des gènes de l'hôte [468], [469]. Ainsi, certains virus d'insectes expriment des supprimeurs appelés VSR (*viral suppressors of RNAi*). Trois d'entre eux, la protéine B2 du Flock House Virus, la protéine 1A du Virus C de la Drosophile et la protéine CrPV-1A du CrPV perturbent l'action de DCR2 et AGO2 à différentes étapes de la voie des siARN. La protéine NS4B de DENV-2 semble jouer un rôle suppresseur de la voie des siARN et miARN en cellules d'insectes et de mammifères [470], tout comme la nsP2 la nsP3 de CHIVK [471].

OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

La majorité des maladies émergentes sont transmises par des arthropodes [472] et d'après l'OMS, ces maladies vectorielles engendrent plus d'un million de décès chaque année dans le monde. Les tiques constituent le premier vecteur arthropode dans les zones tempérées du globe et l'espèce *I. ricinus* est la tique majoritaire en Europe. De nombreux pathogènes sont capables d'être transmis par cette tique, parmi eux, les flavivirus TBEV et LIV, responsables de méningoencéphalites respectivement chez les humains et les ovins. Comme tous virus, TBEV et LIV doivent détourner au cours de leur cycle viral intracellulaire, les voies métaboliques et échapper aux défenses antivirales. Ces manœuvres se traduisent par la mise en place d'un dialogue moléculaire entre les virus et les cellules de l'hôte vecteur. Le génome de ces 2 flavivirus fait moins de 11kb alors que celui de leur vecteur *I. ricinus* est estimé à 2,65Gb [473]. Inévitablement, cette différence majeure implique le déploiement d'une multitude de subterfuges par le virus pour se répliquer au sein de la tique et se propager. Réciproquement, la tique s'emploie à contrôler l'infection par la mise en place d'une réponse antivirale. Ce subtil équilibre entre la réplication virale et l'immunité antivirale permet à la tique *I. ricinus* d'être un arthropode vecteur compétent pour TBEV et LIV, c'est-à-dire que la tique est capable d'acquérir ces virus, de contrôler leur réplication dans son organisme et de les transmettre à un nouvel hôte. Aussi, l'émergence d'un pathogène est conditionnée par la présence géographique de son vecteur. Mieux comprendre ce processus de compétence vectorielle constitue un enjeu majeur pour la mise en place et le développement de programmes de surveillance en vue de prévenir et contrôler l'émergence de maladies vectorielles.

C'est dans ce contexte que s'inscrit mon travail de thèse. Ces deux virus partagent 95% d'identité de séquence protéique, induisent tous deux des encéphalites chez des hôtes différents, sont transmis par la même tique *I. ricinus* mais ont des distributions géographiques et des niches écologiques différentes. Notre hypothèse est que ce paradoxe pourrait être en partie expliqué par des interactions protéines – protéines différentes établies par ces virus avec la tique *I. ricinus*. Aussi, le premier objectif de ma thèse était d'explorer sous le prisme des interactions protéines – protéines, le dialogue moléculaire mis en place par TBEV et LIV avec leur hôte vecteur, afin d'identifier de potentielles protéines impliquées dans la compétence vectorielle.

La réponse antivirale permet à la tique de contrôler l'infection et constitue de fait un élément clé de la compétence vectorielle d'*I. ricinus*. Chez les arthropodes, l'ARNi est décrite comme la réponse antivirale majeure. L'hypothèse émise est que la tique *I. ricinus* a recourt à l'ARNi pour maintenir son intégrité en contrôlant l'infection à TBEV et LIV. Le second objectif de mon travail de thèse s'est ainsi attaché à analyser la réponse antivirale établie par *I. ricinus* lors de son infection par TBEV et LIV.

RESULTATS

Chapitre I : Interactions protéines-protéines de TBEV et LIV avec leur vecteur *I. ricinus*.

1. Exploration des interactions protéine-protéine de deux flavivirus transmis par les tiques avec leur vecteur *I. ricinus*

Article soumis dans *Parasites And Vectors*

Parasites & Vectors

Exploration of binary protein-protein interactions between tick-borne flaviviruses and *Ixodes ricinus*

--Manuscript Draft--

Manuscript Number:		
Full Title:	Exploration of binary protein-protein interactions between tick-borne flaviviruses and <i>Ixodes ricinus</i>	
Article Type:	Research	
Section/Category:	Vector-Borne Zoonoses and One Health	
Funding Information:	labex IBEID (ANR-10-LABX-62-IBEID)	Damien VITOUR

Abstract:	Background: Louping ill virus (LIV) and tick-borne encephalitis virus (TBEV) are tick-borne flaviviruses that are both transmitted by the major European tick, <i>Ixodes ricinus</i>. Despite the importance of <i>I. ricinus</i> as an arthropod vector, its capacity to acquire and subsequently transmit viruses, known as vector competence, is poorly understood. At the molecular scale, vector competence is governed in part by binary interactions established between viral and cellular proteins within infected tick cells. Methods: To investigate virus-vector protein-protein interactions (PPIs), the entire set of open reading frames for LIV and TBEV was screened against an <i>I. ricinus</i> cDNA library established from three embryonic tick cell lines using yeast two-hybrid methodology (Y2H). PPIs revealed for each viral bait were retested in yeast by applying a gap repair (GR) strategy, and notably against the cognate protein of both viruses, to determine whether the PPIs were specific for a single virus or common to both. The interacting tick proteins were identified by automatic BLASTX and <i>in silico</i> analyses were performed to expose the biological processes targeted by LIV and TBEV. Results: For each virus, we identified 24 different PPIs involving six viral proteins and 22 unique tick proteins, with all PPIs being common to both viruses. According to our data, several viral proteins (pM, M, NS2A, NS4A, 2K and NS5) target multiple tick protein modules implicated in critical biological pathways. Of note, the NS5 and pM viral proteins establish PPI with several tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF) proteins, which are essential adaptor proteins at the nexus of multiple signal transduction pathways. Conclusion: We provide the first description of the TBEV/LIV-<i>I. ricinus</i> PPI network, and indeed of any PPI network involving a tick-borne virus and its tick vector. While further investigation will be needed to elucidate the role of each tick protein in the replication cycle of tick-borne flaviviruses, our study provides a foundation for understanding the vector competence of <i>I. ricinus</i> at the molecular level. Indeed, certain PPIs may represent molecular determinants of vector competence of <i>I. ricinus</i> for TBEV and LIV, and potentially for other tick-borne flaviviruses.
Corresponding Author:	Sandrine A. LACOUR, Ph.D. UMR 1161 Virologie ANSES-INRAE-ENVA Maisons-Alfort, Île-de-France FRANCE
Corresponding Author E-Mail:	sandrine.lacour@anses.fr
Corresponding Author Secondary Information:	
Corresponding Author's Institution:	UMR 1161 Virologie ANSES-INRAE-ENVA
Corresponding Author's Secondary Institution:	
First Author:	Manon LEMASSON, Ph.D. student
First Author Secondary Information:	
Order of Authors:	Manon LEMASSON, Ph.D. student
	Grégory CAIGNARD, Ph.D.
	Yves UNTERFINGER
	Houssam ATTOUI, Ph.D., PharmD
	Lesley BELL-SAKYI, Ph.D.
	Edouard HIRCHAUD
	Sara MOUTAILLER, Ph.D.
	Nicholas JOHNSON, Ph.D.

	Damien VITOUR, Ph.D.
	Jennifer RICHARDSON, Ph.D.
	Sandrine A. LACOUR, Ph.D.
Order of Authors Secondary Information:	
Suggested Reviewers:	José DE LA FUENTE SaBio, Instituto de Investigación de Recursos Cinegéticos, IREC-CSIC-UCLM-JCCM, Ciudad Real, Spain. jose_delafuente@yahoo.com specialist tick and molecular interaction with tick-borne pathogens Ana G. DOMINGOS Global Health and Tropical Medicine, Instituto de Higiene e Medicina Tropical, Universidade Nova de Lisboa, Lisboa, Portugal adomingos@ihmt.unl.pt specialist tick and molecular interaction with tick-borne pathogens Jeffrey GRABOWSKI Biology of Vector-Borne Viruses Section, Laboratory of Virology, Rocky Mountain Laboratories, NIAID/NIH, Hamilton, Montana jeffrey.grabowski@nih.gov specialist tick and molecular interaction with tick-borne pathogens
Additional Information:	
Question	Response
Is this study a clinical trial? A clinical trial is defined by the World Health Organisation as 'any research study that prospectively assigns human participants or groups of humans to one or more health-related interventions to evaluate the effects on health outcomes'.	No
Are you submitting to an Article Collection?	No

Exploration of binary protein-protein interactions between tick-borne flaviviruses and *Ixodes ricinus*

Manon Lemasson¹, Grégory Caignard¹, Yves Unterfinger¹, Houssam Attoui¹, Lesley Bell Sakyi², Edouard Hirchaud³, Sara Moutailler⁴, Nicholas Johnson⁵, Damien Vitour¹, Jennifer Richardson¹, Sandrine A. Lacour^{1*}

¹UMR 1161 Virologie Laboratoire de Santé Animale, ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Paris-Est Sup, Maisons-Alfort, France

²Department of Infection Biology and Microbiomes, Institute of Infection, Veterinary and Ecological Sciences, University of Liverpool, Liverpool, United Kingdom

³Viral Genetic and Biosecurity Unit, Ploufragan-Plouzané-Niort Laboratory, ANSES, Ploufragan, France.

⁴UMR BIPAR, Laboratoire de Santé Animale, ANSES, INRAE, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Paris-Est Sup, Maisons-Alfort, France

⁵Animal and Plant Health Agency (APHA), Addlestone, Surrey, United Kingdom

*Corresponding author: sandrine.lacour@anses.fr

ABSTRACT

Background: Louping ill virus (LIV) and tick-borne encephalitis virus (TBEV) are tick-borne flaviviruses that are both transmitted by the major European tick, *Ixodes ricinus*. Despite the importance of *I. ricinus* as an arthropod vector, its capacity to acquire and subsequently transmit viruses, known as vector competence, is poorly understood. At the molecular scale, vector competence is governed in part by binary interactions established between viral and cellular proteins within infected tick cells.

Methods: To investigate virus-vector protein-protein interactions (PPIs), the entire set of open reading frames for LIV and TBEV was screened against an *I. ricinus* cDNA library established from three embryonic tick cell lines using yeast two-hybrid methodology (Y2H). PPIs revealed for each viral bait were retested in yeast by applying a gap repair (GR) strategy and notably against the cognate protein of both viruses, to determine whether the PPIs were specific for a single virus or common to both. The interacting tick proteins were identified by automatic BLASTX and in silico analyses were performed to expose the biological processes targeted by LIV and TBEV.

Results: For each virus, we identified 24 different PPIs involving six viral proteins and 22 unique tick proteins, with all PPIs being common to both viruses. According to our data, several viral proteins (pM, M, NS2A, NS4A, 2K and NS5) target multiple tick protein modules implicated in critical biological pathways. Of note, the NS5 and pM viral proteins establish PPI with several tumor necrosis factor (TNF)

receptor-associated factor (TRAF) proteins, which are essential adaptor proteins at the nexus of multiple signal transduction pathways.

Conclusion: We provide the first description of the TBEV/LIV-*I. ricinus* PPI network, and indeed of any PPI network involving a tick-borne virus and its tick vector. While further investigation will be needed to elucidate the role of each tick protein in the replication cycle of tick-borne flaviviruses, our study provides a foundation for understanding the vector competence of *I. ricinus* at the molecular level. Indeed, certain PPIs may represent molecular determinants of vector competence of *I. ricinus* for TBEV and LIV, and potentially for other tick-borne flaviviruses.

BACKGROUND

Ticks are obligate hematophagous arthropods and vectors of a broad diversity of pathogens that affect humans, livestock and wildlife throughout the world. Ticks transmit parasites, bacteria and viruses, of which the last-mentioned belong to diverse viral families [1]. In Europe, two of the major tick-borne viruses, tick-borne encephalitis virus (TBEV) and louping ill virus (LIV), are members of the genus *Flavivirus* of the family *Flaviviridae* [2]. Both viruses are principally transmitted by the major tick species of northern Europe, *Ixodes ricinus* [3], which is the most significant arthropod vector in Europe and responsible for the transmission of multiple pathogens of medical and veterinary importance.

Despite high genetic proximity (95% at the amino acid level, data not shown), TBEV and LIV are mainly responsible for clinical disease in, respectively, humans and sheep. While human infections by TBEV are mostly asymptomatic (70-95% of cases), between 10,000 and 15,000 cases of tick-borne encephalitis (TBE) are reported every year in Eurasia [4]. Clinical manifestations are diverse, but can include moderate fever, subacute encephalitis with complete or partial recovery and, in very rare cases, fatal encephalitis [5]. While humans generally acquire TBEV following a tick bite, the virus may also be transmitted via milk or dairy products from domestic animals such as goats, sheep and cattle [6]. LIV has predominantly been reported from the United Kingdom, and having been identified almost a hundred years ago, was the first tick-borne virus to be discovered [7]. LIV causes an encephalitic disease in sheep, known as louping ill, but has also been isolated from cattle, horses and grouse [8]. Due to the economic losses it engenders, louping ill is an important veterinary problem in the UK, especially in Scotland [9]. Occasional human cases of LIV, diagnosed in farmers, butchers, abattoir and laboratory workers, appear to be related to occupational exposure rather than tick bites [10].

To this day, the capacity of a given tick species for viral acquisition and subsequent transmission, called vector competence, is incompletely understood, and in particular at the molecular level. Indeed, vector competence partly depends on cellular permissivity to viruses, which is largely driven by molecular biological processes. These are usually performed by physical assemblies of proteins (protein modules), whether in the form of stable protein complexes or functional modules, the latter including

signal transduction pathways [11]. These two types of modules are connected by, respectively, stable or intermittent protein-protein interactions (PPIs). The biological processes performed by these modules are vulnerable to viral hijacking, essentially manifested by the establishment of PPIs between viral proteins and critical components of the modules.

At present, relatively few complete PPI networks (interactomes) have been established for viruses, and focus has been on mosquito-borne flaviviruses [12]. To the best of our knowledge, no interactome has as yet been established for any tick-borne virus and its tick vector. Resolving such PPI networks and identifying molecular mechanisms that enable vector competence is essential to instruct risk assessment – through identification of competent vectors – and thereby improve preparedness [13, 14].

Flaviviruses are enveloped viruses possessing a positive-sense single-stranded RNA genome of 11kb. The genome encodes a single polyprotein that is cleaved by host and viral proteases into three structural proteins, – capsid protein (C), precursor membrane protein (pM) and envelope protein (E) – , and seven non-structural proteins (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B and NS5). The structural proteins are components of the viral particle, while non-structural proteins essentially take part in replication and evasion of the host immune response [15].

In this study, the PPI network established between TBEV/LIV and the tick *I. ricinus* was characterized for the first time. To this end, the entire set of TBEV and LIV proteins was screened against tick proteins encoded by a cDNA library generated from three *I. ricinus* embryo-derived cell lines using yeast two-hybrid methodology. For each virus, we identified 24 different interactions involving six viral proteins and 22 unique tick proteins, with all interactions being common to both viruses. According to our data, viral proteins target multiple protein modules implicated in critical biological pathways, such as those governing signal transduction, protein degradation and cytoskeletal function. Of note, the NS5 and pM viral proteins establish PPI with several tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF) proteins, which are essential adaptor proteins at the nexus of multiple signal transduction pathways. We presume that subversion of these processes by TBEV and LIV enhances viral survival in ticks and potentially viral transmission to mammalian hosts. Our results thus provide leads for discovery of biological processes with a potential role in the vector competence of *I. ricinus* for TBEV and LIV.

METHODS

Tick cDNA library

The tick cDNA library used in this study was derived from three *I. ricinus* embryonic cell lines, IRE11 [16], IRE/CTVM19 and IRE/CTVM20 [17]. The IRE11 cell line was established from eggs laid by a single female tick collected in Germany, while the IRE/CTVM19 and IRE/CTVM20 cell lines were established from a pool of eggs laid by four female ticks collected in the United Kingdom. Preparation of the

I. ricinus cDNA library was subcontracted (Thermo Fisher Scientific). Briefly, mRNA of each tick cell line was isolated and reverse-transcribed by the subcontractor. An oligo(dT) primer was employed for reverse transcription, thus ensuring that the carboxyl termini of all tick proteins were intact.

Viral productions

The Hypr strain of TBEV (Genbank accession number U39292.1) was first isolated in 1953 from the blood of a 10-year-old child with TBE in the Brno region of Czech Republic [18]. The LI3/1 strain of LIV (accession number KP144331.1), kindly provided by Nicholas Johnson (APHA, UK), was first isolated in 1962 from a sheep in Oban, Scotland [19]. Viral features have been summed up in the Additional file 1. TBEV and LIV were amplified by, respectively, five and three successive passages on 80% confluent Vero cells (ATCC No. CCL-81) grown in Minimum Essential Medium (MEM; Thermo Fisher Scientific) supplemented with 2% fetal bovine serum (FBS) at a multiplicity of infection (MOI) of 0.001 Pfu/cell.

Viral bait construction

TBEV and LIV viral RNAs were extracted using the QIAamp viral RNA mini kit, (QIAGEN, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol and were reverse-transcribed using the Transcriptor high fidelity cDNA synthesis kit (Roche, Basel, Switzerland). Briefly, viral RNAs were incubated with random hexamer primers (60 μ M) for 10 min at 65°C in a volume of 11.4 μ L, and then chilled on ice. Transcriptase reaction buffer (4 μ L), Protector RNase inhibitor (20 U), dNTP (1 mM of each), DTT (5mM) and Transcriptor high fidelity reverse transcriptase (22 U) were added to the template-primer mix. Reverse transcription and inactivation of reverse transcriptase were achieved by incubation for 30 min at 55°C and 5 min at 85°C, respectively. Each viral bait was amplified by PCR using Phusion High-Fidelity DNA polymerase (Thermo Fisher Scientific) using the primers listed in Additional file 2. The primers contained a recombination sequence at the 5' terminus allowing insertion of each viral bait into a pDONR207 using a recombination cloning system (Gateway® System; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). PCR was performed using 1 μ L of RT product in high fidelity buffer in a final volume of 50 μ L, with 0.02 U/ μ L of Taq Phusion hot start II DNA Polymerase, 200 μ M of dNTPs and 0.3 μ M of forward and reverse primers. Amplification was performed for 35 cycles as follows: 98°C for 10 s, 56°C for 15 s and 72°C for 3 min.

Cloning

Each amplified viral bait was cloned into pDONR207 (Additional file 3) using the Gateway® cloning technology (Invitrogen). Briefly, 500 ng of pDONR207 vector were mixed with 500 ng of PCR product in the presence of 2 μ L of BP clonase™ in a final volume of 10 μ L and incubated overnight at room temperature (RT). Similarly, viral ORFs cloned into pDONR207 were transferred into Gateway®

compatible destination vector by a LR clonase™ reaction. To this end, 500 ng of pDONR207 vector encoding each viral ORF insert and 500 ng of the destination vector were incubated overnight at RT with 2 µL of LR clonase™ in a final volume of 10 µL. Each construction was confirmed by sequencing (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany).

Bacterial transformation and plasmid DNA purification

All pDONR207 constructs were amplified after transformation of *E. coli* DH5α (NEB) (Additional file 1), following the manufacturer's instructions. Plasmid DNA was extracted from bacteria using the NucleoSpin Plasmid kit (Macherey Nagel) according to the manufacturer's recommendations.

Yeast two-hybrid assay (Y2H)

The coding sequences of viral baits were recombined into pPC97 (Additional file 3) to be expressed in-frame downstream of the DNA binding domain of Gal4 (Gal4-DB; Figure 1A), while *I. ricinus* cDNA prey were recombined by a subcontractor into pDEST22 (Additional file 3) to be expressed in-frame downstream of the activation domain of Gal4 (Gal4-AD). To perform yeast two-hybrid experiments, Y2H Gold and Y187 yeast strains (Additional file 1) were transformed with vector pPC97 constructs encoding viral baits and the pDEST22 cDNA library encoding *I. ricinus* preys, respectively. Mating of the two strains was performed on selective medium lacking histidine, leucine and tryptophan and supplemented with 5 mM 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT; Sigma-Aldrich, Saint-Louis, MO, USA). Since certain bait proteins may transactivate the HIS3 reporter gene in Y2HGold yeast when expressed in-frame with Gal4-DB [20], the transactivation level was measured for each viral bait and the concentration of 3-AT, which is a competitive inhibitor of the HIS3 enzyme, adjusted to optimize the stringency of the screen. After 6 days of incubation on selective medium, colonies were picked and purified on fresh selective medium over 3 weeks to maintain selection pressure and eliminate false-positive colonies [21]. Gal4-AD-cDNAs were amplified by PCR after zymolyase treatment using primers (Additional file 2) that hybridize within regions of pDEST22 flanking the cDNA inserts. PCR products were sequenced and cellular interactors were identified by automatic BLAST analysis.

Gap repair (GR)

To identify new interactions and/or confirm interactions between viral baits and cellular prey, PCR products from the Y2H output were subjected to a GR procedure [22]. Briefly, yeast carrying plasmids expressing DB-fused viral proteins were co-transformed with 10 ng of linearized pDEST22 empty vector and 3 µL of PCR product and plated on selective medium as described above. Homologous recombination between pDEST22 and the PCR product reconstituted AD-fused *I. ricinus* cDNA, and growth on medium lacking leucine, tryptophan and histidine was conditioned by physical interaction

between viral and *I. ricinus* proteins. All AD-fused cDNAs encoding *I. ricinus* proteins were retested in yeast cells using this procedure. The strength of the interaction was also assessed by evaluating yeast growth in the presence of increasing 3-AT concentrations (5, 20, 35 and 50 mM). Last, to ensure a robust PPI network, only the PPIs supported by a GR confirmation were retained for further gene ontology (GO) analyses.

***In silico* and Gene Ontology (GO) analyses**

The Galaxy server was used to perform automatic BLASTX 2.2.31 analysis and identify orthologues of *I. ricinus* proteins from the *I. scapularis* genome [23]. The PPI network was generated with the open source software Cytoscape v3.8.0 [24] and analyzed with NetworkAnalyzer [25]. The PANTHER (protein analysis through evolutionary relationships; (<http://pantherdb.org/>)) biological database was exploited using the AmiGO2 portal (<http://amigo2.berkeleybop.org/amigo>). The *I. scapularis* gene IDs were submitted to the GO term enrichment service using an *I. scapularis* organism filter in order to identify biological processes enriched in our dataset. The GO terms obtained ensued from the PANTHER overrepresentation test based on Fisher's exact test and application of a false discovery rate (FDR) correction (Additional file 4). The REVIGO (reduce and visualize Gene Ontology; <http://revigo.irb.hr/>) web server was used to condense the list of GO terms and their associated p-values. The REVIGO algorithm was run with the default settings and generated a shorter GO term list without redundancy and with an associated frequency of the GO term in the Uniprot database (Additional file 5). Functional descriptions for tick, mosquito, fly and human proteins were extracted from Uniprot (<https://www.uniprot.org/>), VectorBase (<https://vectorbase.org/vectorbase/app>) and Flybase (<https://flybase.org/>) databases.

For comparison of bait sets, the fold enrichment score for each enriched GO term was partitioned among bait sets by multiplying the score by the fraction of proteins that belonged to each bait set within the set of proteins attributed to the GO term, to obtain an enrichment ratio. After replacing enrichment ratios assigned a null value by a value equivalent to half of the lowest non-null value in the complete bait set, all enrichment values were log2-transformed using the clusterMaker2 Cytoscape plugin. By means of the hierarchical cluster algorithm provided by this application, viral bait sets were grouped using the un-centered metric of similarity with no filtering and the pairwise average-linkage clustering method. Clusters were visualized using JTree TreeView.

RESULTS

***Ixodes ricinus* cDNA library construction**

Before initiating the Y2H screen, an *I. ricinus* cDNA library had to be constructed. To this end, tick cDNAs were cloned in frame downstream from the activation domain of Gal4. The cDNA was derived from

three embryo-derived tick cell lines; that is, IRE11, IRE/CTVM19 and IRE/CTVM20. While IRE/CTVM19 and IRE/CTVM20 have been reported to be permissive to TBEV infection [26–28] and IRE/CTVM20 to LIV infection [27], the sensitivity of IRE11 to these viruses has not been reported.

Generating a tick-borne flavivirus – tick PPI network

In order to identify new PPIs between LIV, TBEV and *I. ricinus* proteins, we screened the *I. ricinus* cDNA library with the complete set of ORFs of TBEV and LIV (Figure 1B). A single screen was performed against the tick cDNA library for each viral bait. Among 464 colonies picked for sequencing, comprising respectively 131 and 333 for LIV and TBEV, 18 tick proteins interacting with LIV and 17 with TBEV were identified, of which eight were common to both viruses (Figure 2A). These tick proteins are involved in 20 different PPIs with LIV and 19 with TBEV: of these PPIs, eight were common to both viruses at this step (Figure 2A & B).

To verify the authenticity of the Y2H interactions and to determine whether tick preys found to interact with a single virus actually interacted with the cognate viral protein of the other virus, each of the tick preys was tested pairwise for its capacity to interact with the orthologous viral bait of both viruses. In particular, the reconstitution of a plasmid encoding a putative interactor by homologous recombination (GR) was used to verify pairwise PPI. That is, this strategy revealed whether tick prey proteins identified for a single virus were actually common to both. By this means, 17 of the 20 PPIs were confirmed for LIV (85%) and 15 of 19 (79%) for TBEV (Figure 2C, D, E, F). These confirmed PPIs involved 22 distinct tick proteins, of which two, Ir8 and Ir12, interacted with two different viral proteins; that is, M and 2K for Ir8 and NS5 and pM for Ir12. Moreover, we were able to identify seven and nine virus-tick interactions for LIV and TBEV, respectively that had not been detected in the initial Y2H screen. Conversely, seven PPIs implicating five tick proteins were not confirmed using this strategy and thus were not retained for further analysis. The majority (36/48) of the PPIs involved the pM (16) and the NS5 (20) viral proteins, with the remaining interactions concerning the M, NS2A, NS4A and 2K proteins (Figure 2G). Of note, no interactions were evidenced for six viral proteins (C, E, NS1, NS2B, NS3 and NS4B) for either LIV or TBEV using the chosen approach. In sum, each tick prey identified was common to both viruses and interacted with the corresponding viral protein – or in two cases, viral proteins – of LIV and TBEV. In total, 48 PPIs were identified, 24 for each virus, and these involved 22 different tick proteins.

Analysis of the tick-borne flavivirus – tick PPI network

Based on our high-throughput Y2H screen and GR confirmation, we used a network representation to visualize the LIV/TBEV-tick PPIs (Figure 3). The network is thus composed of 46 nodes that are connected by 48 edges. Among the nodes, 24 and 22 represent viral or tick proteins, respectively. All

of the latter interacted with the cognate protein of LIV and TBEV. Of the 48 edges, which symbolize the PPIs, 32 were identified with Y2H and GR, and 16 by GR. To address the strength of the PPIs, the GR screen was performed at a range of 3-AT concentrations (5, 20, 35 and 50 mM). Indeed, the higher the concentration of 3-AT at which a PPI withstands, the stronger the PPI is presumed to be. Thus, among the 48 identified PPIs, 31 could be evidenced with 50 mM of 3-AT, of which 16 and 15 respectively were for LIV and TBEV. In most cases (13), the PPIs that withstood at elevated stringency – suggesting strong physical interactions in the Y2H context – withstood for both viruses. In contrast, eight PPIs, five for LIV and three for TBEV, were only evidenced using 5 mM of 3-AT, suggesting a weaker interaction.

Gene assignment was performed for the 22 *I. ricinus* preys, arbitrarily designated Ir1 to Ir22, by BLASTX analysis against the *I. scapularis* genome. The *I. scapularis* orthologues have been listed with their corresponding descriptions in Table 1. Nineteen *I. ricinus* proteins of the 22 identified by the Y2H screen displayed greater than 70% amino acid identity to *I. scapularis* proteins. In particular, the amino acid sequences of Ir5, Ir7, Ir12 and Ir17 were identical to those of ISCW003606, ISCW006829, ISCW012742 and ISCW021388, respectively, with a query cover ranging from 74% to 99% for Ir7, Ir12 and Ir17, though only 40% for Ir5. The remaining three proteins, Ir4, Ir19 and Ir21, were found to possess 22.6%, 37.2% and 55.4% amino acid sequence identity with, respectively, ISCW002391, ISCW021630 and ISCW024393 proteins (Table 1; Additional file 6).

Among the available annotated genomes, that of *I. scapularis* is the closest to *I. ricinus*. Nevertheless, the *I. scapularis* genome is still rather sparsely defined. In order to enrich annotation of the PPI network obtained by Y2H, we thus performed a BLASTX search in which the 22 *I. ricinus* sequences were used to query the genomes of three other organisms; namely, *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti* and *Homo sapiens*. The orthologous proteins and their description are listed in Tables 2, 3 and 4, respectively. No orthologues were identified for Ir4, Ir6, Ir19, Ir21 and Ir22 in *D. melanogaster*, for Ir6 and Ir21 in *Ae. aegypti*, or for Ir4 and Ir6 in *H. sapiens*.

Table 1. *Ixodes scapularis* orthologues of *Ixodes ricinus* genes and encoded proteins identified by yeast two-hybrid screening and gap repair

<i>I. ricinus</i> ID	<i>I. scapularis</i> gene stable ID	<i>I. scapularis</i> protein name and/or description	% identity of <i>I. ricinus</i> protein to <i>I. scapularis</i>	% query cover	E-value
Ir1	ISCW000126	Conserved hypothetical protein	98.48	98	3.00E-40
Ir2	ISCW000339	Lamin Dm0-like	90.41	86	4.00E-177
Ir3	ISCW000545	Transcription factor jun-D	93.70	71	4.00E-122
Ir4	ISCW002391	TNF receptor-associated factor 4	22.58	71	5.00E-08
Ir5	ISCW003606	Dynein light chain 1	100.00	39	5.00E-57
Ir6	ISCW006409	Uncharacterized protein LOC8050906	79.76	73	3.00E-115
Ir7	ISCW006829	Ubiquitin-1	100.00	74	7.00E-68
Ir8	ISCW010489	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein beta-like	99.15	77	5.00E-147
Ir9	ISCW011773	TNF receptor-associated factor 6-like	88.78	76	9.00E-134
Ir10	ISCW011803	Serine/threonine-protein kinase 26	97.75	71	9.00E-137
Ir11	ISCW011930	TNF receptor-associated factor 5-like	76.07	56	8.00E-85
Ir12	ISCW012742	Transcription initiation factor TFIIID subunit 1	100.00	85	8.00E-180
Ir13	ISCW015959	RUN domain-containing protein 1	99.25	80	9.00E-117
Ir14	ISCW017452	Methionine-tRNA ligase	99.17	76	1.00E-143
Ir15	ISCW021017	Unconventional myosin-Va	100.00	78	3.00E-144
Ir16	ISCW021148	Adenosine kinase 2	97.45	65	2.00E-139
Ir17	ISCW021388	Serine/threonine-protein kinase 26	100.00	99	1.00E-69
Ir18	ISCW021545	Fibrillin-2	95.88	95	7.00E-159
Ir19	ISCW021630	TNF receptor-associated factor 4	36.39	87	1.00E-47
Ir20	ISCW023717	Protein SGT1 homolog	93.91	73	7.00E-135
Ir21	ISCW024393	E3 ubiquitin-protein ligase TRIM68-like	55.35	87	2.00E-65
Ir22	ISCW024608	Glutathione S-transferase	97.10	68	7.00E-95

Table 2. *Drosophila melanogaster* orthologues of *Ixodes ricinus* genes and encoded proteins identified by yeast two-hybrid screening and gap repair

<i>I. ricinus</i> ID	<i>D. melanogaster</i> gene stable ID	<i>D. melanogaster</i> protein name and/or description	% identity of <i>I. ricinus</i> protein to <i>D. melanogaster</i>	% query cover	E-value
Ir1	FBgn0025366	lp259: Intronic protein 259	78.12	95	3.00E-28
Ir2	FBgn0002525	Lam: Lamin	46.13	85	2.00E-80
Ir3	FBgn0001291	Jra: Djun gene product	35.9	55	3.00E-19
Ir4	-	-	-	-	-
Ir5	FBgn0011760	Ctp: Dynein light chain	96.39	39	4.00E-56
Ir6	-	-	-	-	-
Ir7	FBgn0031057	Ubqn: Ubiquitin	49.52	57	4.00E-21
Ir8	FBgn0032640	Sgt: Small glutamine-rich tetratricopeptide containing protein	31.47	62	1.00E-28
Ir9	FBgn0283649	Elgi: Early girl	24.02	62	2.00E-07
Ir10	FBgn0266465	GckIII: Germinal centre kinase III	93.12	69	8.00E-129
Ir11	FBgn0283649	TRAF6: TNF receptor-associated factor 6	25.36	40	6.20E-01
Ir12	FBgn0010355	TAF1: TBP-associated factor 1	80.38	85	1.00E-144
Ir13	FBgn0040348	CG3703: Uncharacterized protein Dmel	44.63	52	1.00E-16
Ir14	FBgn0034401	MetRS: Methionyl-tRNA synthetase	67.6	56	2.00E-81
Ir15	FBgn0261397	Didum: Myosin V	30.12	78	1.00E-08
Ir16	FBgn0036337	Adenok: Adenosine kinase	46.24	62	3.00E-50
Ir17	FBgn0266465	GckIII: Germinal centre kinase III	95.1	99	4.00E-65
Ir18	FBgn0053196	Dpy: Dumpy	44.21	69	2.00E-29
Ir19	-	-	-	-	-
Ir20	FBgn0032640	Sgt: Small glutamine-rich tetratricopeptide containing protein	32.65	38	3.00E-12
Ir21	-	-	-	-	-
Ir22	-	-	-	-	-

Table 3. *Aedes aegypti* orthologues of *Ixodes ricinus* genes and encoded proteins identified by yeast two-hybrid screening and gap repair

<i>I. ricinus</i> ID	<i>Ae. aegypti</i> gene stable ID	<i>Ae. aegypti</i> protein name and/or description	% identity of <i>I. ricinus</i> protein to <i>Ae. aegypti</i>	% query cover	E-value
Ir1	AAEL013533	Ribosome biogenesis protein NSA2 homolog	75	95	2.00E-28
Ir2	AAEL003415	Lamin Dm0	41.26	86	1.00E-61
Ir3	AAEL003505	Transcription factor AP-1	40.59	56	2.00E-31
Ir4	AAEL006649	TNF receptor-associated factor 4	43.75	9	6.30E-01
Ir5	AAEL011478	Dynein light chain 1	91.86	41	4.00E-55
Ir6	-	-	-	-	-
Ir7	AAEL007160	Ubiquitin-1	63.81	36	7.00E-27
Ir8	AAEL003634	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein beta	41.31	65	4.00E-51
Ir9	AAEL008184	E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1	23.5	62	1.00E-06
Ir10	AAEL000589	Germinal center kinase 1	84.8	80	5.00E-132
Ir11	AAEL000730	E3 ubiquitin-protein ligase Bre1	31.48	18	7.00E-03
Ir12	AAEL025013	Transcription initiation factor TFIID subunit 1	80.38	85	7.00E-145
Ir13	AAEL000134	RUN domain-containing protein 1	55.56	52	2.00E-23
Ir14	AAEL014709	Methionin-trna ligase	65.36	56	3.00E-80
Ir15	AAEL024528	Unconventional myosin-Vb	29.67	68	2.00E-08
Ir16	AAEL001102	Adenosine kinase	50.51	64	2.00E-63
Ir17	AAEL000589	Serine/threonine-protein kinase 26	96.08	99	7.00E-67
Ir18	AAEL026163	Fibrillin-1	34.78	60	5.00E-30
Ir19	AAEL008551	Transcription factor grauzone	23.47	25	1.50E+00
Ir20	AAEL003634	Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein beta	32.61	35	4.00E-10
Ir21	-	-	-	-	-
Ir22	AAEL010582	Glutathione S-transferase 1-1	27.78	26	1.60E-02

Table 4. *Homo sapiens* orthologues of *Ixodes ricinus* genes and encoded proteins identified by yeast two-hybrid screening and gap repair

<i>I. ricinus</i> ID	<i>H. sapiens</i> gene stable ID	<i>H. sapiens</i> protein name and/or description	% identity of <i>I. ricinus</i> protein to <i>H. sapiens</i>	% query cover	E-value
Ir1	ENSG00000164346	NSA2: Ribosome biogenesis protein NSA2 homolog	80	97	2.00E-31
Ir2	ENSG00000113368	LMNB1: Lamin-B1	35.84	86	2.00E-51
Ir3	ENSG00000130522	JUND: JUN protein	81.13	25	6.00E-20
Ir4	ENSG00000175104	TRAF6: TNF Receptor-associated factor 6	26.09	14	4.70E+00
Ir5	ENSG00000264364	DYNLL2: Dynein light chain 2	95.18	39	3.00E-54
Ir6	-	-	-	-	-
Ir7	ENSG00000135018	UBQLN1: Ubiquilin-1	58.02	38	4.00E-26
Ir8	ENSG00000104969	SGTA: Small glutamine-rich tetratricopeptide repeat-containing protein alpha	48.95	73	1.00E-67
Ir9	ENSG00000179580	RNF151: RING finger protein 151	30.16	46	2.00E-09
Ir10	ENSG00000134602	STK26: Serine/threonine-protein kinase 26	86.18	69	7.00E-119
Ir11	ENSG00000082512	TRAF5: TNF receptor-associated factor 5	32.84	44	2.00E-11
Ir12	ENSG00000147133	TAF1: Transcription initiation factor TFIID subunit 1	83.78	84	1.00E-161
Ir13	ENSG00000198863	RUNDC1: RUN domain-containing protein 1	46.05	61	3.00E-25
Ir14	ENSG00000166986	MARS: Methionine-tRNA ligase	75.84	56	8.00E-95
Ir15	ENSG00000197535	MYO5A: Unconventional myosin-Va	41.46	55	4.00E-21
Ir16	ENSG00000156110	ADK: Adenosine kinase	45.03	64	9.00E-54
Ir17	ENSG00000115694	STK25: Serine/threonine-protein kinase 25	93.14	99	2.00E-64
Ir18	ENSG00000138829	FBN: Fibrillin	37.18	87	1.00E-48
Ir19	ENSG00000076604	TRAF4: TNF receptor-associated factor 4	37.65	24	7.00E-08
Ir20	ENSG00000165416	SUGT1: Protein SGT1 homolog	34.43	68	2.00E-31
Ir21	ENSG00000134871	COL4A2: Collagen alpha-2(IV) chain-like	26.74	61	2.00E-07
Ir22	ENSG00000134184	GSTM1: Glutathione S-transferase Mu 1	34.92	62	3.00E-22

Tick cellular functions targeted by LIV and TBEV

To identify cellular processes that may be targeted by LIV and TBEV, we took advantage of the PANTHER classification system as accessed by the AmiGO2 portal. PANTHER is a large curated biological database of gene/protein families enabling functional characterization of genes and proteins based on their evolutionary relationships to those with known functions, by combining gene function, ontology, pathways and statistical analysis tools [29, 30]. We thus obtained 51 different enriched biological processes (BP) for our set of 22 *I. scapularis* prey (Additional file 4). To identify and visualize the most relevant BP, we used the REVIGO web server (Additional file 5). Briefly, this server summarizes long lists of GO terms by removing redundant terms using a simple clustering algorithm that relies on semantic similarity measures [31]. From the list of 51 GO terms and their associated p values, 18 BP were retained (Figure 4A). These GO terms are displayed with the filter of *I. ricinus* proteins to which they were attributed in Figure 4B. Of note, seven GO terms possessed a frequency in the Uniprot database lower than 1%, and corresponded to relatively specific terms within the hierarchical classification of GO terms, according to the REVIGO algorithm. These BP are “response to cytokine”, “regulation of MAPK cascade”, “regulation of phosphorus metabolic process”, “positive regulation of catalytic activity”, “response to organic substance”, “regulation of cell communication” and “regulation of signaling”, and are attributed to one or more of the eight *I. ricinus* proteins Ir3, Ir5, Ir8, Ir9, Ir10, Ir11, Ir13 and Ir17.

The TBEV/LIV and tick interactomes appeared to be significantly enriched in proteins (Ir3, Ir9, Ir11) with the attribute “response to cytokine”. All of these proteins possess a nucleic acid binding domain, such as the bZIP domain for Ir3, a ring-type domain for Ir9 or a zinc-finger domain for Ir11, according to UniProt. Judging by the orthologues found in our reference genomes, Ir3 appears to be the transcription factor JunD, which belongs to the bZIP family and the Jun subfamily. It has been reported to play a role in dorsal closure, eggshell chorion assembly, epithelial morphogenesis and synaptic growth at neuromuscular junctions in *D. melanogaster* [32–34]. Ir9 was matched to a TRAF (Tumor necrosis factor receptor associated factor) protein, TRAF6, in *I. scapularis*, a myosin binding protein in *D. melanogaster*, an E3 ubiquitin-protein ligase NRDP1 in *Ae. aegypti* and a ring finger protein in *H. sapiens*. Query with Ir11 also returned a TRAF protein, or an E3 ubiquitin ligase in the case of *Ae. aegypti*. The TRAF proteins, of which most possess an E3 ubiquitin ligase activity, are signaling adaptor proteins that are involved in diverse biological processes, such as innate immunity and inflammation [35, 36].

The BP “regulation of MAPK cascade” was attributed to the Ir9, Ir10, Ir11 and Ir17 proteins. Ir10 and Ir17 possess a serine/threonine kinase (STK) domain, and the orthologue of *I. scapularis* Ir17 also comprises a SARAH (for Sav/Rassf/Hpo) domain. This last domain is a carboxy-terminal module of nearly 50 amino acids, which has been detected in three classes of tumor suppressors. In

D. melanogaster, orthologues of Ir10 and Ir17 are depicted as germinal center kinases, which participate in a range of signaling pathways that regulate such cellular processes as apoptosis, cell proliferation, polarity and migration [37]. Regarding the human orthologues, STK25 is known as an oxidant stress-activated kinase, and may play a role in the response to environmental stress and regulation of diverse functions such as protein transport, cell adhesion and migration [38]. STK26, also called MST 4, has been described as a mediator of cell growth and reported to modulate apoptosis [39].

The Ir9, Ir10, Ir11 and Ir17 *I. ricinus* proteins are also related to the three following BP: “regulation of phosphorus metabolic process”, “regulation of signaling” and “regulation of cell communication”.

The BP “response to organic substance” is associated with Ir3, Ir8, Ir9 and Ir11. The Ir8 protein appears to be a cytosolic protein or associated to the membrane, according to Uniprot. Moreover, Ir8 possesses three tetratricopeptide repeat (TPR) domains, a TPR domain being a degenerate sequence of ~34 amino acids, between amino acids 91 and 192. This motif enables proteins, such as Hsp70 and Hsp90, to act as scaffolds for the assembly of different multiprotein complexes [40]. Query of our reference genomes returned the orthologues Sgt, SUGT1 and SGTA for *D. melanogaster*, *Ae. aegypti* and *H. sapiens* genomes, respectively. Sgt, or small glutamine-rich tetratricopeptide protein, is predicted to have molecular adaptor activity, and has been implicated in positive regulation of chaperone-mediated protein folding [41, 42]. SUGT1 is thought to play a role in ubiquitination and thus in the proteasomal degradation of target proteins. SGTA is a co-chaperone protein reported to regulate the sorting of misfolded proteins to the proteasome, in collaboration with the BAG6 protein complex comprising BAG6, TRC35 and UBL4A proteins [43, 44].

Finally, the last highly specific BP “positive regulation of catalytic activity” involves the five *I. ricinus* proteins Ir5, Ir9, Ir10, Ir13 and Ir17. Query of the reference genomes with Ir5 returned dynein light chain 2 (DYNLL2), which is found in the microtubule motors dynein-1 and dynein-2 [45]. These motors carry out retrograde transport in the cytoplasm, with the latter being specialized in transport along motile and sensory cilia and flagella [46]. The *Drosophila* homolog of DYNLL2, Cut up, is thought to be implicated in dynein-mediated transport of neuronal proteasomes [47]. Ir13 appears to be a RUN domain-containing protein, judging by the orthologues recovered for *I. scapularis*, *Ae. aegypti* and *H. sapiens*. This protein has been implicated in the function of GTPases of the Rap and Rab families [48]. Furthermore, the RUN domain may play a role in the interaction of various proteins with cytoskeletal filaments [49] and be involved in intracellular protein transport.

Finally, an unsupervised clustering of the viral bait set was applied according to the GO enrichment ratios for biological processes (Figure 5). The viral protein bait set was clustered into two major groups (2K, M and NS4A versus pM and NS5), suggesting a possible community of biological functions targeted by the two groups of viral proteins.

DISCUSSION

In the arboviral life cycle, vector competence is defined as the intrinsic ability of an arthropod vector to acquire a virus during feeding on a viremic host and then to support sufficient viral replication for transmission to a new vertebrate host during a subsequent bloodmeal [50]. Viruses are obligate intracellular life forms, whose survival requires subversion of the host cell's metabolic pathways and evasion of innate immunity. While for competent arthropod vectors, fitness seems little affected by arboviral infection, co-habitation implies extensive molecular crosstalk between virus and vector, of which binary PPIs are an essential element. In this study, we provide the first description of the PPI network connecting the tick-borne flaviviruses LIV and TBEV with their common vector, the *I. ricinus* tick. This network includes 48 PPIs, 24 for each virus, involving 22 distinct *I. ricinus* cellular proteins. The same set of PPIs was identified for both LIV and TBEV. Several protein-protein interactomes have already been published for flaviviruses with their mammalian hosts, especially humans, but far fewer for flaviviruses with their arthropod vectors. The latter concern mosquito-borne flaviviruses and their mosquito vectors [51–53]. To the best of our knowledge, no PPI network has been previously published for a tick-borne flavivirus – or indeed for any tick-borne virus – and its tick vector.

Choice of Y2H method

Ticks are the leading arthropod vectors responsible for the transmission of the broadest spectrum of pathogens to both humans and animals, and are second only to mosquitoes where transmission of human pathogens is concerned [54]. Despite their importance, relatively little attention has been paid to ticks compared with other arthropods, and published data is thus comparatively limited. Indeed, the genome of the *I. scapularis* tick was published in 2016 but has still not been fully annotated [23]. More recently, Jia et al. have published the genomes of six tick species [55], including *Ixodes persulcatus*, and some efforts are made to sequence and annotate the genome of *I. ricinus* [56, 57]. In this situation, the choice of strategies to establish a PPI network is limited. Methodologies such as affinity purification coupled to mass spectrometry (AP/MS), in which peptides derived from proteins of interest must be identified by referral to protein databases, are only effective when the sequence of the protein in question or its close homolog has been deposited in the database. For *I. ricinus* proteins, Y2H, in which the amino acid sequence of sizeable portions of proteins may be recovered, is an appropriate choice.

The cDNA library

To identify binary PPI between viral and tick proteins by the Y2H approach, viral “baits” were used to screen tick “preys” encoded by a cDNA library. The *I. ricinus* cDNA library was derived from three *I. ricinus* cell lines: IRE11, IRE/CTVM19 and IRE/CTVM20. By including multiple cell lines, we intended

to enhance the diversity of the library. The library can be applied to the study of PPIs between *I. ricinus* and diverse tick-borne pathogens.

Performance of Y2H

By Y2H and GR, our study revealed 24 PPIs for each virus. The fact that the same PPI were recovered for the two viruses suggests that the interactions are likely to be authentic. Although the PPIs have not yet been validated by an unrelated approach, 80% of PPIs identified at least 3 times by Y2H can typically be confirmed in a second experimental system [58]. Nevertheless, while Y2H methodology provides high quality binary PPI [59], individual screens are generally far from exhaustive. Indeed, a quarter of the PPI at best may be identified in a single Y2H screen [60]. In our study, *I. ricinus* interactors were not identified for C, E, NS1, NS2B, NS3 and NS4B proteins. Different explanations may be advanced for the absence of such interactors, and notably for the E protein whose principal role is to bind to the host receptor. First, cDNA for many interactors may be absent or poorly represented in prey cDNA libraries, which is why it is advisable to perform screens with multiple cDNA libraries to achieve a more complete view of the interactome [61, 62]. Second, certain viral proteins may be unable to gain entry or fold accurately in the yeast nucleus, where Y2H interactions occur, owing to physicochemical constraints, such as the presence of transmembrane helices, or to extended length [63]. This limitation could potentially be overcome by performing the screen with viral genes expressed as a set of domains, as demonstrated by Khadka et al. for Dengue virus (DENV) genes [64]. Indeed, this approach evidenced interactions that were missed when full-length genes were used, though using Y2H methodology in both cases.

Moreover, certain other proteomic approaches, such as the above-mentioned AP/MS, are capable of recovering interactors that associate with the proteins of interest in their natural cellular compartment. While AP/MS retrieves assemblies of interactors, of which only some interact directly with the protein of interest, it is useful for generation of “complex” interactome networks, complementary to the “binary” interactome established with the Y2H methodology. Thus, comparative study of flavivirus-host protein interaction networks between DENV and Zika virus (ZIKV) and human host and mosquito vectors revealed a role for NS5 in immune evasion through inhibition of ISG expression. The study also revealed several possible mechanisms for ZIKV microcephaly and neuropathogenesis implicating the NS4A protein [65]. The work of Hafirassou et al. [66], which focused on the role of DENV NS1 during viral replication, led to identification of a set of restriction and dependency factors that deeply affect DENV infection, and revealed cellular protein modules that are co-opted by the replication complex of DENV. The AP/MS methodology would thus be useful to investigate the entire interactomes of TBEV and LIV and *I. ricinus* and, more particularly, when the database of tick genes and proteins is more complete.

Functional consequences

In order to be maintained and transmitted by the tick vector, tick-borne viruses must replicate within the arthropod vector, which can only be accomplished by co-opting the biological machinery of the host cell and evading its antiviral defenses, and notably by means of virus-cell PPIs. Our Y2H screen revealed multiple cellular proteins and thus critical cellular functions of the tick that are presumably hijacked by TBEV and LIV, some of which we will highlight below.

Signal transduction / Transcriptional response / Protein degradation pathways

According to our Y2H screen, TBEV and LIV appear to target signal transduction pathways that control critical cellular processes. First, four tick proteins – Ir4, Ir9, Ir11 and Ir19 – identified as interacting with the NS5 or pM viral proteins, belong to the family of tumor necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF) proteins. TRAFs are a group of signaling adaptors that play diverse roles in inflammation and immunity [35]. In mammals they transduce signals delivered by diverse receptors, including those not only for TNF and related cytokines, but also for such pattern recognition receptors (PRR) as Toll-like receptors (TLR) and retinoic inducible RIG-I-like receptors (RLR). Immediate downstream consequences of TRAF signalling include activation of the transcription factor NF- κ B and mitogen-activated protein kinases (MAPK). By analogy to cytosolic viral recognition in mammals, in which viral RNA is sensed by various RLR and leads to NF- κ B activation, an antiviral response is triggered in insects upon recognition of cytosolic viral RNA by the RIG-I family member Dicer-2 (54, 55). In *Culex* mosquitoes, flaviviral infection has been shown to activate the NF- κ B ortholog Rel2 in a signalling cascade requiring TRAF (56). In insects, activated Rel2 is translocated to the nucleus where it induces expression of the interferon-like gene Vago [67–69]. Secreted Vago activates the Jak-STAT signalling pathway, and has been shown to induce an antiviral response to DENV [70] and ZIKV [71] in *Ae. aegypti* mosquitoes. We hypothesize that interactions between viral proteins (NS5 or pM) and tick TRAF-family members represent viral countermeasures to repress induction of the antiviral response. In particular, TRAF proteins Ir4, Ir9, Ir11 and Ir19 might possibly be sequestered by the interaction with viral proteins, thereby impeding restriction of viral replication.

The Ir3 protein was identified in our screen as an ortholog of JunD, which belongs to the Jun family of proteins whose members are components of activating protein-1 (AP-1) transcription factors. AP-1 designates a set of homo- or heterodimeric transcription factors composed of members of not only Jun, but also Fos, Maf and ATF protein families. AP-1 activity is regulated by MAPK signaling, and as such is influenced by a wide variety of extracellular stimuli, including viral infection and cytokines [72, 73]. AP-1 dimers recognize DNA motifs that are abundant in the genome, and thus influence the expression of a plethora of genes involved in diverse critical functions, including proliferation, differentiation, apoptosis and inflammation. While expression of AP-1 is regulated in a wide variety of

viral infections, few binary interactions between viral proteins and AP-1 family members have been documented. Nevertheless, several proteins (bZIP, APH-2, -3, -4) expressed by the human T-cell leukemia virus (HTLV) have been shown to bind to various AP-1 components, including JunD, with variable impact on transcription depending on the factor and the HTLV subtype [74–76]. AP-1 dimers selectively recognize different DNA motifs, depending on the identity of the dimer, and interact cooperatively with other transcription factors. Thus, interaction between NS5 and JunD, which is expected to affect only JunD-containing AP-1 dimers, is likely to affect transcription of a subset of AP-1-regulated genes. Whether such interaction serves to increase an advantageous transcriptional response, or repress an unfavorable one such as an antiviral response triggered by DICER-2 sensing of viral RNA, remains to be determined.

The Ir7 protein, which interacts with NS4A, is an ortholog of ubiquilin-1. Ubiquilins play important roles in both cytosolic and transmembrane protein degradation pathways, not only as adaptor molecules that shuttle polyubiquitinated proteins to the proteasome, but also as regulators of autophagy and endoplasmic reticulum-associated protein degradation (for a review see [77]). Proteins of several viruses have been found to interact with ubiquilin family members, as is notably the case for the NS5B protein of hepatitis C virus, whose interaction with human ubiquilin-1 diminishes the half-life of NS5B and which may regulate viral replication [78] and for the NS4A protein of West Nile virus [79]. Intriguingly, the TLR3 antiviral pathway may be subject to inhibition by ubiquilin-1, through its interaction with the TLR domain, according to a Y2H-based study [80]. It is thus likely that physical interaction between tick ubiquilin (Ir7) and NS4A of TBEV and LIV affects viral interplay with protein degradation pathways, but whether to the viruses' advantage or disadvantage remains to be elucidated.

Cytoskeleton

Two cellular proteins, Ir5 and Ir15, retrieved as interacting with the pM and NS5 viral proteins, respectively, correspond to known components of cytoskeletal motor complexes. Ir5 was identified as a member of the family of dynein light chains, which are highly conserved proteins originally identified as being components of both the dynein microtubular and myosin Va motor complexes [81]. Various proteins of diverse viruses have been shown to bind to dynein light chains, but whether such interactions permit coupling of viruses to molecular motors and hence use of microtubules or F-actin tracks for intracellular viral transport is still open to debate (for review see [82]). Dynein light chains have since been shown to bind to a plethora of cellular proteins and been linked to a large number of cellular functions. Of note, the *Drosophila* homolog, Cut up, has been proposed to be implicated in dynein-mediated transport of neuronal proteasomes [47], and human DYNLL2 – in conjunction with

myosin Va – in sequestration of pro-apoptotic factors, suggesting a role for these last two proteins as pro-survival molecules [83].

Orthologs of Ir15, on the other hand, were identified as belonging to the myosin V family of unconventional myosin motor proteins, namely myosin 5a in *H. sapiens* or Didum in *D. melanogaster*. Myosin V is involved in short-range transport of diverse intracellular cargo – such as organelles, vesicles, protein complexes and mRNA – along actin filaments [84]. To the best of our knowledge, no published report of a binary interaction between a viral protein and myosin V exists in the literature, although human myosin 5a has been shown to be important for early events during infection by Rhinovirus B14 [85], for transport of herpes simplex virus 1 from the trans-Golgi network toward the plasma membrane [86] and for nuclear egress of human cytomegalovirus [87]. Moreover, the myosin V paralog 5c has been implicated in the release of DENV [88]. NS5 being a nonstructural protein, it would be unlikely to promote viral egress by direct coupling viral particles to myosin V. Rather, the interaction might promote intracellular mobility of the NS5 protein itself or the proteins and/or cargo with which NS5 interacts, or might disrupt coupling of myosin V to its conventional cargo, as remains to be elucidated.

Other processes

Our PPI network revealed diverse processes that appear to be targeted by TBEV and LIV, such as cell proliferation and cell cycle regulation. The nop seven-associated 2 (NSA2) protein – an orthologue of Ir1 in our screen and also known as TINP1 (TGF- β inducible nuclear protein 1) – is a nucleolar protein involved in cell proliferation and cell cycle regulation [89]. NSA2 is evolutionarily conserved across different species, and required for ribosome biogenesis and synthesis [90]. Flaviviruses have been reported to disrupt ribosome biogenesis [91], in particular for Japanese encephalitis virus (JEV) and DENV via the interaction of capsid with ribosome biogenesis factors [92, 93]. Our screen suggests that the NS5 of TBEV and LIV could also disrupt ribosome biogenesis, presumably to decrease the translation of host proteins and to promote the translation of the viral polyprotein instead. By interfering with cell proliferation, NS5 could increase the number of cells that potentially could be infected by the virus, and so raise the infectious viral particle production. In a recent study, cell proliferation rate was shown to influence mosquito infection and vector competence for DENV [94].

significance of PPI for ecology of tick-borne viruses

Despite high genetic proximity, TBEV and LIV are ecologically distinct, possibly in relation to distinct PPI maintained with their arthropod vectors, mammalian reservoir or accidental hosts. In our screen, identical PPI with the *I. ricinus* tick cells were recovered for both viruses. As mentioned above, Y2H screens are never exhaustive, and in all likelihood only a small fraction of existing PPI was recovered

in this study. We therefore cannot exclude that virus-specific PPI with *I. ricinus* exist. Nevertheless, our results do not provide evidence that TBEV and LIV interact differently with *I. ricinus*, and thus encourage investigation of PPI between these viruses and alternative tick vectors [95, 96] and reservoir species, so as to provide molecular understanding of the distinctive ecology of these viruses.

CONCLUSION

The present study, providing the PPI network established between two tick-borne flaviviruses (TBEV and LIV) and their arthropod vector *I. ricinus*, represents the first published protein-protein interaction for a tick-borne virus with its arthropod host. Our study reveals that viral proteins of TBEV and LIV interact with multiple protein modules of host cells, including critical pathways governing signal transduction, transcription, protein degradation and cytoskeletal function. Viral intrusion into these pathways provides multiple avenues for discovery of the molecular determinants of vector competence of *I. ricinus* for these viruses, which may be of general importance for other tick-borne viruses. Given the relatively modest number of interactions recovered in the present screen, and the scarcity of interactors that overlap with those identified in other flavivirus-arthropod studies, it is likely that identification of such PPIs is far from reaching the saturation point. Identification of PPIs for tick-borne flaviviruses should thus be pursued, but could also be combined with gene perturbation approaches (RNAi, CRISPR/Cas9), to gain further insight into the function of tick proteins during replication of TBEV, LIV and other tick-borne flaviviruses.

ABBREVIATIONS

TBEV: tick borne encephalitis virus; LIV: louping ill virus; PPI: protein-protein interaction; Y2H: yeast two hybrid; GR: gap repair; C: capsid protein; pM: precursor membrane protein; M: membrane protein; E: envelope protein; NS1: non-structural protein 1 ; NS2A : non-structural protein 2A; NS2B: non-structural protein 2B; NS3: non-structural protein 3; NS4A: non-structural protein 4A; 2K: 2K peptide; NS4B: non-structural protein 4B; NS5: non-structural protein 5; MAPK: mitogen-activated protein kinase; *I. ricinus*: *Ixodes ricinus*; *I. scapularis*: *Ixodes scapularis*; *D. melanogaster*: *Drosophila melanogaster*; *Ae. Aegypti*: *Aedes aegypti*; *H. sapiens*: *Homo sapiens*; *E. coli*: *Escherichia coli* TNF: tumor necrosis factor; TRAF: TNF receptor-associated factor; FBS: fetal bovine serum; MOI: multiplicity of infection; 3-AT: 3-amino-1,2,4-triazol; PRR: pattern recognition receptor; TLR: Toll-like receptor; RLR: RIG-I-like receptor; GO: Gene Ontology; STK: serine/threonine kinase; DYNLL2: dynein light chain 2; AP-1: activating protein 1; AP/MS: affinity purification coupled to mass spectrometry; DENV: dengue virus; ZIKV: zika virus; NK- κ B : nuclear factor-kappa B; HTLV: human T-cell leukemia virus; JEV: Japanese encephalitis virus; TINP1: TGF- β inducible nuclear protein 1; RNAi: RNA interference.

ETHICS APPROVAL AND CONSENT TO PARTICIPATE

Not applicable

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable

AVAILABILITY OF DATA AND MATERIAL

All the data are included within the article and its additional files. The tick cDNA library will be made available upon request.

COMPETING INTERESTS

The authors declare that they have no competing interests.

FUNDING

This study was supported by Laboratoire d'Excellence Integrative Biology of Emerging Infectious Diseases grant ANR-10-LABX-62-IBEID." The Ph.D of M.L. is supported by a grant from the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES, Grant no. PHD2017-2020). G.C., H.A. and J.R. are supported by the National Research Institute for Agriculture, Food and Environment (INRAE). S.M., E.H., D.V. and S.A.L. are supported by the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health & Safety (ANSES). Y.U. is supported by the National Veterinary School of Maisons-Alfort (ENVA). L.B.S. was funded by the United Kingdom Biotechnology and Biological Sciences Research Council grant number BB/P024270/1. NJ is funded by the Department for Environment, Food and Rural Affairs (Defra) and the Scottish and Welsh Governments through project SV3045.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

M.L. carried out all the experiments. J.R. and S.A.L. conceived and designed the study. G.C. and D.V. assisted with the Y2H screen, Y.U. helped in the cloning of viral ORFs and in the GR procedure, H.A. and L.B.S. provided tick cells and helped in the maintenance of tick cells in culture. S.M. and N.J. provided viruses. The paper was drafted by M.L., J.R. and S.A.L. and revised by L.B.S., N.J., S.M., D.V., G.C., and H.A. All authors read and approved the final manuscript.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank the Tick Cell Biobank for provision of the tick cell lines, and Prof. Ulrike Munderloh, University of Minnesota, for permission to use the IRE11 cell line. We thank the Animal and Plant Health Agency, United Kingdom, for providing the louping ill strain LI3/1. We also thank the “Tiques et Maladies à Tiques (TMT)” group of the CNRS “Réseau Ecologie 473 des Interactions Durables” for stimulating discussions and support. We thank Mathieu Charles, Florence Jaffrezic and Denis Laloë from the “Génétique Animale et Biologie Intégrative (GABI)” unit for their help with the GO analyses.

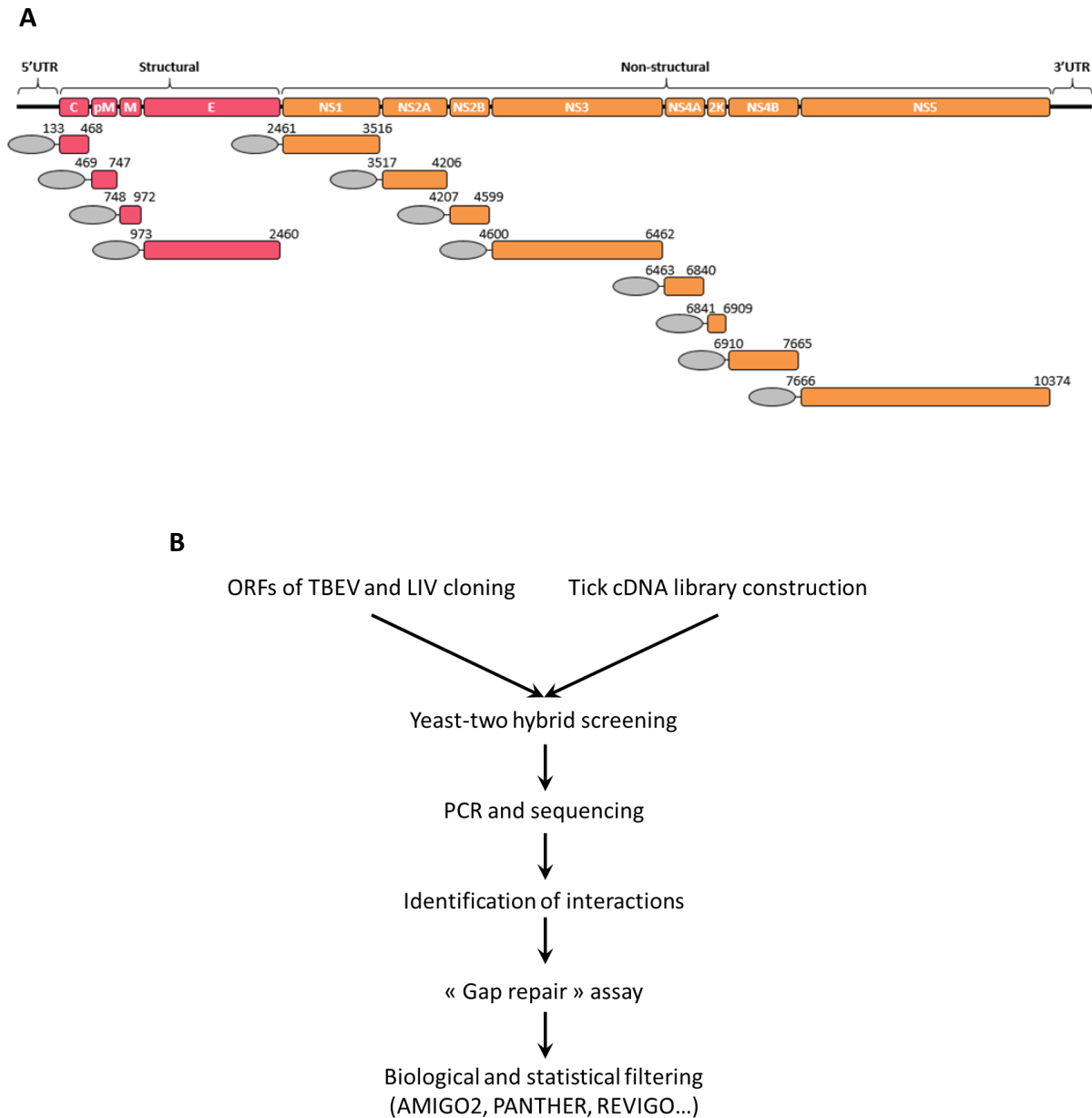


Figure 1. Strategy of TBEV and LIV protein screening. (A) Schematic representation of TBEV and LIV genome; pink and orange boxes represent, respectively, structural and non-structural constructs used for protein-protein interaction (PPI) screening. Grey circles represent the GAL4 DNA binding domain used in the yeast two-hybrid assay. (B) Pipeline describing yeast two-hybrid screening and gap repair validation to define virus-tick PPIs.

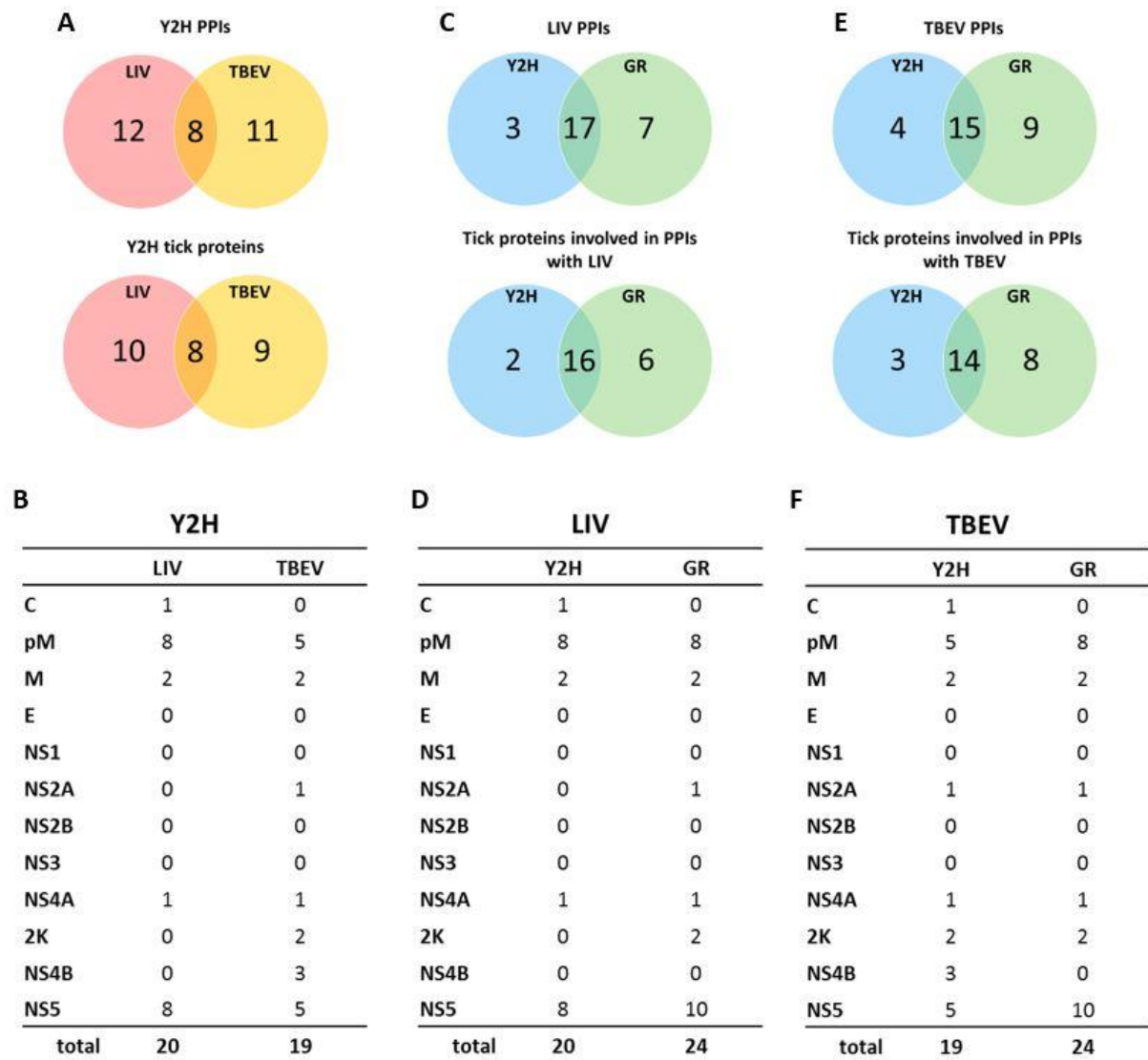


Figure 2. Summary of data from Y2H and GR screens. (A, C and E) Venn diagrams showing the number of protein-protein interactions (PPIs) and tick proteins obtained by Y2H screens for louping ill virus (LIV) and tick-borne encephalitis virus (TBEV); the number indicated in the intersection represents the PPIs or the tick proteins common to LIV and TBEV and identified using Y2H (A) and the PPIs or tick proteins confirmed by GR for LIV (C) and TBEV (E). (B, D and F) Tables indicating the PPIs identified for each viral protein identified in Y2H (B), for LIV (D) and TBEV (F).

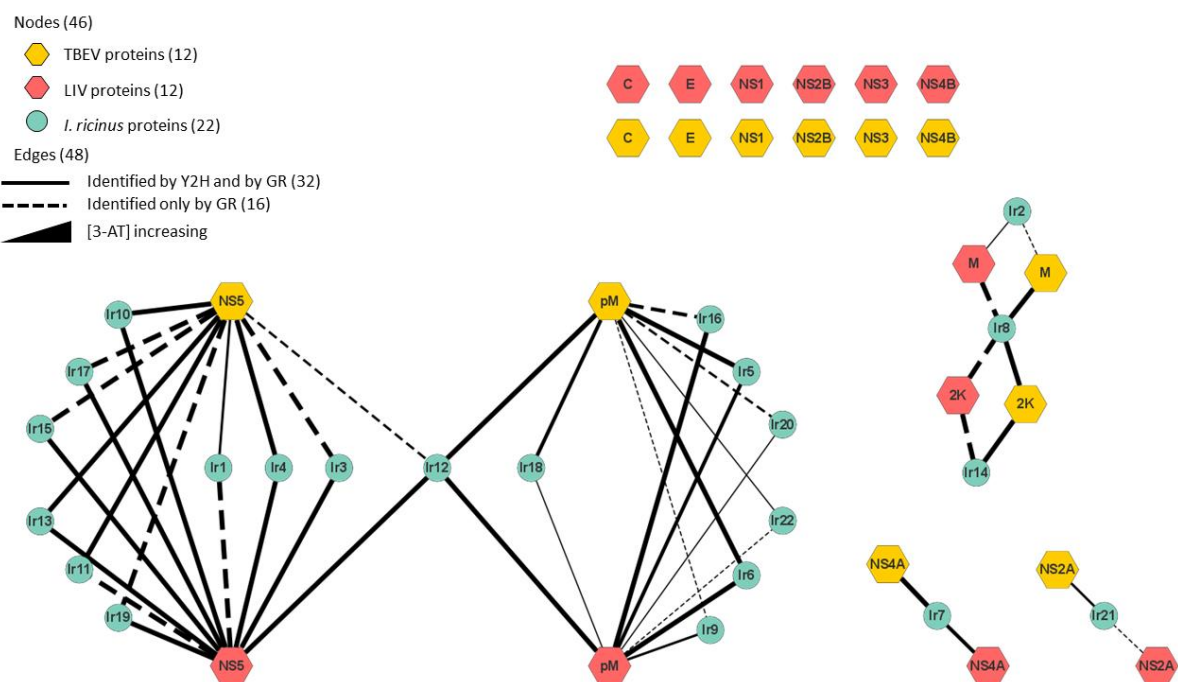
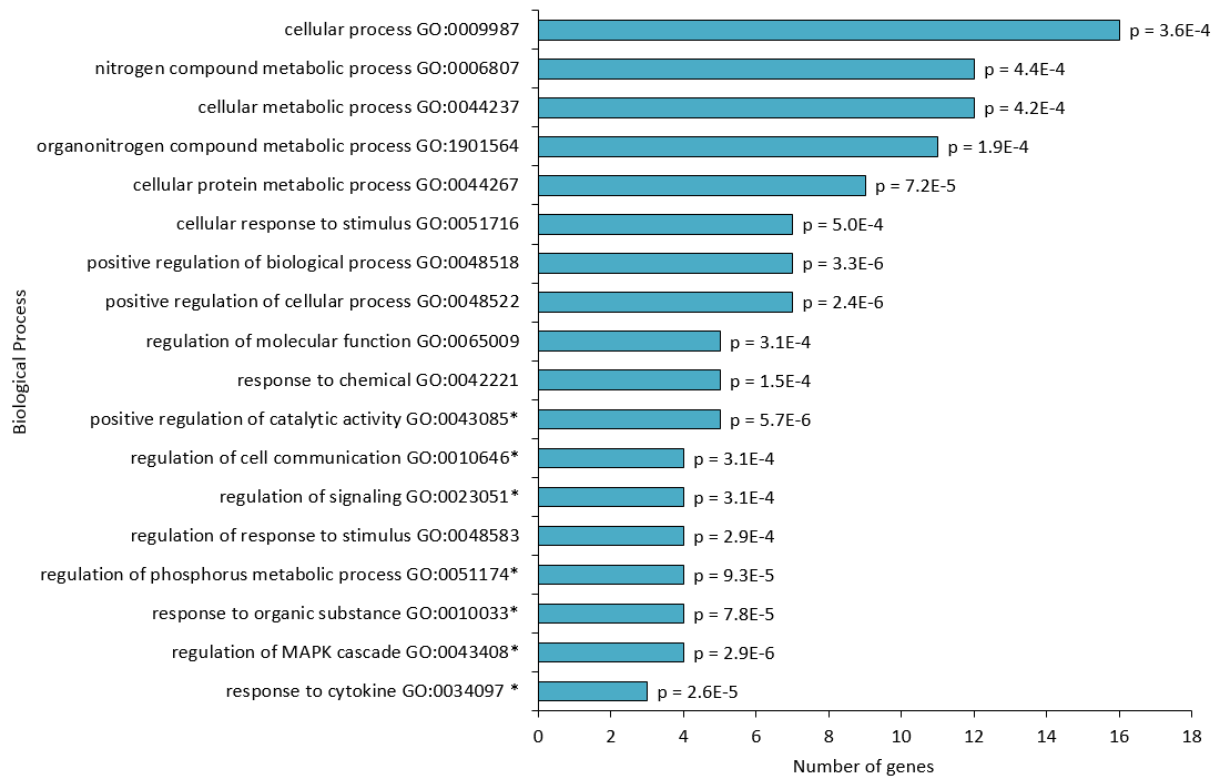


Figure 3. The TBEV/LIV-tick PPI network. Network of PPIs identified by yeast two-hybrid (Y2H) screens and gap repair (GR). LIV and TBEV proteins are represented in orange and red hexagons, respectively. Green nodes indicate tick (*Ixodes ricinus*) proteins identified in our screens. Edges represent PPIs. Solid lines denote interactions identified by both Y2H and GR. Dashed lines denote interactions only identified by GR. The line width represents the concentration of 3-amino-1,2,4-triazol used for the screen.

A



B

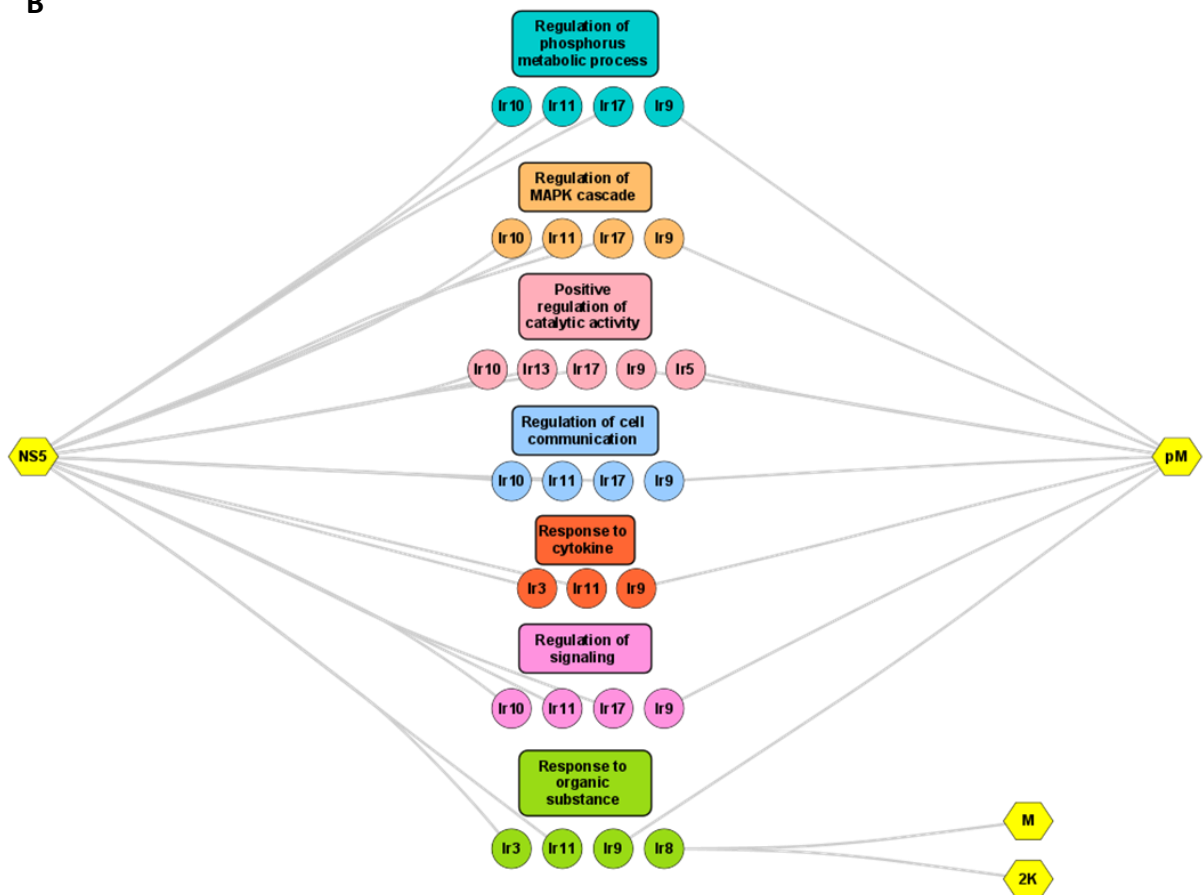


Figure 4. Functional enrichment analysis of tick cellular functions targeted by LIV and TBEV. (A) Histogram indicating statistical enrichment for specific biological processes (BP) determined by Gene Ontology analysis with PANTHER and REVIGO webserver. * represents the 7 most specific biological processes according to REVIGO (B) PPI network of *Ixodes ricinus* proteins identified by our screen and clustered into the 7 functional modules according to enriched GO terms of REVIGO; Yellow hexagons represent viral proteins, circle nodes represent *I. ricinus* proteins and rectangles indicate the enriched biological processes.

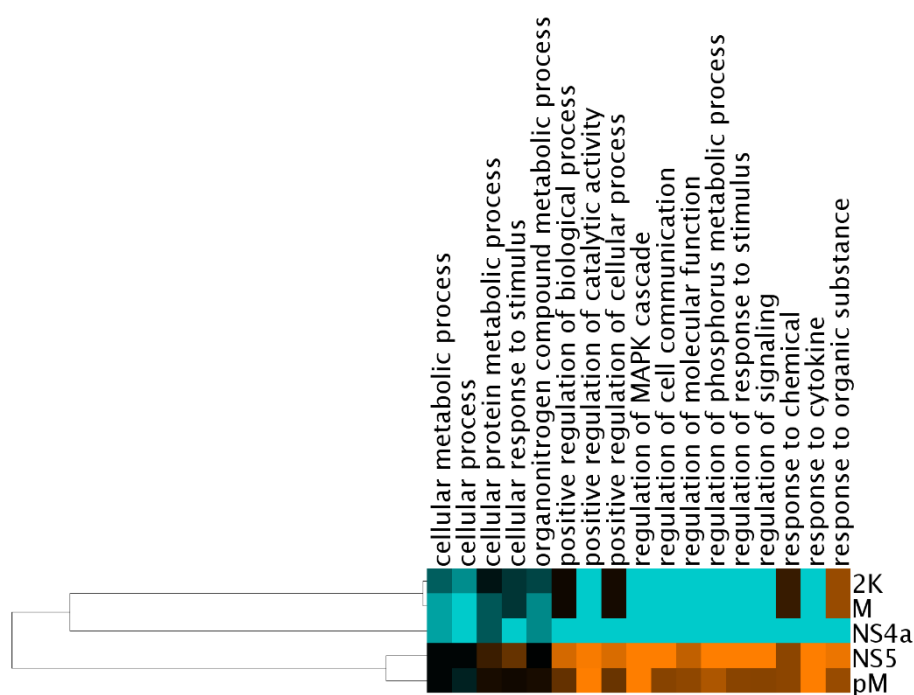


Figure 5. Clustering of viral bait according to GO enrichment ratio for biological processes. Clustering and visualization were performed using clusterMaker2 and JTree TreeView, respectively; 2K: 2K peptide, M: membrane protein, NS4a: Nonstructural protein 4a, NS5: Nonstructural protein 5, pM: pre-membrane protein.

REFERENCES

1. Labuda M, Nuttall PA. Tick-borne viruses. *Parasitology*. 2004;129 Suppl:S221-45. doi:10.1017/s0031182004005220.
2. Calisher CH. Antigenic classification and taxonomy of flaviviruses (family Flaviviridae) emphasizing a universal system for the taxonomy of viruses causing tick-borne encephalitis. *Acta Virol*. 1988;32:469–78. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2904743>. Accessed 21 Oct 2019.
3. Gritsun TS, Nuttall PA, Gould EA. Tick-Borne Flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003;61:317–71. doi:10.1016/S0065-3527(03)61008-0.
4. Süss J. Tick-borne encephalitis 2010: epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia - An overview. *Ticks Tick Borne Dis*. 2011;2:2–15. doi:10.1016/j.ttbdis.2010.10.007.
5. Gritsun TS, Lashkevich VA, Gould EA. Tick-borne encephalitis. *Antiviral Res*. 2003;57:129–46.
6. Lindquist L, Vapalahti O. Tick-borne encephalitis. *The Lancet*. 2008;371:1861–71.
7. Pool WA, Brownlee A, Wilson DR. The etiology of “louping-ill.” *J Comp Pathol Ther*. 1930;43:253–90. doi:10.1016/S0368-1742(30)80026-2.
8. Jeffries CL, Mansfield KL, Phipps LP, Wakeley PR, Mearns R, Schock A, et al. Louping ill virus: An endemic tick-borne disease of Great Britain. *J Gen Virol*. 2014;95 PART 5:1005–14.
9. Gilbert L. Louping ill virus in the UK: a review of the hosts, transmission and ecological consequences of control. *Exp Appl Acarol*. 2016;68:363–74.
10. Rivers TM, Schwentker FF. Louping ill in Man. *J Exp Med*. 1934;59:669–85. doi:10.1084/jem.59.5.669.
11. Spirin V, Mirny LA. Protein complexes and functional modules in molecular networks. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100:12123–8. doi:10.1073/pnas.2032324100.
12. Kovanich D, Saisawang C, Sittipaisankul P, Ramphan S, Kalpongkul N, Somparn P, et al. Analysis of the Zika and Japanese Encephalitis Virus NS5 Interactomes. *J Proteome Res*. 2019;18:3203–18. doi:10.1021/acs.jproteome.9b00318.
13. de la Fuente J, Antunes S, Bonnet S, Cabezas-Cruz A, Domingos AG, Estrada-Peña A, et al. Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7 April:1–13. doi:10.3389/fcimb.2017.00114.
14. Grabowski JM, Hill CA. A Roadmap for Tick-Borne Flavivirus Research in the “Omics” Era. *Front Cell Infect Microbiol*. 2017;7:519. doi:10.3389/fcimb.2017.00519.
15. Lindenbach BD, Thiel H-J, Rice CM. *Flaviviridae*. *Fields Virol*. 2007.
16. Simser JA, Palmer AT, Fingerle V, Wilske B, Kurtti TJ, Munderloh UG. *Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park. *Appl Environ Microbiol*. 2002;68:4559–66. doi:10.1128/AEM.68.9.4559-4566.2002.

17. Bell-Sakyi L, Zweygarth E, Blouin EF, Gould EA, Jongejan F. Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research. *Trends Parasitol.* 2007;23:450–7.
18. Pospíšil L, Jandásek L, Pešek J. Isolation of new strains of meningoencephalitis virus in the Brno region during the summer of 1953. *Lek List.* 1954;9:3–5. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/13131921/>. Accessed 4 Dec 2020.
19. Mansfield KL, Morales AB, Johnson N, Ayllón N, Höfle U, Alberdi P, et al. Identification and characterization of a novel tick-borne flavivirus subtype in goats (*Capra hircus*) in Spain. *J Gen Virol.* 2015;96:1676–81.
20. Titz B, Thomas S, Rajagopala S V., Chiba T, Ito T, Uetz P. Transcriptional activators in yeast. *Nucleic Acids Res.* 2006;34:955–67. doi:10.1093/nar/gkj493.
21. Vidalain PO, Boxem M, Ge H, Li S, Vidal M. Increasing specificity in high-throughput yeast two-hybrid experiments. *Methods.* 2004;32:363–70.
22. Walhout AJM, Vidal M. High-Throughput Yeast Two-Hybrid Assays for Large-Scale Protein Interaction Mapping. *Methods.* 2001;24:297–306. doi:10.1006/METH.2001.1190.
23. Gulia-Nuss M, Nuss AB, Meyer JM, Sonenshine DE, Roe RM, Waterhouse RM, et al. Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease. *Nat Commun.* 2016;7 May 2015.
24. Shannon P, Markiel A, Ozier O, Baliga NS, Wang JT, Ramage D, et al. Cytoscape: A software Environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13:2498–504. doi:10.1101/gr.1239303.
25. Assenov Y, Ramírez F, Schelhorn SESE, Lengauer T, Albrecht M. Computing topological parameters of biological networks. *Bioinformatics.* 2008;24:282–4. doi:10.1093/bioinformatics/btm554.
26. Weisheit S, Villar M, Tykalová H, Popara M, Loecherbach J, Watson M, et al. *Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: Transcriptomic and proteomic analysis. *Parasites and Vectors.* 2015;8:1–26.
27. Mansfield KL, Cook C, Ellis RJ, Bell-Sakyi L, Johnson N, Alberdi P, et al. Tick-borne pathogens induce differential expression of genes promoting cell survival and host resistance in *Ixodes ricinus* cells. *Parasites and Vectors.* 2017;10:1–12.
28. Růžek D, Bell-Sakyi L, Kopecký J, Grubhoffer L. Growth of tick-borne encephalitis virus (European subtype) in cell lines from vector and non-vector ticks. *Virus Res.* 2008;137:142–6. doi:10.1016/j.virusres.2008.05.013.
29. Huaiyu Mi, Anushya Muruganujan, Paul D. Thomas. PANTHER in 2013: modeling the evolution of gene function, and other gene attributes, in the context of phylogenetic trees. *Nucleic Acids Res.* 2013;41:D377–86. doi:10.1038/nprot.2013.092.
30. Paul D. Thomas, Anish Kejariwal, Michael J. Campbell, Huaiyu Mi, Karen Diemer, Nan Guo, et al. PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated

protein family and subfamily classification | Nucleic Acids Research | Oxford Academic. Nucleic Acids Res. 2003;31:334–41. doi:10.1093/nar/gkg115.

31. Supek F, Bošnjak M, Škunca N, Šmuc T. Revigo summarizes and visualizes long lists of gene ontology terms. PLoS One. 2011;6.

32. Riesgo-Escovar JR, Hafen E. *Drosophila* jun kinase regulates expression of *decapentaplegic* via the ets-domain protein Aop and the ap-1 transcription factor Djun during dorsal closure. Genes Dev. 1997;11:1717–27. doi:10.1101/gad.11.13.1717.

33. Kockel L, Zeitlinger J, Staszewski LM, Mlodzik M, Bohmann D. Jun in *Drosophila* development: Redundant and nonredundant functions and regulation by two mapk signal transduction pathways. Genes Dev. 1997;11:1748–58. doi:10.1101/gad.11.13.1748.

34. Franciscovich AL, Vrillas-Mortimer AD, Freeman AA, Gu J, Sanyal S. Overexpression screen in drosophila identifies neuronal roles of GSK-3 β /*shaggy* as a regulator of AP-1-dependent developmental plasticity. Genetics. 2008;180:2057–71. doi:10.1534/genetics.107.085555.

35. Bishop GA, Abdul-Sater AA, Watts TH. Editorial: TRAF Proteins in Health and Disease. Front Immunol. 2019;10 FEB:326. doi:10.3389/fimmu.2019.00326.

36. Xie P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. Journal of Molecular Signaling. 2013;8. doi:10.1186/1750-2187-8-7.

37. Yin H, Shi Z, Jiao S, Chen C, Wang W, Greene MI, et al. Germinal center kinases in immune regulation. Cellular and Molecular Immunology. 2012;9:439–45. doi:10.1038/cmi.2012.30.

38. Preisinger C, Short B, De Corte V, Bruyneel E, Haas A, Kopajtich R, et al. YSK1 is activated by the Golgi matrix protein GM130 and plays a role in cell migration through its substrate 14-3-3 ζ . J Cell Biol. 2004;164:1009–20. doi:10.1083/jcb.200310061.

39. Lin JL, Chen HC, Fang HI, Robinson D, Kung HJ, Shih HM. MST4, a new Ste20-related kinase that mediates cell growth and transformation via modulating ERK pathway. Oncogene. 2001;20:6559–69. doi:10.1038/sj.onc.1204818.

40. Scheufler C, Brinker A, Bourenkov G, Pegoraro S, Moroder L, Bartunik H, et al. Structure of TPR domain-peptide complexes: Critical elements in the assembly of the Hsp70-Hsp90 multichaperone machine. Cell. 2000;101:199–210. doi:10.1016/S0092-8674(00)80830-2.

41. Uytterhoeven V, Lauwers E, Maes I, Miskiewicz K, Melo MN, Swerts J, et al. Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. Neuron. 2015;88:735–48.

42. Tobaben S, Thakur P, Fernández-Chacón R, Südhof TC, Rettig J, Stahl B. A trimeric protein complex functions as a synaptic chaperone machine. Neuron. 2001;31:987–99.

43. Leznicki P, High S. SGTA antagonizes BAG6-mediated protein triage. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:19214–9. doi:10.1073/pnas.1209997109.

44. Krysztofinska EM, Martínez-Lumbreras S, Thapaliya A, Evans NJ, High S, Isaacson RL. Structural and functional insights into the E3 ligase, RNF126. *Sci Rep.* 2016;6. doi:10.1038/srep26433.
45. Asante D, Stevenson NL, Stephens DJ. Subunit composition of the human cytoplasmic dynein-2 complex. *J Cell Sci.* 2014;127:4774–87. doi:10.1242/jcs.159038.
46. Roberts AJ, Kon T, Knight PJ, Sutoh K, Burgess SA. Functions and mechanics of dynein motor proteins. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.* 2013;14:713–26. doi:10.1038/nrm3667.
47. Kreko-Pierce T, Eaton BA. The *Drosophila* LC8 homolog cut up specifies the axonal transport of proteasomes. *J Cell Sci.* 2017;130:3388–98. doi:10.1242/jcs.207027.
48. Callebaut I, Jean, De Gunzburg, Goud B, Mornon JP. RUN domains: A new family of domains involved in Ras-like GTPase signaling. *Trends in Biochemical Sciences.* 2001;26:79–83. doi:10.1016/S0968-0004(00)01730-8.
49. Mari M, Macia E, Le Marchand-Brustel Y, Cormont M. Role of the FYVE Finger and the RUN Domain for the Subcellular Localization of Rabip4. *J Biol Chem.* 2001;276:42501–8. doi:10.1074/jbc.M104885200.
50. Jongejan F, Uilenberg G. The global importance of ticks. *Parasitology.* 2004;129 SUPPL.:S3–14. doi:10.1017/S0031182004005967.
51. Tham HW, Balasubramaniam VRMT, Chew MF, Ahmad H, Hassan SS. Protein-protein interactions between *A. aegypti* midgut and dengue virus 2: Two-hybrid screens using the midgut cDNA library. *J Infect Dev Ctries.* 2015;9:1338–49. doi:10.3855/jidc.6422.
52. Guo X, Xu Y, Bian G, Pike AD, Xie Y, Xi Z. Response of the mosquito protein interaction network to dengue infection. *BMC Genomics.* 2010;11. doi:10.1186/1471-2164-11-380.
53. Mairiang D, Zhang H, Sodja A, Murali T, Suriyaphol P, Malasit P, et al. Identification of New Protein Interactions between Dengue Fever Virus and Its Hosts, Human and Mosquito. *PLoS One.* 2013;8:e53535. doi:10.1371/journal.pone.0053535.
54. Mansfield KL, Jizhou L, Phipps LP, Johnson N. Emerging Tick-Borne Viruses in the Twenty-First Century. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7 July. doi:10.3389/fcimb.2017.00298.
55. Jia N, Wang J, Shi W, Du L, Sun Y, Zhan W, et al. Large-Scale Comparative Analyses of Tick Genomes Elucidate Their Genetic Diversity and Vector Capacities. *Cell.* 2020;182:1328-1340.e13. doi:10.1016/j.cell.2020.07.023.
56. Cramaro WJ, Revets D, Hunewald OE, Sinner R, Reye AL, Muller CP. Integration of *Ixodes ricinus* genome sequencing with transcriptome and proteome annotation of the naïve midgut. *BMC Genomics.* 2015;16:871. doi:10.1186/s12864-015-1981-7.
57. Cramaro WJ, Hunewald OE, Bell-Sakyi L, Muller CP. Genome scaffolding and annotation for the pathogen vector *Ixodes ricinus* by ultra-long single molecule sequencing. *Parasites and Vectors.* 2017;10. doi:10.1186/s13071-017-2008-9.

58. Li S, Armstrong CM, Bertin N, Ge H, Milstein S, Boxem M, et al. A Map of the Interactome Network of the Metazoan *C. elegans*. *Science* (80-). 2004;303:540–3. doi:10.1126/science.1091403.
59. Chen WY, Ho KC, Leu JH, Liu KF, Wang HC, Kou GH, et al. WSSV infection activates STAT in shrimp. *Dev Comp Immunol*. 2008;32:1142–50. doi:10.1016/j.dci.2008.03.003.
60. Braun P, Tasan M, Dreze M, Barrios-Rodiles M, Lemmens I, Yu H, et al. An experimentally derived confidence score for binary protein-protein interactions. *Nat Methods*. 2009;6:91–7. doi:10.1038/nmeth.1281.
61. Kim MS, Pinto SM, Getnet D, Nirujogi RS, Manda SS, Chaerkady R, et al. A draft map of the human proteome. *Nature*. 2014;509:575–81. doi:10.1038/nature13302.
62. Wilhelm M, Schlegl J, Hahne H, Gholami AM, Lieberenz M, Savitski MM, et al. Mass-spectrometry-based draft of the human proteome. *Nature*. 2014;509:582–7. doi:10.1038/nature13319.
63. Jensen LJ, Bork P. Biochemistry: Not comparable, but complementary. *Science*. 2008;322:56–7. doi:10.1126/science.1164801.
64. Khadka S, Vangeloff AD, Zhang C, Siddavatam P, Heaton NS, Wang L, et al. A physical interaction network of dengue virus and human proteins. *Mol Cell Proteomics*. 2011;10. doi:10.1074/mcp.M111.012187.
65. Shah PS, Link N, Jang GM, Sharp PP, Zhu T, Swaney DL, et al. Comparative Flavivirus-Host Protein Interaction Mapping Reveals Mechanisms of Dengue and Zika Virus Pathogenesis. *Cell*. 2018;;1931–45.
66. Hafirassou ML, Meertens L, Umaña-Díaz C, Labeau A, Dejarnac O, Bonnet-Madin L, et al. A Global Interactome Map of the Dengue Virus NS1 Identifies Virus Restriction and Dependency Host Factors. *Cell Rep*. 2018;22:1364. doi:10.1016/J.CELREP.2018.01.038.
67. Deddouche S, Matt N, Budd A, Mueller S, Kemp C, Galiana-Arnoux D, et al. The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila. *Nat Immunol*. 2008;9:1425–32. doi:10.1038/ni.1664.
68. Paradkar PN, Trinidad L, Voysey R, Duchemin JB, Walker PJ. Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109:18915–20.
69. Paradkar PN, Duchemin J-B, Voysey R, Walker PJ. Dicer-2-Dependent Activation of *Culex* Vago Occurs via the TRAF-Rel2 Signaling Pathway. *PLoS Negl Trop Dis*. 2014;8:e2823. doi:10.1371/journal.pntd.0002823.
70. Souza-Neto JA, Sim S, Dimopoulos G. An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009;106:17841–6.

71. Angleró-Rodríguez YI, MacLeod HJ, Kang S, Carlson JS, Jupatanakul N, Dimopoulos G. *Aedes aegypti* molecular responses to Zika Virus: Modulation of infection by the toll and Jak/Stat immune pathways and virus host factors. *Front Microbiol.* 2017;8 OCT. doi:10.3389/fmicb.2017.02050.
72. Eferl R, Wagner EF. AP-1: A double-edged sword in tumorigenesis. *Nature Reviews Cancer.* 2003;3:859–68. doi:10.1038/nrc1209.
73. Hernandez JM, Floyd DH, Weilbaecher KN, Green PL, Boris-Lawrie K. Multiple facets of junD gene expression are atypical among AP-1 family members. *Oncogene.* 2008;27:4757–67. doi:10.1038/onc.2008.120.
74. Thébault S, Basbous J, Hivin P, Devaux C, Mesnard JM. HBZ interacts with JunD and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett.* 2004;562:165–70. doi:10.1016/S0014-5793(04)00225-X.
75. Larocque E, Andre-Arpin C, Borowiak M, Lemay G, Switzer WM, Duc Dodon M, et al. Human T-Cell Leukemia Virus Type 3 (HTLV-3) and HTLV-4 Antisense-Transcript-Encoded Proteins Interact and Transactivate Jun Family-Dependent Transcription via Their Atypical bZIP Motif. *J Virol.* 2014;88:8956–70. doi:10.1128/jvi.01094-14.
76. Kuhlmann AS, Villaudy J, Gazzolo L, Castellazzi M, Mesnard JM, Dodon MD. HTLV-1 HBZ cooperates with JunD to enhance transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene (hTERT). *Retrovirology.* 2007;4. doi:10.1186/1742-4690-4-92.
77. Jantrapirom S, Piccolo L Lo, Pruksakorn D, Potikanond S, Nimlamool W. Ubiquitin networking in cancers. *Cancers.* 2020;12:1–17. doi:10.3390/cancers12061586.
78. Gao L, Tu H, Shi ST, Lee K-J, Asanaka M, Hwang SB, et al. Interaction with a Ubiquitin-Like Protein Enhances the Ubiquitination and Degradation of Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol.* 2003;77:4149–59. doi:10.1128/jvi.77.7.4149-4159.2003.
79. Li M, Johnson JR, Truong B, Kim G, Weinbren N, Dittmar M, et al. Identification of antiviral roles for the exon–junction complex and nonsense-mediated decay in flaviviral infection. *Nat Microbiol.* 2019;4:985–95. doi:10.1038/s41564-019-0375-z.
80. Biswas N, Liu S, Ronni T, Aussenberg SE, Liu W, Fujita T, et al. The ubiquitin-like protein PLIC-1 or ubiquitin 1 inhibits TLR3-Trif signaling. *PLoS One.* 2011;6. doi:10.1371/journal.pone.0021153.
81. Rapali P, Szenes Á, Radnai L, Bakos A, Pál G, Nyitray L. DYNLL/LC8: A light chain subunit of the dynein motor complex and beyond. *FEBS Journal.* 2011;278:2980–96. doi:10.1111/j.1742-4658.2011.08254.x.
82. Dodding MP, Way M. Coupling viruses to dynein and kinesin-1. *EMBO Journal.* 2011;30:3527–39. doi:10.1038/emboj.2011.283.
83. Izidoro-Toledo TC, Borges AC, Araujo DD, Leitão Mazzi DPS, Junior FON, Sousa JF, et al. A myosin-Va tail fragment sequesters dynein light chains leading to apoptosis in melanoma cells. *Cell Death Dis.* 2013;4. doi:10.1038/cddis.2013.45.

84. Fili N, Toseland CP. Unconventional myosins: How regulation meets function. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020;21. doi:10.3390/ijms21010067.
85. Real-Hohn A, Provance DW, Gonçalves RB, Denani CB, de Oliveira AC, Salerno VP, et al. Impairing the function of MLCK, myosin Va or myosin Vb disrupts Rhinovirus B14 replication. *Sci Rep*. 2017;7. doi:10.1038/s41598-017-17501-z.
86. Roberts KL, Baines JD. Myosin Va Enhances Secretion of Herpes Simplex Virus 1 Virions and Cell Surface Expression of Viral Glycoproteins. *J Virol*. 2010;84:9889–96. doi:10.1128/jvi.00732-10.
87. Wilkie AR, Sharma M, Pesola JM, Ericsson M, Fernandez R, Coen DM. A Role for Myosin Va in Human Cytomegalovirus Nuclear Egress. *J Virol*. 2018;92. doi:10.1128/jvi.01849-17.
88. Xu XF, Chen ZT, Gao N, Zhang JL, An J. Myosin Vc, a member of the actin motor family associated with Rab8, is involved in the release of DV2 from HepG2 cells. *Intervirology*. 2009;52:258–65. doi:10.1159/000230669.
89. Zhang H, Ma X, Shi T, Song Q, Zhao H, Ma D. NSA2, a novel nucleolus protein regulates cell proliferation and cell cycle. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010;391:651–8. doi:10.1016/j.bbrc.2009.11.114.
90. Xing J, Nan X, Cui Q, Ma W, Zhao H. Nop-7-associated 2 (NSA2) is required for ribosome biogenesis and protein synthesis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;505:249–54. doi:10.1016/j.bbrc.2018.09.041.
91. Sotcheff S, Routh A. Understanding flavivirus capsid protein functions: The tip of the iceberg. *Pathogens*. 2020;9. doi:10.3390/pathogens9010042.
92. Tsuda Y, Mori Y, Abe T, Yamashita T, Okamoto T, Ichimura T, et al. Nucleolar Protein B23 Interacts with Japanese Encephalitis Virus Core Protein and Participates in Viral Replication. *Microbiol Immunol*. 2006;50:225–34. doi:10.1111/j.1348-0421.2006.tb03789.x.
93. Balinsky CA, Schmeisser H, Ganesan S, Singh K, Pierson TC, Zoon KC. Nucleolin Interacts with the Dengue Virus Capsid Protein and Plays a Role in Formation of Infectious Virus Particles. *J Virol*. 2013;87:13094–106. doi:10.1128/jvi.00704-13.
94. Taracena ML, Bottino-Rojas V, Talyuli OAC, Walter-Nuno AB, Oliveira JHM, Angleró-Rodríguez YI, et al. Regulation of midgut cell proliferation impacts *Aedes aegypti* susceptibility to dengue virus. *PLoS Negl Trop Dis*. 2018;12. doi:10.1371/journal.pntd.0006498.
95. Ličková M, Fumačová Havlíková S, Sláviková M, Slovák M, Drexler JF, Klempa B. *Dermacentor reticulatus* is a vector of tick-borne encephalitis virus. *Ticks Tick Borne Dis*. 2020;:101414.
96. Belova OA, Litov AG, Kholodilov IS, Kozlovskaya LI, Bell-Sakyi L, Romanova LI, et al. Properties of the tick-borne encephalitis virus population during persistent infection of ixodid ticks and tick cell lines. *Ticks Tick Borne Dis*. 2017;8:895–906. doi:10.1016/j.ttbdis.2017.07.008.

2. Caractérisation de la banque d'ADNc d'*I. ricinus*

2.1. Introduction

Les 22 protéines de tique identifiées par crible double-hybride en levures présentées dans l'article à soumettre (Lemasson et al. en préparation) du même chapitre sont issues d'une banque d'ADNc d'*I. ricinus* établie à partir de trois lignées cellulaires, IRE11, IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20. Comme expliqué précédemment, nous avons fait le choix d'établir la banque d'ADNc d'*I. ricinus* à partir des 3 lignées disponibles pour cette même espèce de tique dans le but d'augmenter la diversité des transcrits. Les 3 lignées sont décrites pour présenter des niveaux de susceptibilités différents aux pathogènes. Ainsi, il est envisageable que certains transcrits, donnant lieu à la synthèse de protéines, soient exprimés différemment au sein des trois lignées.

En ce sens, nous avons souhaité comparer le niveau d'expression de ces 22 protéines de tique dans chacune des lignées cellulaires afin d'appréhender leur influence sur la susceptibilité/résistance aux virus.

2.2. Méthodes

2.2.1. Lignées cellulaires d'*I. ricinus* et banque d'ADNc

La banque d'ADNc de tique est issue de 3 lignées cellulaires embryonnaires d'*I. ricinus*, les IRE11, les IRE/CTVM19 et les IRE/CTVM20. La lignée IRE11 a été établie aux Etats-Unis à partir d'œufs d'une femelle tique collectée en Allemagne. Les lignées IRE/CTVM19 et 20 ont été établies au Royaume-Uni à partir d'un lot d'œufs de 4 femelles tiques. Ces trois lignées sont maintenues en étuve à 30°C sans CO₂. Les IRE11 sont cultivées dans du L-15B supplémenté diluée avec de l'eau 18 MΩ à raison de 3:1. Le L-15B supplémenté est constitué de 10% de tryptose phosphate (TPB, Thermo Fisher Scientific), 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Thermo Fisher Scientific), 0,1% de lipoprotéine bovine (MP Biomedicals, Irvine, CA, USA), 2mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific), 100µg/mL de streptomycine, 100µg/mL de pénicilline ainsi que des vitamines et des acides aminés [474]. Les IRE/CTVM19 sont maintenues dans du milieu L-15 (Leibovitz) supplémenté avec 20% de SVF, 10% de TPB, 2mM L-glutamine, 100µg/mL de streptomycine et 100µg/mL de pénicilline. Les IRE/CTVM20 sont cultivées dans

un milieu constitué à volume équivalent de L-15 et L-15B tous deux supplémentés. Pour établir la banque, les ARNm de chaque lignée ont été extraits et rétro-transcrits en utilisant des amorces oligo(dT). Ces étapes d'élaboration de la banque ont été effectuées par Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA).

2.2.2. Extraction ARN

Les ARNs totaux des lignées cellulaires d'*I. ricinus* ont été extraits avec du Trizol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) en utilisant les conditions du fournisseur.

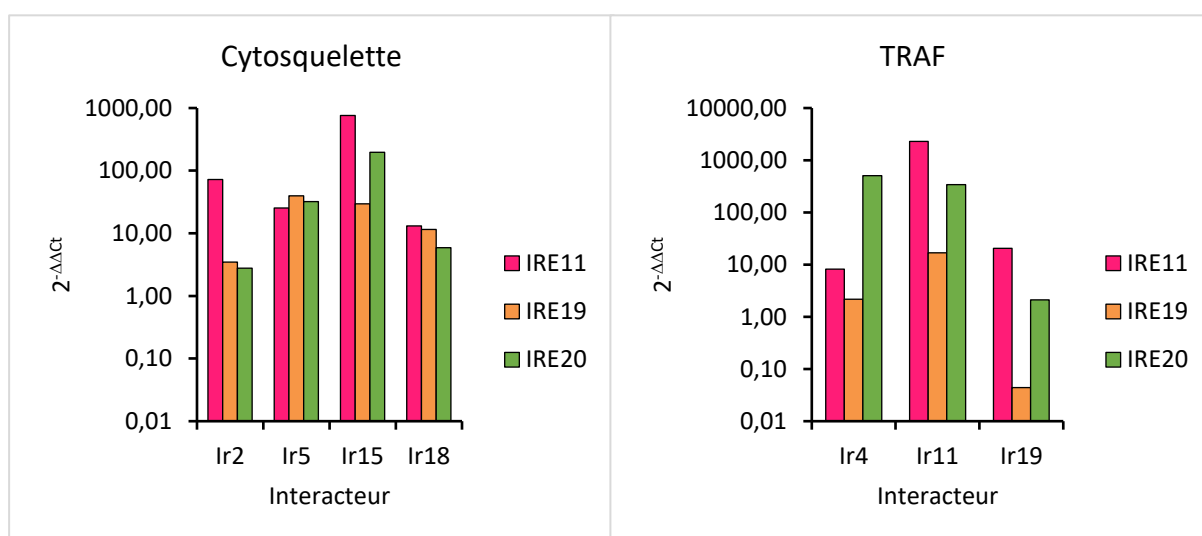
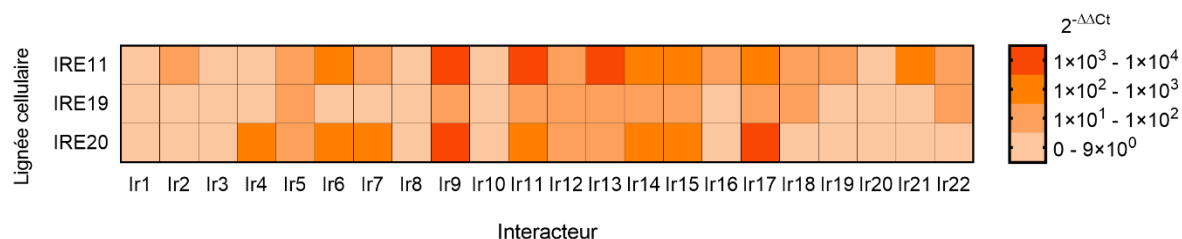
2.2.3. RT-qPCR

La quantité relative de transcrits correspondant aux 22 interacteurs identifiés en crible double-hybride en levure a été évaluée par RT-qPCR en utilisant la qScript™ XLT One-Step RT-qPCR ToughMix® (Quantabio, Beverly, MA, USA) comme mix réactionnel et de l'EvaGreen (Biotium, Fremont, CA, USA) comme intercalant fluorescent. Les amorces propres à l'amplification de chaque transcrit ont été conçues et utilisées ainsi que des amorces permettant l'amplification d'un gène de ménage servant à la normalisation des résultats, la β -actine (**Tableau 3 en annexes**). Les réactions ont été effectuées en suivant les instructions du fournisseur, dans un volume final de 10 μ L, en plaque 96 puits et lues avec le système LightCycler® 96 (Roche, Bâle, Suisse) en utilisant le programme suivant : 50°C pendant 10min, 95°C pendant 1min, puis 45 cycles à 95°C pendant 10sec et 60°C pendant 45sec. La quantité relative de transcrits a été calculée en utilisant la méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ [475] à l'aide de l'expression de chaque protéine de tique dans la banque d'ADNc comme calibrateur. Cette expérimentation a été effectuée une fois en simplicité biologique.

2.3. Résultats

Ces résultats préliminaires (**Figure 29**) semblent indiquer que le niveau d'expression de la majorité (15 sur 22) des transcrits est variable en fonction de la lignée cellulaire d'*I. ricinus* considérée. En effet, 7 transcrits semblent être exprimés de façon similaire dans les 3 lignées, Ir3, Ir5, Ir12, Ir16, Ir18, Ir20 et Ir22. Ces protéines correspondent à 2 protéines du cytosquelette, 2 facteurs de transcription, 2 enzymes et une protéine avec un domaine tétratricopeptide riche en glutamine. Près de la moitié

(9 sur 22) des transcrits sont davantage exprimés à la fois dans les IRE11 et les IRE/CTVM20 que dans les IRE/CTVM19. Toutefois, cette différence d'expression n'est corrélée à aucune famille ou fonction protéique.



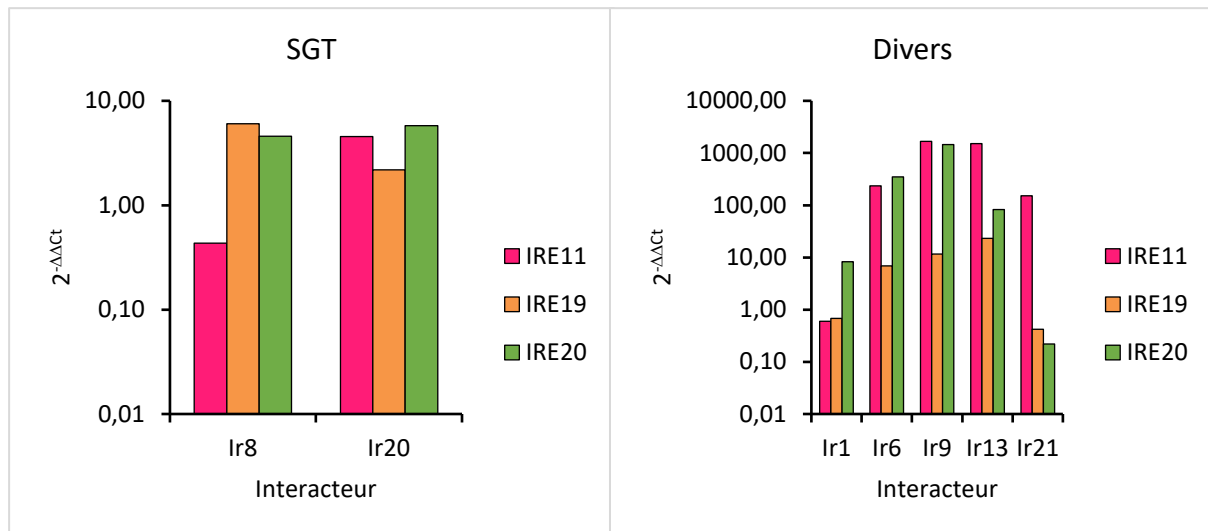


Figure 29. Niveau d'expression des 22 interacteurs tiques dans chacune des 3 lignées cellulaires d'*I. ricinus*

Quantité relative de transcrits des interacteurs tiques dans chaque lignée cellulaire de tique comparées à leur niveau d'expression dans la banque d'ADNc. Ces résultats ont été obtenus par RT-qPCR en utilisant la méthode de calcul des $2^{-\Delta\Delta C_t}$. Les résultats sont représentés par famille ou fonction protéique à savoir des protéines du cytosquelette, des protéines TRAF (facteurs associés aux récepteurs de facteurs de nécrose tumorale), des facteurs de transcription, des enzymes, des protéines contenant un domaine tétratricopeptide riche en glutamine (SGT) et des protéines diverses.

2.4. Conclusion et perspectives

Les trois lignées cellulaires d'*I. ricinus* (IRE11, IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20) semblent exprimer la plupart des interacteurs identifiés par crible double-hybride en levure de façons différentes. Une telle différence, si elle s'avère être confirmée, notamment entre les IRE/CTVM19 et les IRE/CTVM20, peut paraître surprenante au vu de l'origine des lignées, qui ont toutes deux été produites à partir du même lot d'œufs de tique. Toutefois, ces lignées sont polyclonales, ce qui pourrait expliquer la variabilité d'expression observée. Quelles pourraient-être les conséquences d'une différence d'expression (phénotype ou génotype ?) entre les 3 lignées cellulaires d'*I. ricinus* ? La quantité d'une protéine lambda au sein d'une cellule est en partie corrélée par le niveau de transcrit codant cette protéine, présent dans cette même cellule. De ce fait, si cette protéine lambda est plus exprimée et qu'elle est impliquée dans une interaction avec une protéine virale, il semble alors que cette protéine lambda possède une probabilité plus élevée d'entrer en interaction avec la protéine virale en question. Par ailleurs, en modélisant l'infection de TBEV et LIV dans ces différentes lignées cellulaires, il est

envisageable d'identifier d'éventuelles protéines favorisant l'infection virale ou au contraire, la restreignant.

Afin de déterminer le rôle de chacune des 22 protéines de tique sur la réplication des 2 virus dans chacune des 3 lignées cellulaires, l'expression de chaque interacteur sera éteint dans les 3 lignées, l'impact de cette extinction sur la réplication virale sera lors évalué. A l'issue de cette expérimentation, nous serons alors en mesure de conclure quant au rôle pro ou antiviral de chaque interacteur sur la réplication de TBEV et LIV.

Le rôle de ces interacteurs dans la compétence vectorielle d'*I. ricinus* sera alors être déterminé par extinction de l'expression de ces interacteurs chez la tique. La tique sera ensuite infectée par TBEV et LIV et sa capacité à transmettre ces virus sera évaluée par titration du nombre de particules infectieuses présentes dans les glandes salivaires. Cette étude sera réalisée avec Sara Moutailler et Ladislav Simo de l'UMR BIPAR, laboratoire de Santé Animale de l'ANSES Maisons-Alfort, qui dispose d'élevages de tiques *I. ricinus* et de tout le savoir-faire de la manipulation des tiques.

Chapitre 2 : l'ARNi chez *I. ricinus*

1. Introduction

Lorsqu'une tique est infectée par un virus, elle l'est pour toute sa durée de vie. Néanmoins, une infection virale ne semble pas affecter l'intégrité de cet arthropode vecteur. Quels sont donc les mécanismes mis en place par la tique pour contrôler cette infection ? Comment se caractérisent-ils ? L'hypothèse avancée est celle d'une réponse immunitaire antivirale efficace permettant de contenir l'infection dans le temps.

Chez les arthropodes, l'ARNi est considérée comme la réponse antivirale majeure. Néanmoins, cette réponse demeure peu caractérisée chez les tiques. L'ARNi se décline en 3 voies : la voie des siARN, la voie des miARN et la voie des piARN. Les composants moléculaires respectifs de ces voies ne sont pas tous décrits chez la tique *I. ricinus* et la plupart des mécanismes d'action restent à élucider. Ainsi, le second objectif de ce projet de thèse est d'analyser la réponse ARNi chez la tique *I. ricinus*. Dans un premier temps, la modélisation de l'infection à TBEV et à LIV a été réalisée dans 3 lignées cellulaires d'*I. ricinus*. Puis, le séquençage des petits ARN provenant de cellules d'*I. ricinus* infectées par TBEV et LIV et de tiques vivantes infectées par TBEV a été effectué. Enfin, l'expression d'acteurs de la voie des siARN a été inactivée dans une lignée cellulaire d'*I. ricinus* en vue d'étudier l'impact de cette réponse antivirale sur l'infection virale.

2. Matériel et Méthodes

Les caractéristiques majeures des cellules eucaryotes, des bactéries et des souches virales ayant servi lors de l'étude sont répertoriées dans le **Tableau 1** en annexes. Les caractéristiques principales du vecteur et des amorces utilisés sont décrits en annexes dans les **Tableaux 2 et 3** respectivement.

2.1. Culture cellulaire

Les IRE11 [476], les IRE/CTVM19 et les IRE/CTVM20 [477] sont 3 lignées cellulaires embryonnaires d'*I. ricinus* provenant de la tick cell biobank (Institute of Infection and Global Health, University of Liverpool, Royaume-Uni). Ces lignées cellulaires sont maintenues à 30°C en absence de CO₂. Les IRE11 sont cultivées dans du milieu Leibowitz L-15B (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, Etats-Unis) supplémenté et dilué avec de l'eau 18-MΩ à raison de 3 volumes de L-15B pour 1 volume d'eau. Les IRE/CTVM19 sont cultivées dans du milieu L-15 (Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec 20% de

sérum de veau foetal (SVF) (Thermo Fisher Scientific), 10% de tryptose phosphate (TPB) (Thermo Fisher Scientific), 2mM L-glutamine (Thermo Fisher Scientific), 100µg/mL streptomycine (Thermo Fisher Scientific) and 100U/mL pénicilline (Thermo Fisher Scientific). Les IRE/CTVM20 sont cultivées dans un milieu composé à volume équivalent de L-15 et de L-15B tous deux supplémentés. Le L-15B supplémenté est composé de 10% TPB, 5% SVF, 0,1% de lipoprotéine bovine (MP Biomedicals, Irvine, CA, Etats-Unis), 2mM L-glutamine, 100µg/mL streptomycine, 100U/mL pénicilline ainsi que de vitamines et d'acides aminés essentiels [478]. Le pH du milieu L-15B est ajusté à l'aide de soude 1M. Les cellules Vero ont été cultivées dans du Milieu Eagle modifié Dulbecco avec glutamax (DMEM ; Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec 5% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de pyruvate de sodium (Thermo Fisher Scientific). Les cellules sont maintenues à 37°C avec 5% de CO₂ et 98% d'humidité relative.

2.2. Production virale et titration

La souche de TBEV Hypr (accession number : U39292.1) utilisée a été fournie par Sara Moutailler (ANSES, France) et a initialement été isolée chez un enfant en Tchécoslovaquie en 1953. La souche LIV LI/3 (accession number : KP144331.1) a été fournie par Nicholas Johnson (Animal and Plant National Agency, Royaume-Uni) et a été isolée en 1963 en Ecosse à partir d'un mouton. Les souches TBEV et LIV ont subies respectivement 5 et 3 passages successifs en cellules Vero en Milieu Essentiel Minimum (MEM, Thermo Fisher Scientific) supplémenté avec 2% de SVF. Après 5 jours d'infection, le surnageant a été collecté, et centrifugé à 1 500g pendant 10 min afin d'éliminer d'éventuels débris, et aliquoté. Les aliquots ont été conservés à 80°C jusqu'à utilisation. Le titre viral des productions de TBEV et LIV a été déterminé par la technique des plages de lyse. Brièvement, 800 000 cellules Vero ont étéensemencées en plaque 6 puits et infectées 24h après avec des dilutions sériées d'un facteur 10 de la production virale pendant 1h30. L'inoculum viral a été retiré et les cellules ont été rincées avec du PBS pour éliminer les particules virales n'ayant pas pénétré dans les cellules. Une solution constituée d'Avicel 1,2% en MEM 2X (Thermo Fisher Scientific) a été déposé sur les cellules et incubées pendant 5 jours à 37°C avec 5% de CO₂ et 98% d'humidité relative. La solution d'Avicel/MEM a été retirée, les cellules rincées en PBS et colorées avec une solution de paraformaldéhyde 2%/Crystal violet 0,5% pour permettre une quantification de la lyse par visualisation des plages de lyse. Le titre viral des productions a été exprimé en PFU/mL en dénombrant le nombre de plages de lyse à la dilution la plus basse.

2.3. Infections

- Pour les cinétiques

Chacune des lignées de cellules de tiques a étéensemencée à 150 000 cellules/puits en plaque 96 puits avec le milieu de culture approprié. Les échanges gazeux étant néfastes pour les cellules de tique, chaque plaque a été scellée à l'aide d'un film hermétique puis placée dans un sachet mis sous vide et thermo-soudé.

Les cellules ont été infectées 24h après encensement avec TBEV ou LIV à une multiplicité d'infection (MOI) de 1 dans du milieu de cellule de tique L15 non supplémenté pendant 3h à 30°C, sans CO₂ et en conditions hermétiques aux échanges gazeux. L'inoculum d'infection a été retiré et du milieu complet a été ajouté aux cellules. Les cellules ont été incubées durant le temps de la cinétique (6 jours), et les cellules ont été collectées toutes les 24h et conservées en tampon de lyse en vue de l'extraction ultérieure de leurs ARNs.

- Pour le séquençage des petits ARN *in vitro*

Les cellules de tique ont étéensemencées en flasque T12,5 à raison de $5 \cdot 10^6$ cellules par flasque, 72h avant infection. Les cellules ont été infectées avec TBEV ou LIV à une MOI de 1 pendant 3h, à 30°C, sans CO₂. L'inoculum viral a été retiré et le milieu complet de chacune des lignées cellules a été ajouté aux cellules correspondantes. Les cellules ont été incubées à 30°C sans CO₂ jusqu'au jour du pic de l'infection.

- Pour le séquençage des petits ARN *in vivo*

Dix tiques femelles au stade nymphe, exempt d'organismes pathogènes spécifiques et provenant de Slovaquie ont été infectées par voie intracœlomique avec 250nL de TBEV $3,3 \cdot 10^8$ PFU/mL ou 250nL de MEM 2% SVF (contrôle négatif). Elles ont été maintenues à 21°C avec un niveau d'humidité relative de 95% et avec un cycle jour/nuite de 12h.

2.4. Les extractions d'ARN

Toutes les extractions d'ARNs ont été réalisées soit en Trizol (Thermo Fisher Scientific), soit avec le kit NucleoSpin® 8 RNA (Macherey Nagel, Duren, Allemagne), ou encore avec le kit NucleoSpin® RNA Plus (Macherey Nagel) selon les instructions du fournisseur. Ces différentes méthodes d'extraction d'ARN ont été utilisées en fonction de l'application effectuée en aval et sont présentées dans le **Tableau 3**.

Tableau 3. Méthodes d'extraction d'ARN utilisées selon l'application ultérieure

Expérience	Protocole	Nuclesopsin	Nucleospin	Trizol
	Matrice	8 RNA	RNA plus	
Cinétique de réplication virale	Cellules de tique	X	X	
Séquençage des petits ARNs	Cellules de tiques			X ¹
Séquençage des petits ARNs	Broyat de tique		X	X ¹
Préparation matrice pour synthèse in vitro d'ARNdb	Cellules de tique			X
Evaluation de l'extinction de gènes	Cellules de tique		X	

¹ l'extraction d'ARN a été réalisée à l'Unité Virus et Interférence ARN de l'Institut Pasteur

2.5. RT-qPCR

La réplication virale de TBEV et LIV a été évaluée au sein des 3 lignées cellulaires de tique et chez la tique vivante en utilisant la technique de RT-qPCR avec la technologie des sondes TaqMan™. Succinctement, l'ARN extrait été ajouté à un mix constitué de l'enzyme polymérase et de son tampon d'activité, la qScript™ XLT One-Step RT-qPCR ToughMix® (Quantabio, Beverly, MA, Etats-Unis), des amorces TBEV ou LIV spécifiques (450nM, tableau 2 ou 3) et des sondes TBEV ou LIV (100nM, tableau 2 ou 3). Le volume de la réaction a été ajusté avec de l'eau pour atteindre un volume final réactionnel de 10µL. Le profil d'amplification suivant a été utilisé : 50°C pendant 10min, 95°C pendant 1min, puis 45 cycles à 95°C pendant 10sec et 60°C pendant 45sec. La réaction a été réalisée en plaque 96 puits avec le système LightCycler 96 (Roche). La quantité de transcrits a été calculée en utilisant deux méthodes de quantification relative en fonction de l'expérimentation effectuée :

- La quantification relative normalisée par le gène de ménage β -actine d'*I. ricinus* (auquel cas, les amorces et la sonde β -actine (**Tableau 3** des annexes) ont été ajoutées à une concentration de 450 nM et 100 nM respectivement dans le mix réactionnel, avec des résultats exprimés en $2^{-\Delta\Delta Ct}$ comparés à la condition non infectée.
- La méthode des droites standard en utilisant une gamme d'échantillons standard (gène E de TBEV et LIV) avec des résultats exprimés en nombre de copie d'ARN/µL.

La méthode des $2^{-\Delta\Delta Ct}$ a été utilisée lors des cinétiques d'infection tandis que la méthode des droites standard a été utilisée lors de l'infection des tiques *in vivo*.

2.6. Quantité de particules virales infectieuses

La quantité de particules virales infectieuses produites au cours de la cinétique a été déterminée par TCID₅₀ (Median Tissue Culture Infectious Dose). Succinctement, les cellules Vero ont été ensemencées en plaque 96 puits à raison de 25 000 cellules par puits en DMEM+5% SVF. Le milieu des cellules a été retiré 24h après ensemencement et les cellules ont été infectées avec du surnageant de culture ou le broyat de tique dilué en série (10^{-1} à 10^{-8}) dans du DMEM 1X sans SVF. L'infection s'est déroulée pendant 1h30 à 37°C avec 5% CO₂ puis l'inoculum a été retiré. Les cellules ont été rincées une fois avec du DPBS puis du milieu DMEM+2% SVF a été ajouté aux cellules avant une période d'incubation de 4 jours jour à 37°C avec 5% CO₂. La lecture des effets cytopathiques a été réalisée 4 jours post-infection en utilisant la méthode de Reed et Muench [479].

2.7. Réaction de polymérisation en chaîne par transcription inverse (RT-PCR)

Les ARN totaux extraits des cellules IRE/CTVM19 par Trizol ont été rétrotranscrits et amplifiés en une seule étape de RT-PCR à l'aide du kit OneStep RT-PCR (Qiagen). Brièvement, 3ng d'ARN ont été rétrotranscrits en utilisant 400μM de chaque dNTP, 0,6μM d'amorces spécifiques du transcrit ciblé (DCR2, AGO2), un mix d'enzymes permettant la transcription inverse et la PCR avec le tampon de réaction approprié. La réaction a été effectuée dans un volume final de 25μL et le programme suivant a été utilisé : 50° pendant 30 minutes pour l'étape de transcription inverse, 95°C pendant 15min, puis 35 cycles d'amplification de 94°C pendant 30sec, 72°C pendant 1min et 72°C pendant 10min.

2.8. Purification des produits PCR

Après avoir vérifié la taille des produits PCR sur gel d'agarose par électrophorèse, les produits PCR ont été purifiés en utilisant le kit QIAquick PCR purification (Qiagen) et élués dans 10μL d'eau exempte de nucléases.

2.9. Clonage en pGEM-T

Les fragments PCR de DCR2 et AGO2 ont subi l'ajout d'une adénine à leur extrémité 3' en utilisant l'ADN polymérase OneTaq (New England BioLabs (NEB), Ipswich, MA, Etats-Unis) en vue d'une ligature en plasmide pGEM T (Promega, Madison, WI, Etats-Unis). Brièvement, la réaction a été réalisée dans du tampon OneTaq standard avec 7µL de fragments de produits PCR purifiés générés avec la RT-PCR (Qiagen), 0,2mM de dATP et 5 unités d'ADN polymérase OneTaq (NEB) dans un volume final de 10µL. La réaction a été incubée à 72°C pendant 10min. Les fragments PCR « adénylés » en 3' ont ensuite pu être clonés en pGEM-T. La réaction a été effectuée avec 2µL de produit PCR, 50ng de plasmide pGEM-T et 3 unités d'ADN ligase T4 dans du tampon de réaction sous un volume final de 10µL. La réaction a été incubée sur la nuit à 4°C.

2.10. Transformation bactérienne

Les bactéries *E. coli* DH10B (NEB) ont été transformées avec les constructions en pGEM-T. Brièvement, les produits de ligature ont été ajoutés aux bactéries puis placés sur glace pendant 30min avant de subir un choc thermique à 42°C pendant 30sec. La réaction a été incubée à 37°C pendant 1h sous agitation avec un milieu bactérien riche en nutriments (Super Optimal Broth (SOC), NEB). La réaction a ensuite été étalée sur milieu LB agar contenant de l'ampicilline (100 µg/mL) et 40mg/mL de Xgal pour permettre un crible bleu/blanc des colonies. En culture et en présence d'IPTG et de X-gal, les bactéries résistantes à l'ampicilline et transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies blanchâtres car elles ont perdu la capacité de clivage de l'équivalent coloré du lactose (le X-gal) par la β-galactosidase. A l'inverse, les bactéries résistantes à l'ampicilline et non transformées par les plasmides recombinants se présentent sous forme de colonies bleues. La sélection visuelle des bactéries transformées par les plasmides recombinants est donc possible. Les bactéries ont été incubées à 37°C pendant 16h.

2.11. Extraction d'ADN plasmidique et séquençage nucléotidique

Les colonies blanches ont ensuite étéensemencées dans 3 mL de milieu LB avec 100 µg/mL d'ampicilline et mises en culture sur la nuit à 37°C et sous agitation.

L'ADN plasmidique de chaque colonie a alors été extrait à l'aide du kit NucleoSpin Plasmid (Macherey Nagel) suivant les indications du fournisseur. Les plasmides extraits ont été criblés par PCR en utilisant le Master Mix EmeraldAmp MAX PCR (Takara, Kusatu, Japon) et 100 mM d'amorces M13 dans un volume final de 25µL. L'amplification a été réalisée en 35 cycles de dénaturation (95°C, 30sec),

d'hybridation des amorces (60°C, 30sec) et d'élongation (72°C, 1min). Les plasmides dont la taille de l'insert a été vérifiée sur gel d'agarose par électrophorèse ont été séquencés par la société Eurofins (Luxembourg, Luxembourg) pour s'assurer de l'absence de mutations. D'autre part, pour la suite du protocole de transcription *in vitro* des ARNdb, il a été nécessaire de posséder les constructions plasmidiques avec l'insert dans chaque position (sens et anti-sens).

2.12. Digestion pGEM-T

Chaque plasmide (1µg) a été digéré à l'aide de 40 unités d'enzyme de restriction NotI-HF (NEB) dans son tampon de réaction CutSmart sous un volume final de 50 µL. La digestion a été effectuée à 37°C pendant 15min et l'inactivation de l'enzyme s'est déroulée à 65°C pendant 20 min. Une étape de purification de la digestion a été effectuée avec de l'EDTA (0,5M), de l'acide acétique (pH5,2 ; 3M) et de l'éthanol 100% en suivant le protocole section D du kit MEGAscript RNAi (Thermo Fisher Scientific). Une purification sur colonne a été effectuée avec le kit QIAquick PCR purification.

2.13. Synthèse des ARNdb par transcription *in vitro*

Les ARNdb ont été synthétisés à l'aide du kit MEGAscript RNAi. Cette synthèse est basée sur la transcription d'ADN à l'aide d'une ARN polymérase T7. Ainsi, l'ARN polymérase se fixe sur le promoteur T7 du plasmide pGEM-T situé en amont de la séquence d'intérêt et va permettre la synthèse d'un ARNsb. La formation d'un ARNdb s'effectue par l'association dans des proportions équimolaires de molécules d'ARN complémentaires.

Cette synthèse est caractérisée par quatre étapes clés : la transcription, l'hybridation, la digestion DNase/RNase et la purification/quantification.

- La transcription

La réaction de transcription a été effectuée à partir de 2µg de pGEM-T linéarisé et portant l'insert, 7,5mM de chaque dNTPs, l'enzyme T7 polymerase et le tampon de réaction. La réaction a été réalisée dans un volume final de 20µL et incubée à 37°C pendant 4h pour permettre la transcription.

- L'hybridation

Afin d'obtenir des ARNdb, des volumes équivalents d'ARN sens et anti-sens ont été mélangés puis incubés à 75°C pendant 5min avant de laisser la réaction refroidir à température ambiante. Cette étape de refroidissement lent permet l'appariement entre les molécules d'ARNsb et ainsi la formation des ARNdb.

- La digestion

Pour dégrader toute matrice ADN résiduelle ou ARNs non appariés, un traitement à la DNase et à la RNase a été effectué pendant 1h à 37°C.

- La purification/quantification

En vue d'éliminer les différentes enzymes utilisées, les nucléotides libres et d'éventuels produits de dégradation d'acides nucléiques, les ARNdb ont été purifiés sur colonne avant d'être élués dans 100µL de tampon Tris-HCl pH7, 1mM EDTA. La quantité d'ARNdb obtenue a été déterminée en mesurant l'absorbance à 260nm et le profil de l'ARNdb a été visualisé sur gel d'agarose 1% non dénaturant.

2.14. Extinction de l'expression d'AGO2 et DCR2 à l'aide des ARNdb

Les IRE/CTVM19 ont étéensemencées en plaque 96 puits à une concentration de 1,5.10⁵ cellules/puits. L'expression du gène ciblé a été éteinte 24h après ensemencement en transfectant les cellules avec des quantités croissantes d'ARNdb (15, 150 et 1 500 ng) à l'aide du transfectant XtremeGENE (Roche). Brièvement, le ARNdb ont été dilués dans du milieu L 15 pour un volume final de 50µL. 1µL de transfectant XtremeGENE a également été dilué dans du milieu L 15 pour un volume final de 50µL. Ces deux réactions ont été mélangées à volume équivalent et incubées 20 min à température ambiante. Le milieu de culture a été retiré des cellules et 100 µL des réactions de transfection ont été déposés goutte à goutte sur les cellules.

2.15. Isolement des petits ARN

Avant broyage, les tiques ont été rincées 1 fois pendant 5min avec de l'éthanol 70% et deux fois dans de l'eau distillée. Les tiques ont été broyées dans 300µL de DPBS en utilisant 6 billes métalliques et le FastPrep-24™ 5G instrument (MP Biomedicals) à une vitesse de 5,5m/s pendant 3 cycles de 20sec. 200µL de cette réaction de broyage ont été utilisés pour le séquençage des petits ARNs, 50µL pour évaluer la quantité de virus présents dans la tique et 50µL ont été utilisés pour évaluer la quantité de particules infectieuses.

2.16. Séquençage des petits ARN et analyse

Les étapes suivantes ont été réalisées par Hervé Blanc et Lionel Frangeul de l'équipe de Carla Saleh à l'Institut Pasteur. Les ARN totaux des cellules de tique et des tiques entières infectées avec TBEV, LIV ou non infectées ont été extraits en utilisant du Trizol. Les ARNs d'une taille de 19 à 40 nucléotides ont

été purifiés à partir d'un gel 15% acrylamide/bisacrylamide (37,5 : 1), 7M d'urée comme décrit [480]. Les ARN purifiés ont été utilisés pour établir une banque (library) en utilisant NEBNext Multiplex Small RNA Library Prep (Illumina, New England Biolabs). Les 30 adaptateurs issus de la technologie Integrated DNA technologies (linker 1) et des amorces maison ont été utilisés dans ce processus. La banque a été diluée à une concentration de 4M et séquencée à l'aide du séquenceur NextSeq500 (Illumina) avec le NextSeq 500 High-Output Kit v2 (Illumina) (75 cycles). Les reads ont été analysées avec des scripts Perl maison. Les graphiques et les analyses ont été effectuées selon [481].

3. Résultats

3.1. Cinétiques d'infection

L'étude de la réponse immunitaire antivirale de la tique *I. ricinus* suite à une infection virale par TBEV et LIV a débuté par la modélisation de l'infection. Ainsi, les trois lignées cellulaires d'*I. ricinus* IRE11, IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20 ont été infectées par TBEV et LIV à une MOI de 1, et la quantité d'ARN viral a été évaluée au cours du temps par RTqPCR (**Figure 30**).

Lorsque les IRE11 sont infectées par TBEV et LIV, le profil de l'infection est sensiblement identique. En effet, la quantité d'ARN viral la plus élevée est obtenue 2 jours après l'infection. Cette quantité d'ARN viral se maintient au cours des 6 jours suivants l'infection, avec une légère diminution au cours du temps de l'ARN de LIV comparée à la condition non infectée.

Pour les cellules IRE/CTVM19 infectées avec TBEV et LIV, le profil de l'infection semble plus irrégulier. La quantité d'ARN viral la plus élevée est obtenue plus tardivement que dans les IRE11. Avec TBEV, le pic de réplication apparaît 3 jours après l'infection et se maintient au même niveau 6 jours après l'infection. La figure 1 montre que l'infection par LIV se caractérise quant à elle par 2 pics d'infection, un premier apparaissant 2 jours après l'infection et un second, où la quantité d'ARN virale est plus importante, qui intervient entre le 4^e et le 5^e jour après l'infection. Par ailleurs, la quantité d'ARN viral relative de TBEV et LIV apparaît plus importante dans les IRE/CTVM19 que dans les IRE11 suggérant que la réplication du virus est plus efficace dans les IRE/CTVM19.

En ce qui concerne les IRE/CTVM20 infectées par TBEV et LIV, le profil de l'infection semble similaire mais avec des quantités d'ARN viral supérieures (près d'un facteur 10) lors de l'infection avec TBEV comparé à celles obtenues LIV. Néanmoins dans les 2 cas, la quantité d'ARN viral la plus élevée est atteinte 2 jours après l'infection et se maintient jusqu'à 6 jours après l'infection.

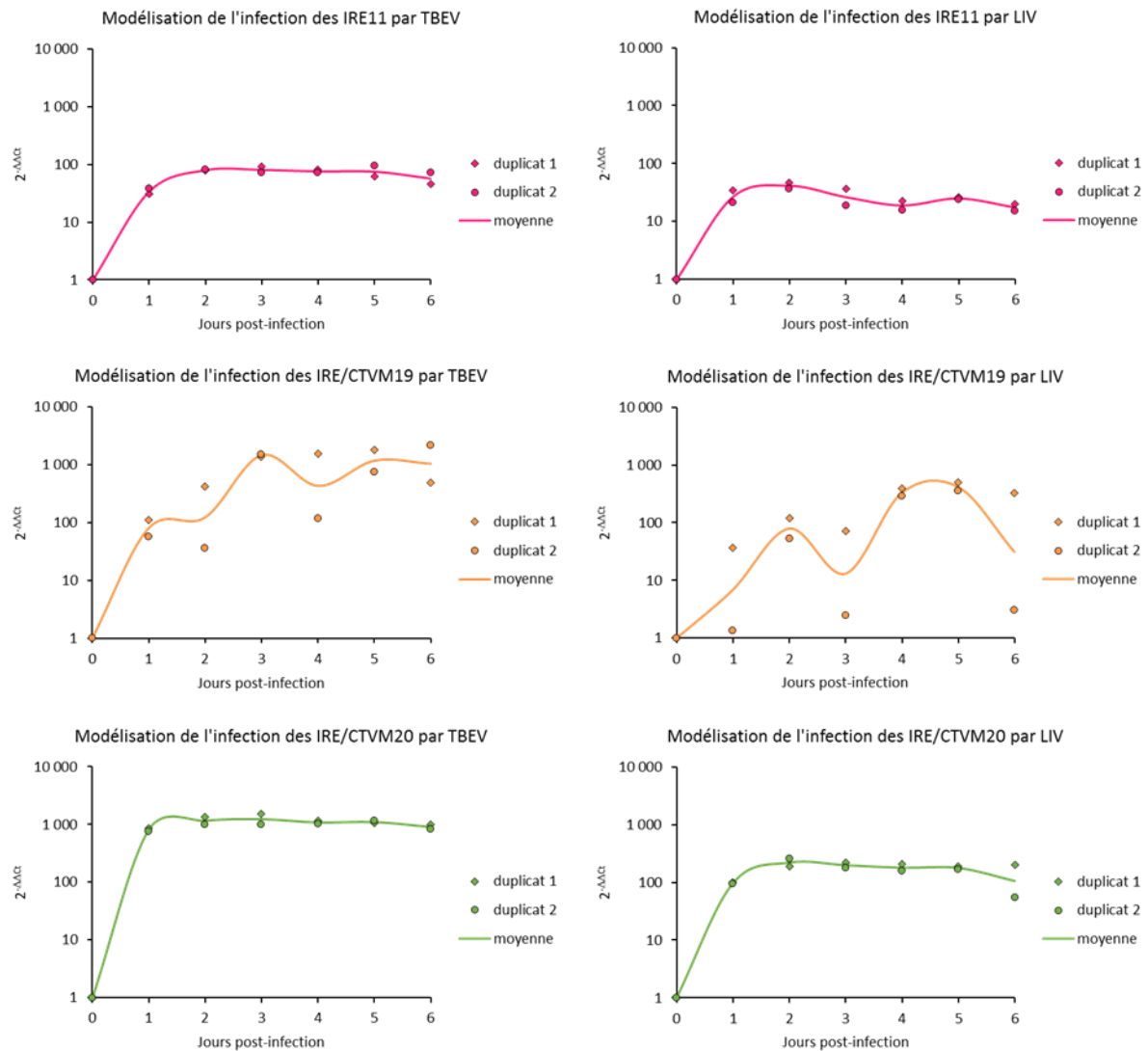


Figure 30. Modélisation de l'infection des 3 lignées cellulaires d'*I. ricinus* par TBEV et LIV au cours du temps

Les IRE11, les IRE/CTVM19 et les IRE/CTVM20 ont été infectées par TBEV et LIV à une MOI de 1, 24h après ensemencement, en plaque 96 puits. La quantité relative d'ARN viral de TBEV et LIV a été mesurée quotidiennement sur 6 jours et est exprimée en $2^{-\Delta\Delta C_t}$ par rapport à l'actine d'*I. ricinus*. L'expérience a été réalisée une fois en duplicatas (losange/cercle) et la courbe représente la moyenne des duplicatas.

En résumé, les 3 lignées cellulaires d'*I. ricinus* sont permissives à l'infection par TBEV et LIV (**Figure 31**). Néanmoins, le profil de l'infection est différent dans chaque lignée, et TBEV semble mieux se répliquer que LIV dans chacune des lignées.

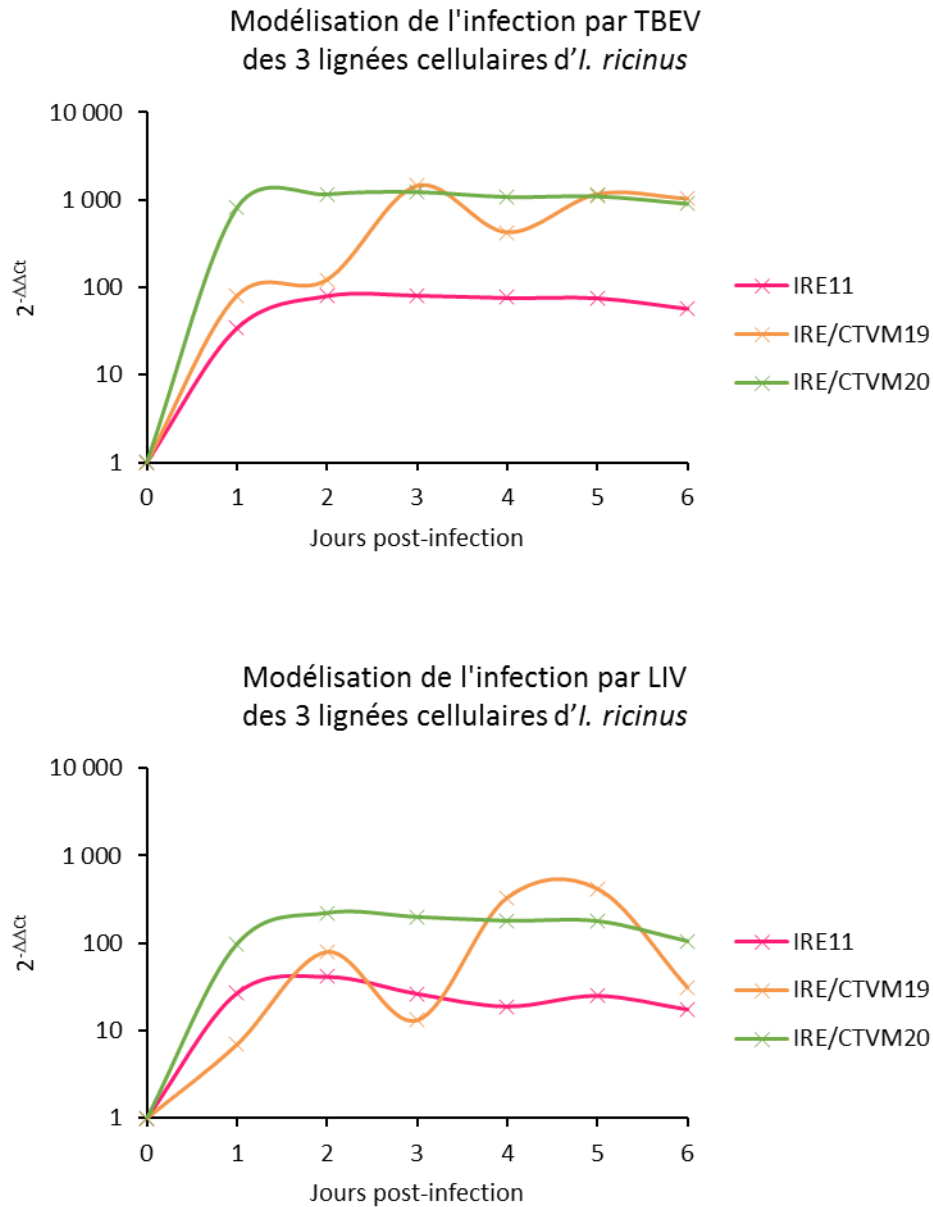


Figure 31. Graphique synthétisant la modélisation au cours du temps de l'infection à TBEV et à LIV des 3 lignées cellulaires d'*I. ricinus*

Les IRE11, les IRE/CTVM19 et les IRE/CTVM20 ont été infectées à une MOI de 1 par TBEV et LIV 24h après leur ensemencement en plaque 96 puits. La quantité relative d'ARN viral de TBEV et LIV a été mesurée quotidiennement sur 6 jours et est exprimée en $2^{-\Delta\Delta C_t}$. La courbe représente la moyenne des duplicatas obtenus.

3.2. Infections persistantes

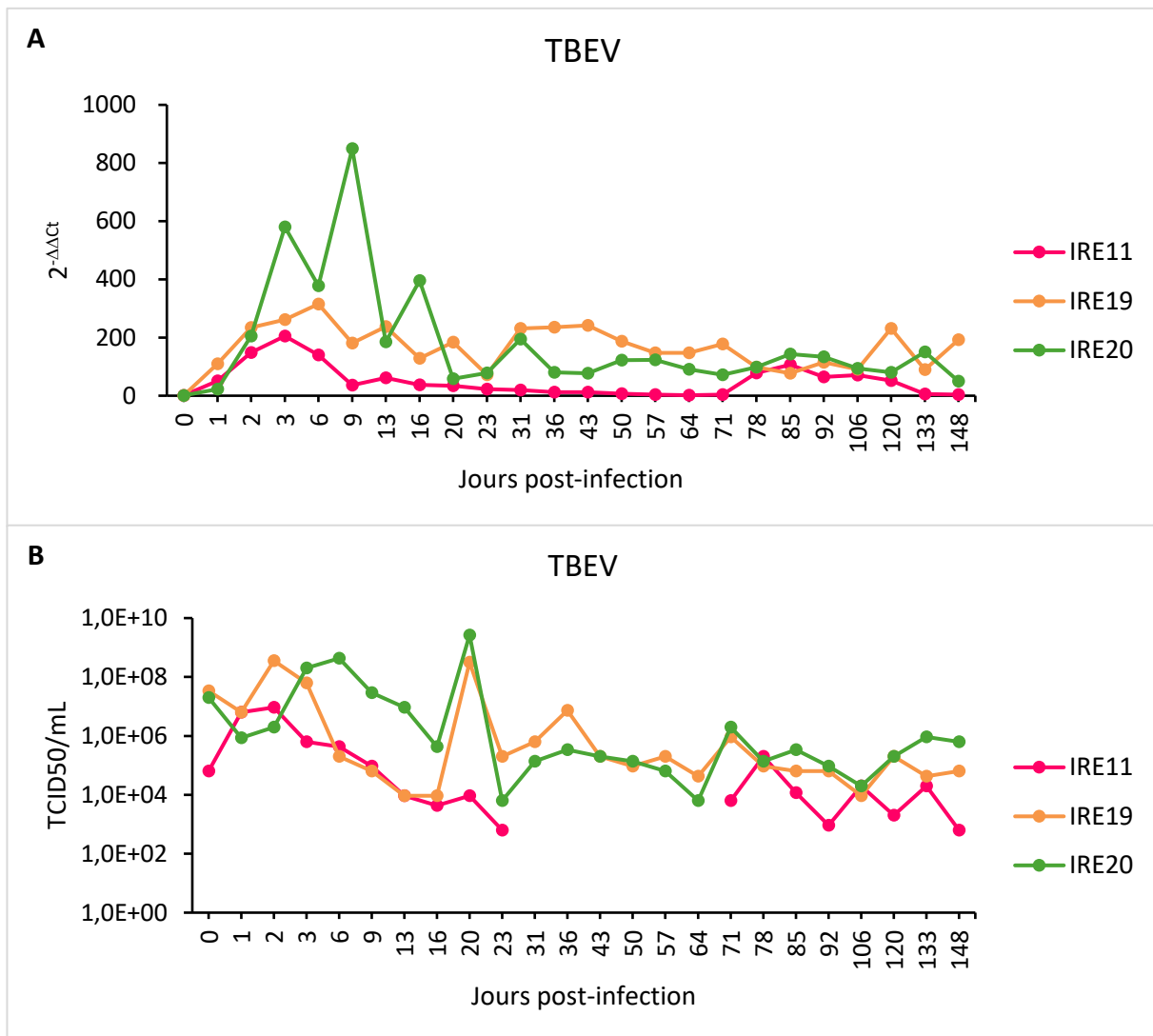


Figure 32. Cinétique d'infection persistante de TBEV en cellules de tique

(A) Quantité d'ARN viral exprimée en $2^{-\Delta\Delta C_t}$ au cours du temps. (B) Production de particules virales infectieuses exprimées en TCID50/mL au cours du temps. Les infections persistantes ont été conduites dans les IRE11 (rose), les IRE/CTVM19 (orange) et les IRE/CTVM20 (vert). Le J0 correspond au temps 1h après inoculation du virus.

La quantité d'ARN viral intracellulaire a été évaluée par RTqPCR. Cette quantité augmente dans les 3 à 10 premiers jours de l'infection virale en fonction de la lignée infectée (**Figure 32**). En effet, pour les IRE11 le pic de l'infection est obtenu à J3 post infection, pour les IRE/CTVM19 le pic apparaît à J6 tandis qu'il apparaît à J9 pour les IRE/CTVM20. Passé ces niveaux d'infection élevés, la quantité d'ARN viral diminue dans les trois lignées mais demeure détectable jusqu'au jour 148 post-infection. Ces résultats semblent par ailleurs indiquer une meilleure répllication virale au sein des IRE/CTVM20, que dans les IRE/CTVM19 ou dans les IRE11.

La production de particules virales infectieuses de TBEV a été mesurée au cours du temps par TCID50. Ces résultats préliminaires semblent indiquer une tendance à la baisse de la quantité de particules virales infectieuses. Aucune production de particules virales infectieuses n’a pu être observée entre J31 et J64 post infection dans les IRE11 ; cette production réapparaît néanmoins à J71. De façon surprenante, ces résultats ne coïncident pas avec les quantités d’ARN virales mesurées en intracellulaire.

3.3. Séquençage des petits ARN suite à l’infection par TBEV et LIV des 3 lignées cellulaires

d’*I. ricinus*

La voie de l’ARNi est décrite comme étant une voie antivirale majeure chez les arthropodes mais qui, à notre connaissance, a uniquement été rapportée chez la tique *I. scapularis* [325]. La caractérisation de cette voie chez *I. ricinus* a débuté en vérifiant qu’il y avait effectivement génération de siARNs viraux (viARNs) lorsque les cellules étaient infectées par TBEV et LIV. Cette vérification a été réalisée par le séquençage des petits ARNs. Aussi, pour s’assurer d’une production maximale de petits ARNs viraux, le séquençage a été effectué au pic de l’infection dans chacune des 3 lignées cellulaires c’est-à-dire à 2 jours post-infection pour les IRE11 et les IRE/CTVM20 infectées par LIV, à 3 jours post-infection pour les 3 lignées infectées par TBEV et à 4 jours post-infection pour les IRE/CTVM19 infectées par LIV. Les étapes d’extraction d’ARN, de séquençage et la génération des données ont été effectuées par Hervé Blanc et Lionel Frangeul de l’équipe Virus et Interférence ARN, dirigé par Carla Saleh à l’Institut Pasteur. En préambule de la présentation des résultats du séquençage des petits ARNs, nous définirons les « reads » comme la lecture des séquences d’ARN de 18 à 40 nucléotides, la fréquence positive comme l’alignement de ces reads sur le brin positif de l’ARN viral, et la fréquence négative comme l’alignement de ces reads sur le brin négatif de l’ARN viral.

Le séquençage des petits ARNs des 3 lignées cellulaires d’*I. ricinus* en conditions infectées et non infectée a révélé la génération de millions de petits ARNs de tailles comprises entre 18 et 40 nucléotides (**Tableau 4, Figures 33A, 34A, 35A, 36A, 37A, 38A, 39A, 40A et 41A**). Il est à noter que ces quantités de petits ARNs ne sont pas normalisées par une quantité d’ARN totale ou un gène de ménage, aussi les 132 millions de petits ARNs générés par les IRE/CTVM20 infectés par TBEV peuvent être dus à l’analyse d’une plus grande quantité de cellules.

Les distributions de tailles des petits ARNs (**Figures 33A, 34A, 35A, 36A, 37A, 38A, 39A, 40A et 41A**) révèlent également l’existence de 2 populations de petits ARNs, la première dont la taille majoritaire est de 22 nucléotides, évocatrice de mi- et si-ARNs, et la seconde dont la taille majoritaire est de

28 nucléotides chez les IRE11 et 27 nucléotides chez les IRE/CTVM19 et les IRE/CTVM20, évocatrice de piARNs.

Le tableau Y indique un pourcentage variable selon la lignée cellulaire considérée des viARNs qui s'alignent sur les génomes de TBEV et LIV.

Ces viARNs représentent 0,3-0,4% des ARNs produits par les IRE11, 4% des ARNs générés par les IRE/CTVM19 et 2,1-18% des petits ARNs exprimés par les IRE/CTVM20. Cette valeur de 18%, se distinguant des autres pourcentages concernant également les IRE/CTVM20 infectées par TBEV et pour lesquelles la quantité totale de petits ARNs générés se distinguaient déjà des quantités de petits ARNs produits dans les autres conditions.

Parmi ces viARNs produits par toutes les lignées cellulaires dans les 3 conditions non infectées et infectées par TBEV ou LIV, les viARNs de 22 nucléotides apparaissent distinctement comme étant majoritaires (**Tableau 4, Figures 33B, 34B, 35B, 36B, 37B, 38B, 39B, 40B et 41B**). En revanche, les populations de petits ARNs de 28 nucléotides chez les IRE11 et de 27 nucléotides chez les IRE/CTVM19 et IRE/CTVM20 observées dans les distributions de tailles des petits ARNs totaux n'apparaissent pas dans la distribution de tailles de viARNs, laissant suggérer que les piARNs n'auraient pas de rôle antiviral dans ces conditions.

Plus de 90% des viARNs de 22 nucléotides produits lorsque les cellules ont été infectées par TBEV s'alignent tout le long du génome de TBEV. De même, 90% des viARNs de 22 nucléotides produits lorsque les cellules ont été infectées par LIV s'alignent tout le long du génome de LIV. En vue de détecter de potentielles contaminations, les viARNs générés lors d'une infection par TBEV ont également été alignés sur le génome de LIV. Inversement, les viARNs générés par une infection avec LIV ont été alignés sur le génome de TBEV.

On observe également une proportion de viARNs s'alignant sur le génome de LIV lorsque les cellules n'ont pas été infectées (**Figures 33C, 36C, 39C**) ou ont été infectées par TBEV (**Figures 34C, 37C, 40C**) et inversement, des viARNs générés par une infection avec LIV ou en condition non infectée s'alignent sur le génome de TBEV (**Figures 33D, 35D, 36D, 38D, 39D, 41D**). Ces proportions sont considérées comme négligeable, excepté pour les IRE11 en condition non infectée (**Figure 33D**), les IRE/CTVM20 infectées par TBEV (**Figure 40 C**) et les IRE/CTVM19 infectées par LIV (**Figure 38D**).

Chaque production virale a alors été testée pour une éventuelle contamination, les tests se sont révélés négatifs. Par ailleurs, nous avons la chance de disposer dans notre laboratoire P3 d'un nombre suffisant de postes de sécurité microbiologique pour attirer un PSM à chaque virus, ou à la culture de cellules en conditions non infectieuses. Le schéma de contamination (IRE11-NI ; IRE/CTVM19-LIV ; IRE/CTVM20-TBEV) impliquant une lignée différente à chaque fois avec une condition d'infection différente à chaque fois ne laisse pas penser que les génomes de TBEV et LIV pourrait être intégré aux génomes de lignées cellulaires. Enfin, il apparaît peu probable que la proximité génétique des 2 virus

qui pourrait être à l'origine d'un tel partage de séquences communes de viARNs explique une telle correspondance. Aussi, la seule explication que nous pouvons envisager à ce stade est un problème de contamination expérimental au moment de l'extraction d'ARN.

Les viARNs s'alignent tout le long des génomes du virus correspondant, sans que l'on puisse réellement définir de hot spot. Ceci suggère que la totalité du génome des 2 virus serviraient de matrice à la machinerie des siARNs pour produire des petits ARNs. Toutefois, pour certaines conditions (IRE11-TBEV **Figure 34D** ; IRE/CTVM19-TBEV **Figure 37D**), il semble se dégager des zones préférentielles, telles que les régions constituées des 2000 premiers nucléotides et la région 3'UTR du génome viral.

Enfin, le brin de polarité positive du génome des virus est à l'origine d'une proportion plus importante de viARNs que le brin antisens.

Tableau 4. Récapitulatif des données chiffrées issues du séquençage des petits ARNs des 3 lignées cellulaires d'*I. ricinus* en conditions non infectées ou infectées par TBEV et LIV

	nb total de reads	nb total de reads reads antiviraux	% de reads antiviraux sur nb total de reads	nb de reads antiviraux de 22 nt	% reads antiviraux de 22 nt sur nb total de reads antiviraux	nb de reads anti-LIV de 22 nt	% reads anti-LIV sur total reads antiviraux de 22 nt	nb de reads anti-TBEV de 22 nt	% reads anti-TBEV sur total reads antiviraux de 22 nt
IRE11 - NI	27 188 074	38 190	0,1	31 578		5 128		26 450	
IRE11 - TBEV	23 179 346	88 259	0,4	71 379	80,9	4 536	6,4	66 843	93,6
IRE11 - LIV	38 618 067	118 973	0,3	101 908	85,7	95 542	93,8	6 366	6,2
IRE/CTVM19 - NI	29 537 875	1 475	0,0	1 129		826		303	
IRE/CTVM19 - TBEV	30 446 065	1 230 187	4,0	1 050 908	85,4	75 557	7,2	975 351	92,8
IRE/CTVM19 - LIV	35 047 097	1 417 968	4,0	1 194 906	84,3	1 074 374	89,9	120 532	10,1
IRE/CTVM20 - NI	46 590 188	1 595	0,0	1 182		225		957	
IRE/CTVM20 - TBEV	132 189 468	23 779 034	18,0	19 646 158	82,6	1 489 295	7,6	18 156 863	92,4
IRE/CTVM20 - LIV	36 648 034	765 668	2,1	646 059	84,4	598 246	92,6	47 813	7,4

Les « reads » correspondent à la lecture des séquences d'ARN de 18 à 40 nucléotides.

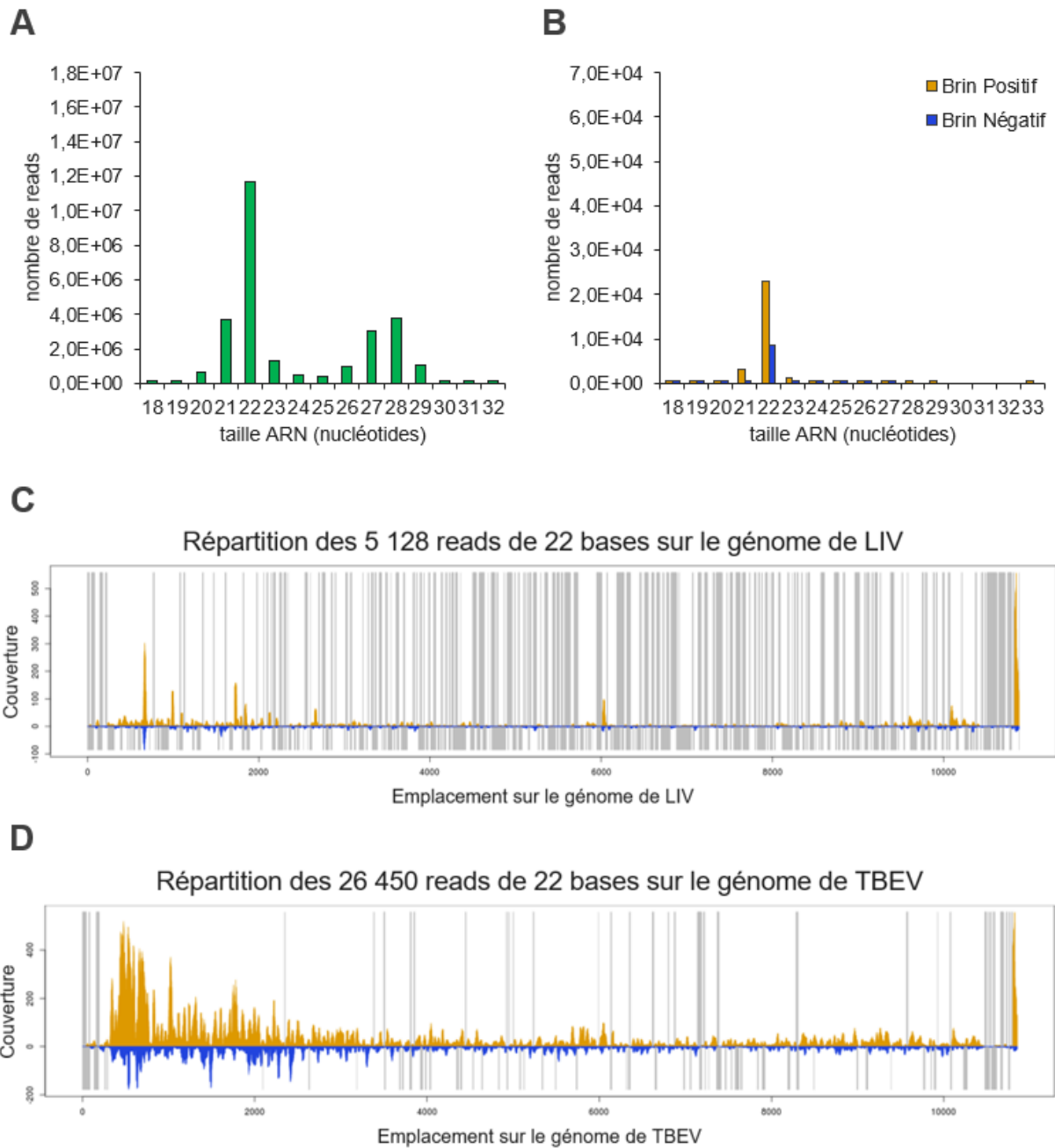


Figure 33. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE11 non infectées

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir de cellules IRE11 en condition non infectée. Répartition sur le génome de LIV (**C**) et de TBEV (**D**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

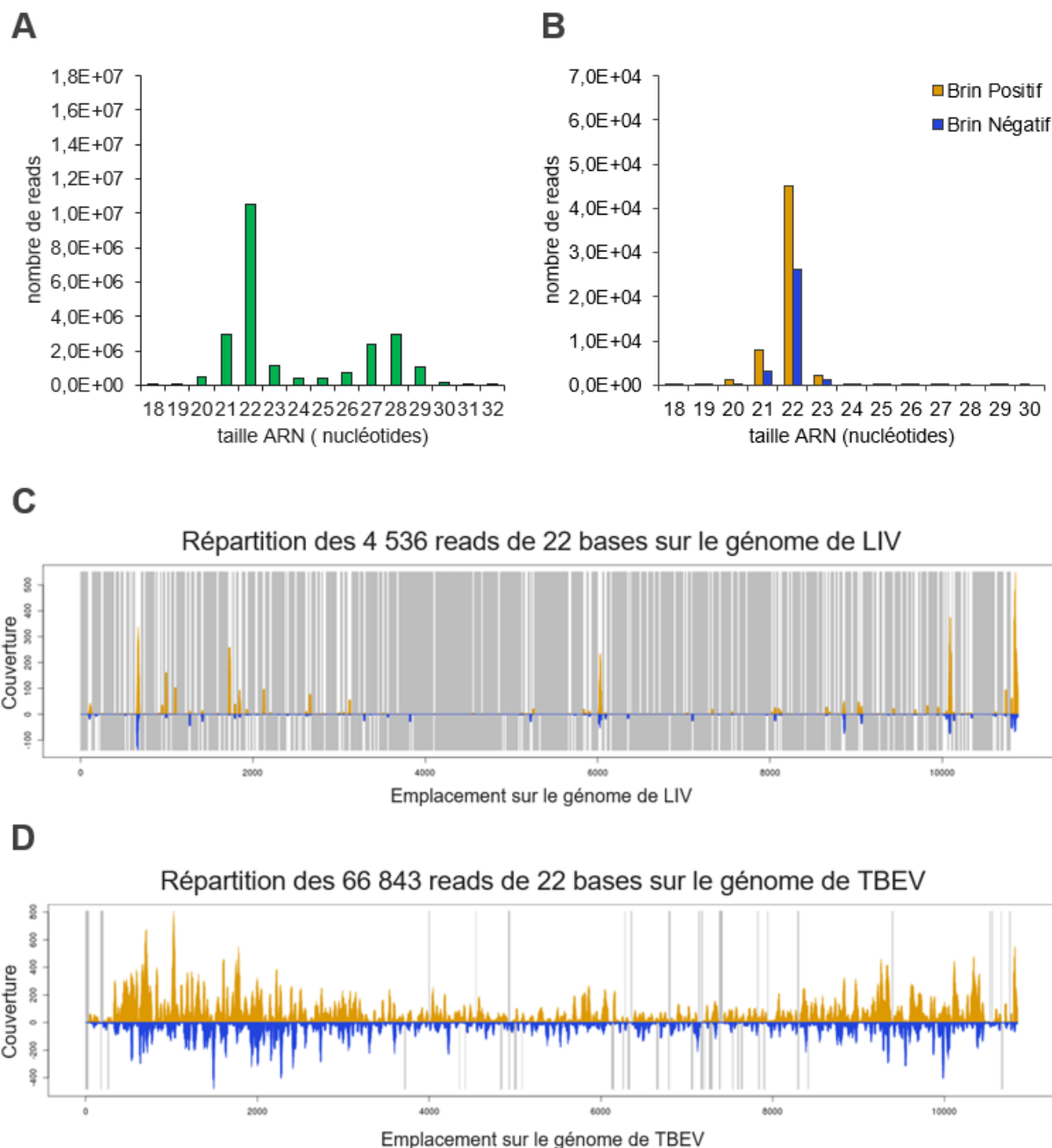


Figure 34. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE11 infectées par TBEV

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (A) et de la totalité des viARNs (B) obtenus à partir de cellules IRE11 infectées par TBEV. Répartition sur le génome de LIV (C) et de TBEV (D) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

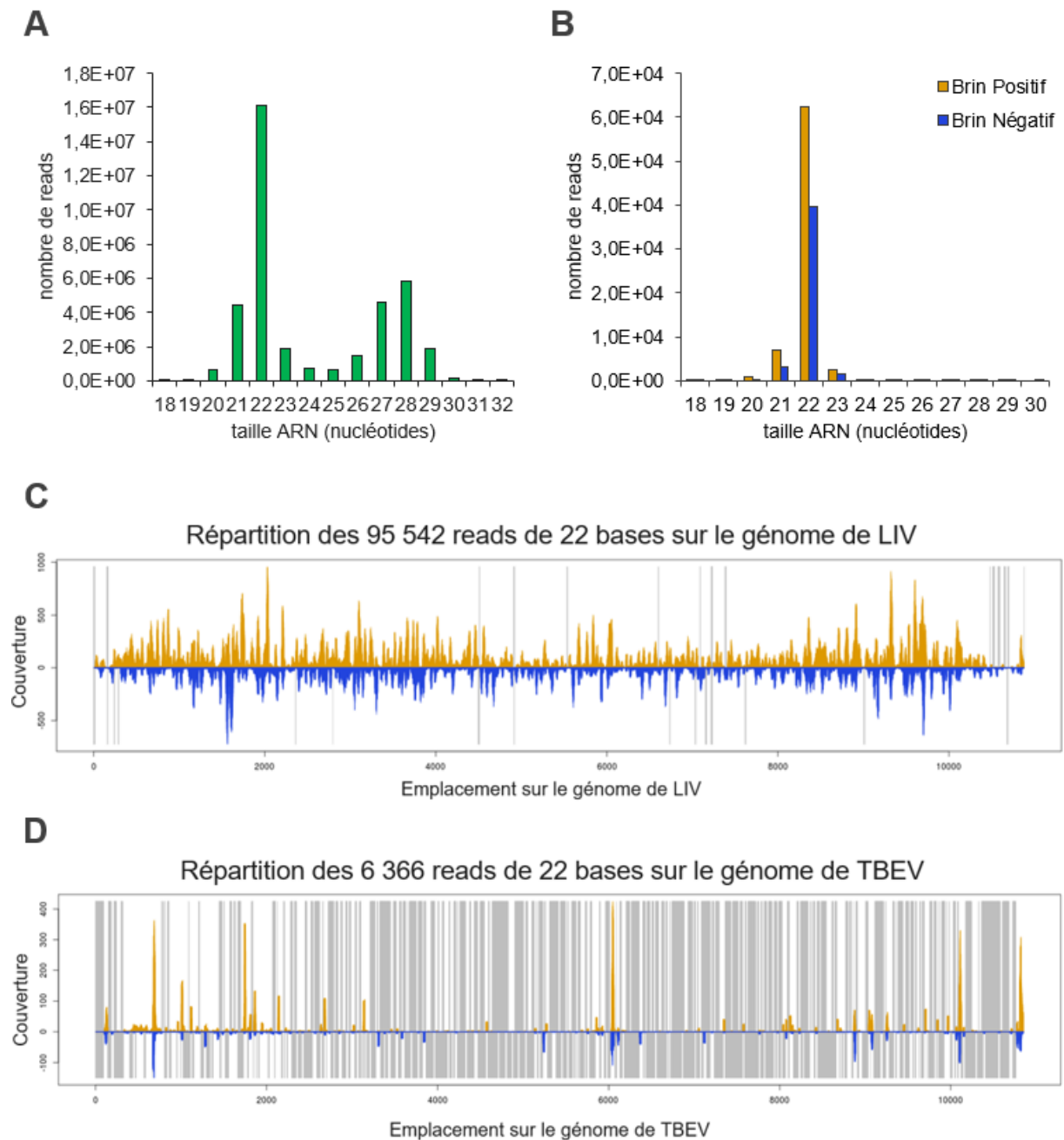


Figure 35. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE11 infectées par LIV

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir de cellules IRE11 infectées par LIV. Répartition sur le génome de LIV (**C**) et de TBEV (**D**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grises indiquent une absence de couverture.

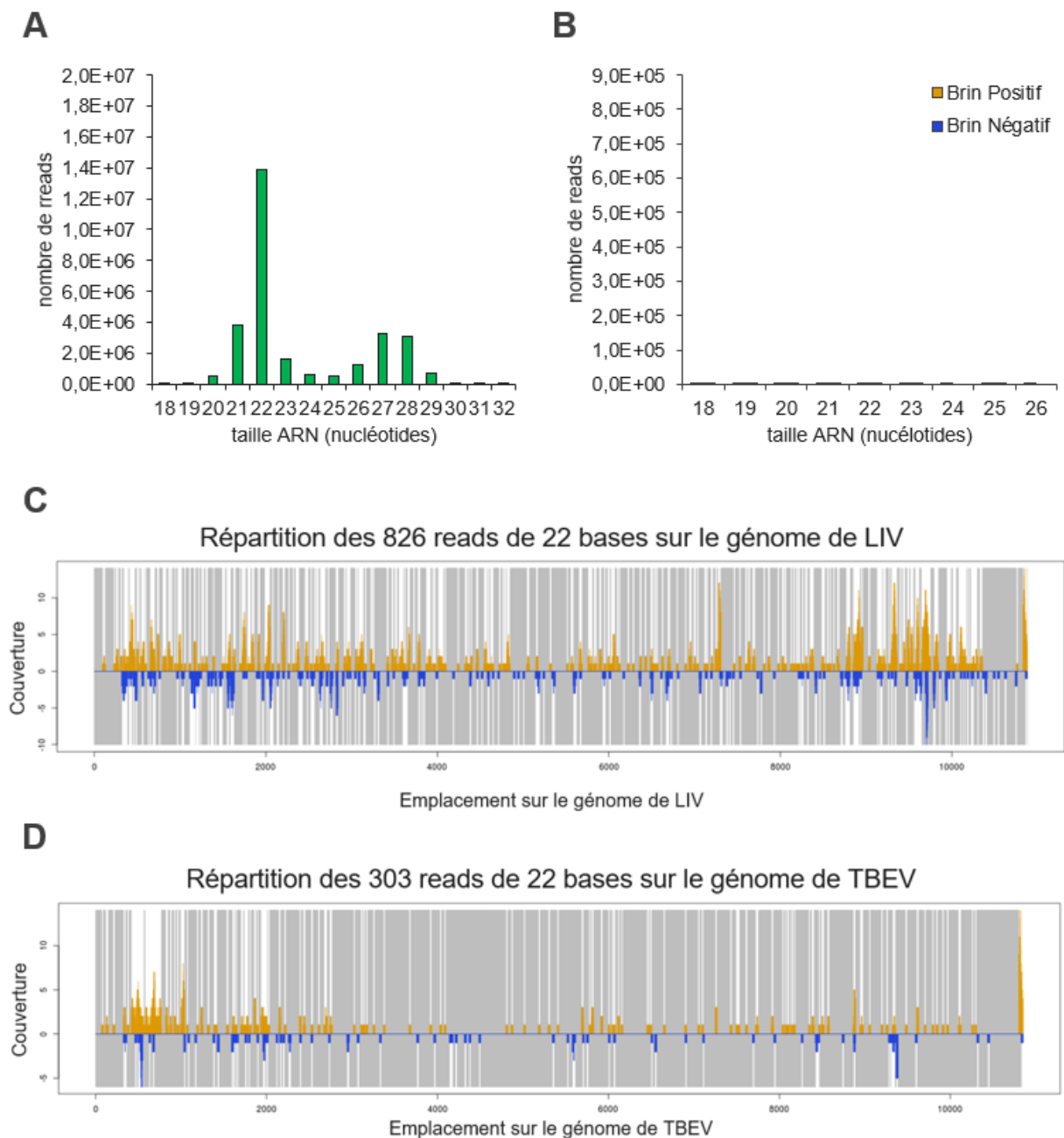


Figure 36. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM19 non infectées

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir de cellules IRE/CTVM19 en condition non infectée. Répartition sur le génome de LIV (**C**) et de TBEV (**D**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

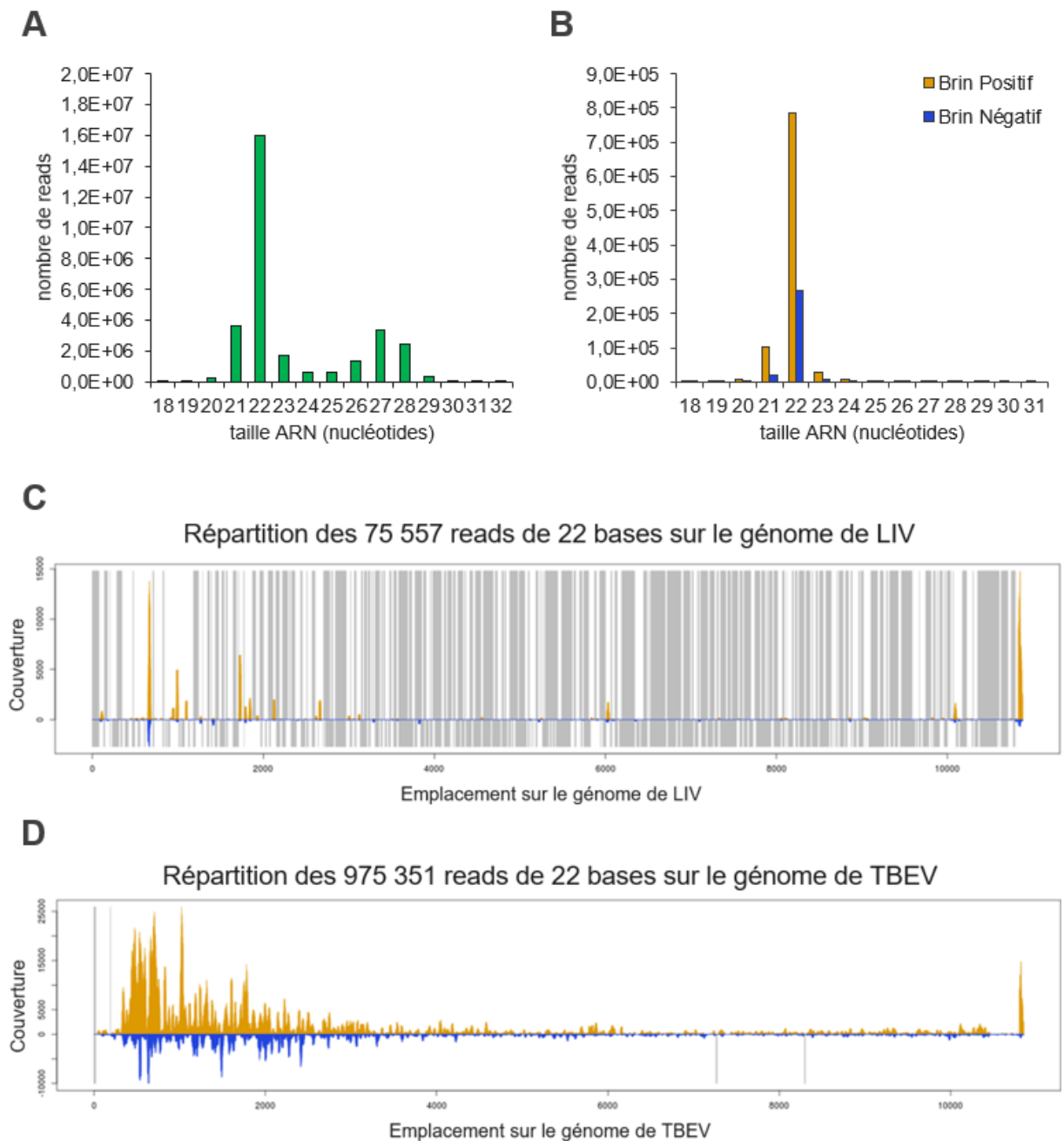


Figure 37. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM19 infectées par TBEV

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir de cellules IRE/CTVM19 infectées par TBEV. Répartition sur le génome de LIV (**C**) et de TBEV (**D**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

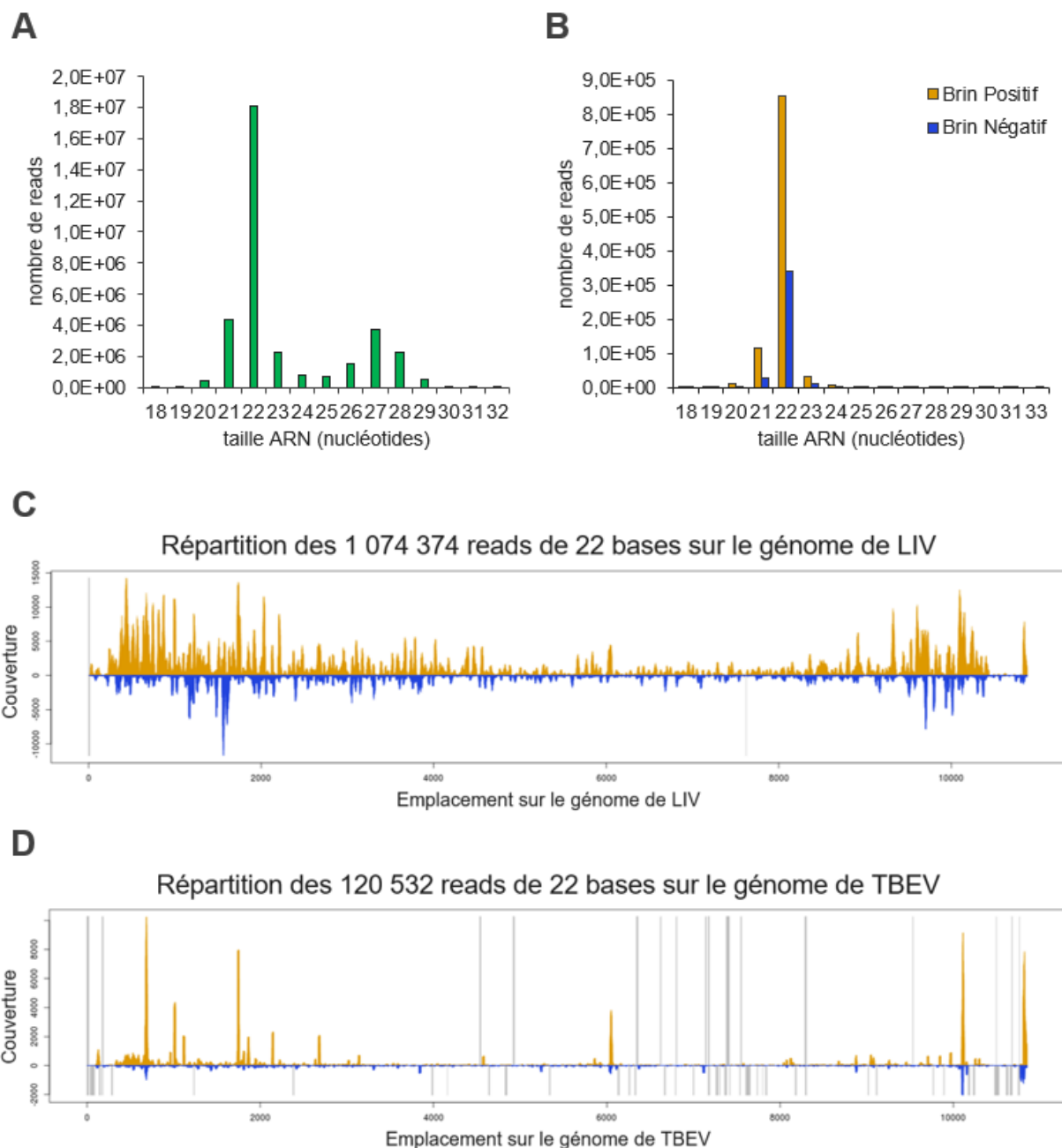


Figure 38. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM19 infectées par LIV

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir de cellules IRE/CTVM19 infectées par LIV. Répartition sur le génome de LIV (**C**) et de TBEV (**D**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

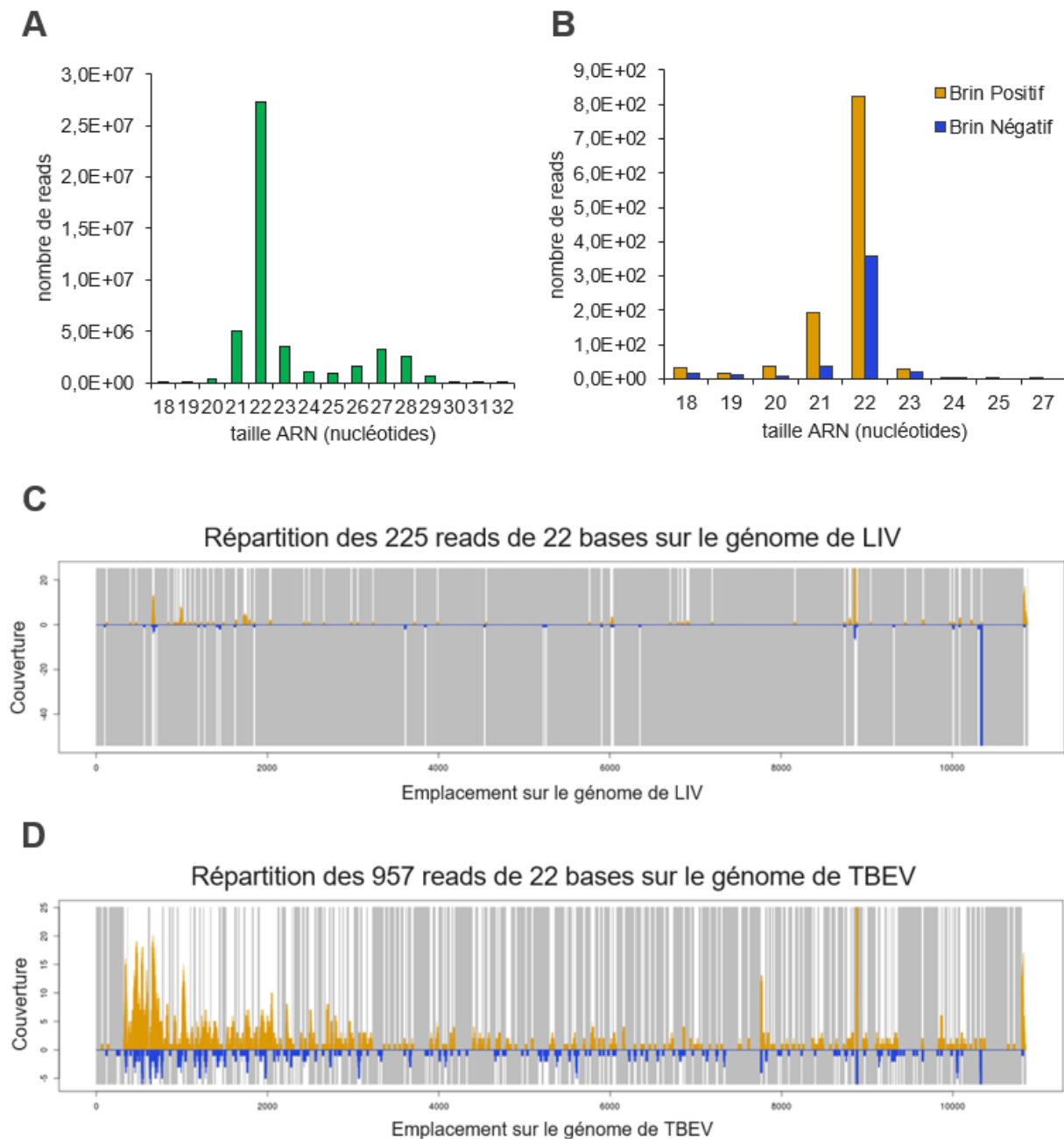


Figure 39. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM20 non infectées

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir de cellules IRE/CTVM20 en condition non infectée. Répartition sur le génome de LIV (**C**) et de TBEV (**D**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

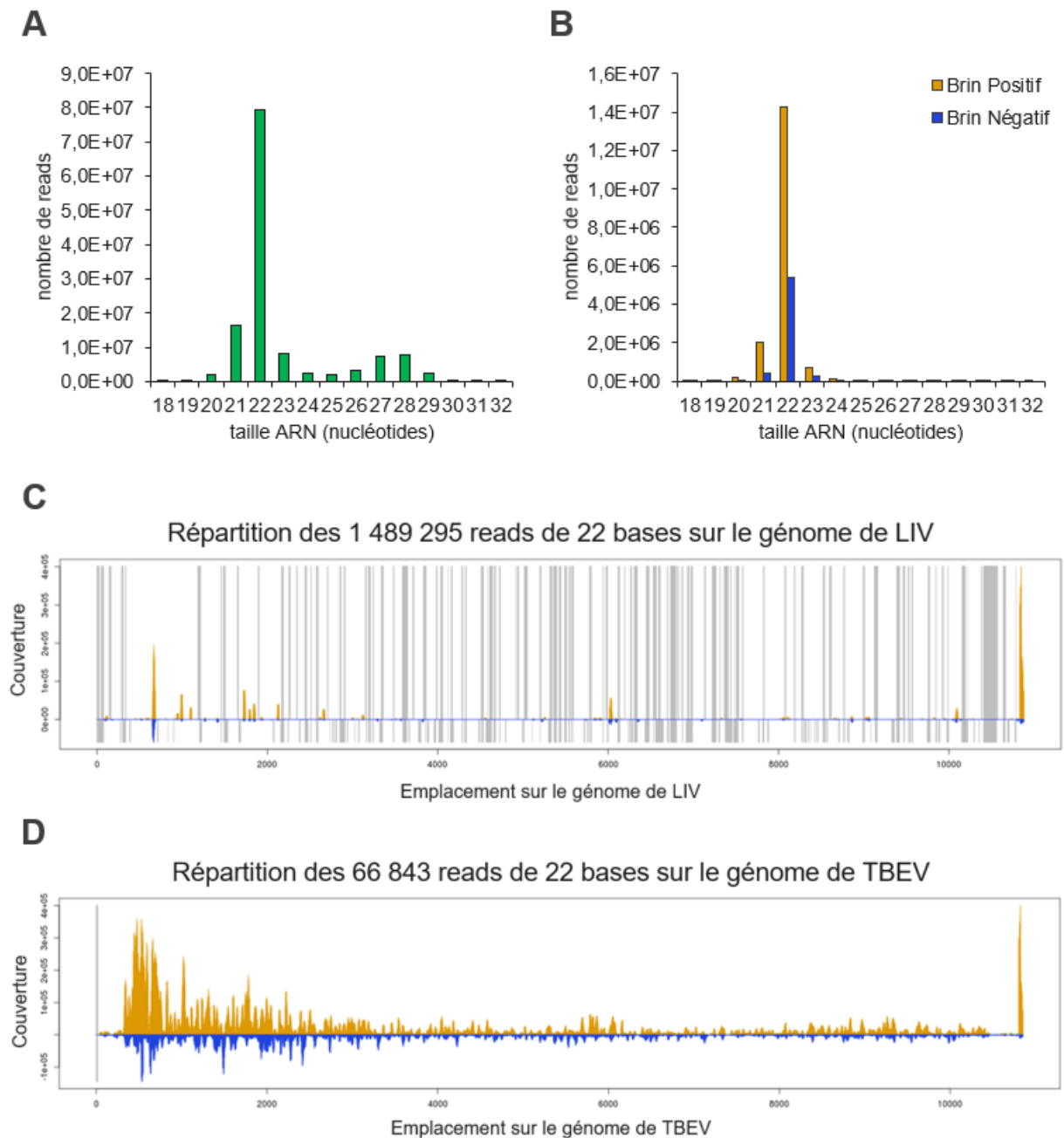


Figure 40. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM20 infectées par TBEV

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir de cellules IRE/CTVM20 infectées par TBEV. Répartition sur le génome de LIV (**C**) et de TBEV (**D**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

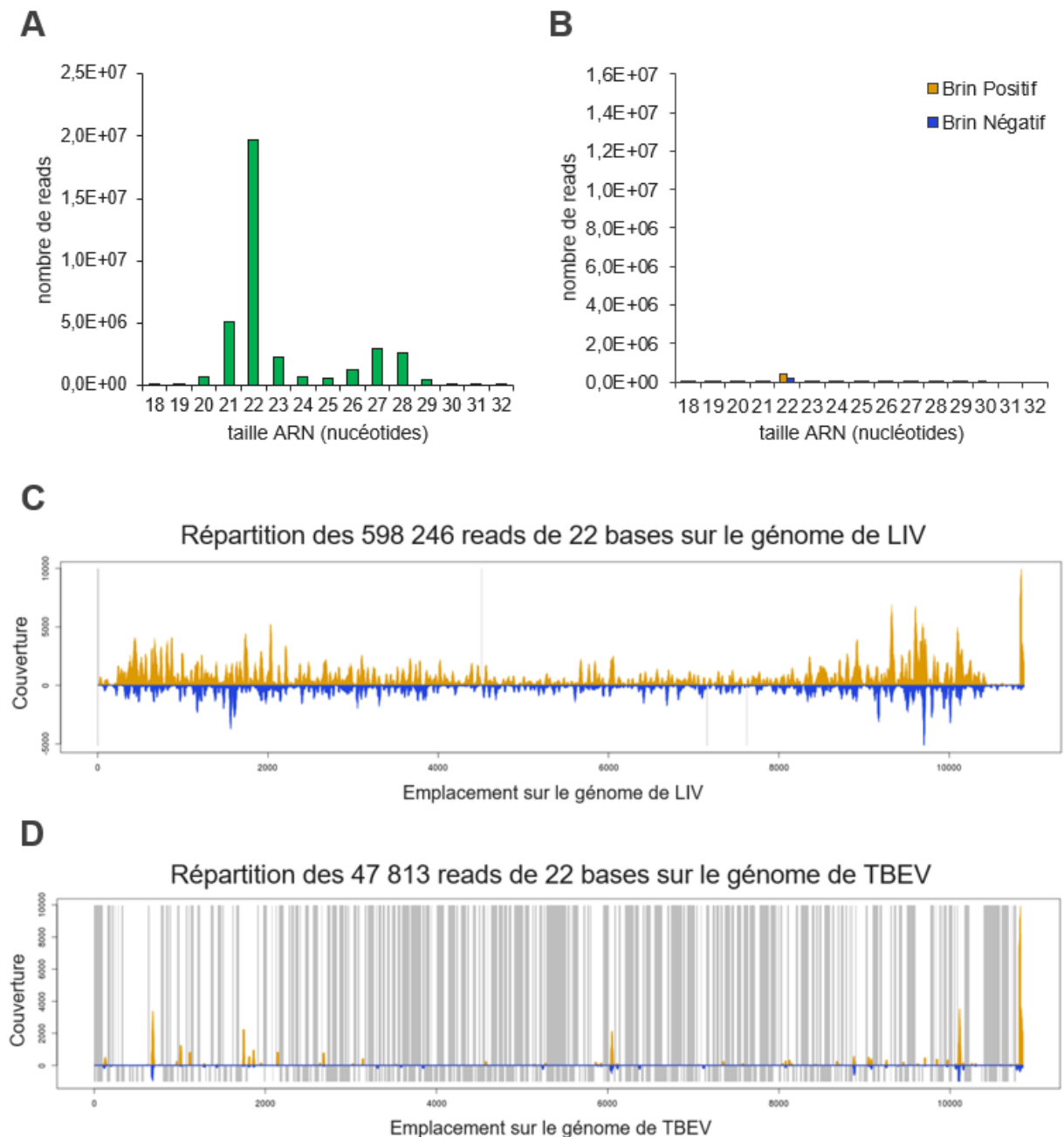


Figure 41. Résultats du séquençage des petits ARN issus des cellules IRE/CTVM20 infectées par LIV

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir de cellules IRE/CTVM20 infectées par LIV. Répartition sur le génome de LIV (**C**) et de TBEV (**D**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

En conclusion, suite à une infection par TBEV et LIV les lignées cellulaires mettent en place une réponse ARNi en produisant de viARNs générés à partir du l'ARN viral. Ces viARNs sont à plus de 85% de 22 nucléotides et majoritairement issu du génome viral sens probablement en lien avec la réplication du génome asymétrique, bien qu'une proportion ($\sim \frac{1}{4}$) semble issue de l'antigénome. La quasi-totalité du génome de TBEV et LIV est source de formation de viARNs avec quelques régions qui semblent toutefois privilégiées : Les 2 000 premiers nucléotides du génome correspondant aux séquences codant les protéines structurales et la région 3' codant une partie de la protéine NS5 ainsi que la région 3'UTR. L'intensité de cette réponse ARN varie en fonction de la lignée cellulaire. Ainsi, elle apparaît plus importante dans les IRE/CTVM20 puis dans les IRE/CTVM19 et enfin dans les IRE11. Ces résultats obtenus *in vitro* indiquent qu'une réponse ARNi est bien présente à l'échelle cellulaire de la tique, mais quid de l'organisme entier ?

3.4. Séquençage des petits ARN suite à l'infection par TBEV de tique *I. ricinus*

Afin d'évaluer si la réponse ARNi est bien présente à l'échelle de la tique en tant qu'organisme et de comparer cette réponse à celle obtenue en cellules de tique, le séquençage des petits ARNs a été effectué à partir de tiques vivantes. En ce sens, 10 tiques *I. ricinus* ont été infectées par micro-injection avec TBEV (T1 à T5) ou du milieu de culture (S1 à S5). Cette infection a été réalisée avec l'aide de Ladislav Simo et Sara Moutailler de l'UMR BIPAR. Au cours de l'expérimentation, 1 tique infectée et 1 tique contrôle sont mortes et n'ont donc pas été analysées dans la suite de l'étude. Le séquençage des petits ARN a requis 15 à 20 µg d'ARN total, aussi les ARNs des tiques infectées T1 et T2 ont été regroupés, ainsi que ceux des tiques T3 et T4, et des tiques témoin S1 et S4.

Le séquençage des petits ARNs du groupe des 2 tiques S1 et S4 non infectées a révélé la production de 27 628 907 de petits ARNs d'une taille comprise entre 18 et 40 nucléotides (**Figure 42A**). La distribution de tailles de ces petits ARNs indique la présence de 2 populations dont les tailles majoritaires sont de 23 et 27 nucléotides, évoquant tout comme pour les cellules de tiques, l'existence de mi et siARNs d'une part et de piARNs d'autre part. L'alignement de ces petits ARNs sur le génome de TBEV (**Figure 42C**) a révélé un nombre négligeable de reads (**Figure 42B**), indiquant l'absence de contamination ou d'intégration de séquence de TBEV dans le génome de la tique *I. ricinus*.

Pour les groupes de tiques infectées T1/T2 et T3/T4, le nombre total de petits ARNs s'élève respectivement à 57 327 161 et 16 796 619 (**Figure 43A et 44A**). La distribution de tailles de ces petits ARNs s'étend de 18 à 40 nucléotides avec les 2 populations visualisées dans les situations précédentes quelque peu différentes. Il est observé une population avec un pic à 23 pour le pool T1/T2 (**Figure 43B**)

alors que l'on retrouve les 2 populations de petits ARNs à cette fois 24 nucléotides et 27 nucléotides pour le pool T3/T4 (**Figure 44B**).

Parmi ces millions de petits ARNs, les viARNs représentent 11 015 (soit 0,019% de la totalité des petits ARNs produits) et 1 166 (soit 0,007%) pour les groupes de tiques T1/T2 et T3/T4 respectivement. On remarque près d'un facteur 10 entre les quantités de viARNs des 2 groupes. Par ailleurs, bien que la majorité de ces reads obtenues coïncident avec des ARN d'une taille de 22 nucléotides (**Figure 43B et 44B**), la proportion des petits ARN de cette taille est moindre (60% pour T1/T2 et 40% pour T3/T4) comparée à celle obtenue en cellule de tique (>80%).

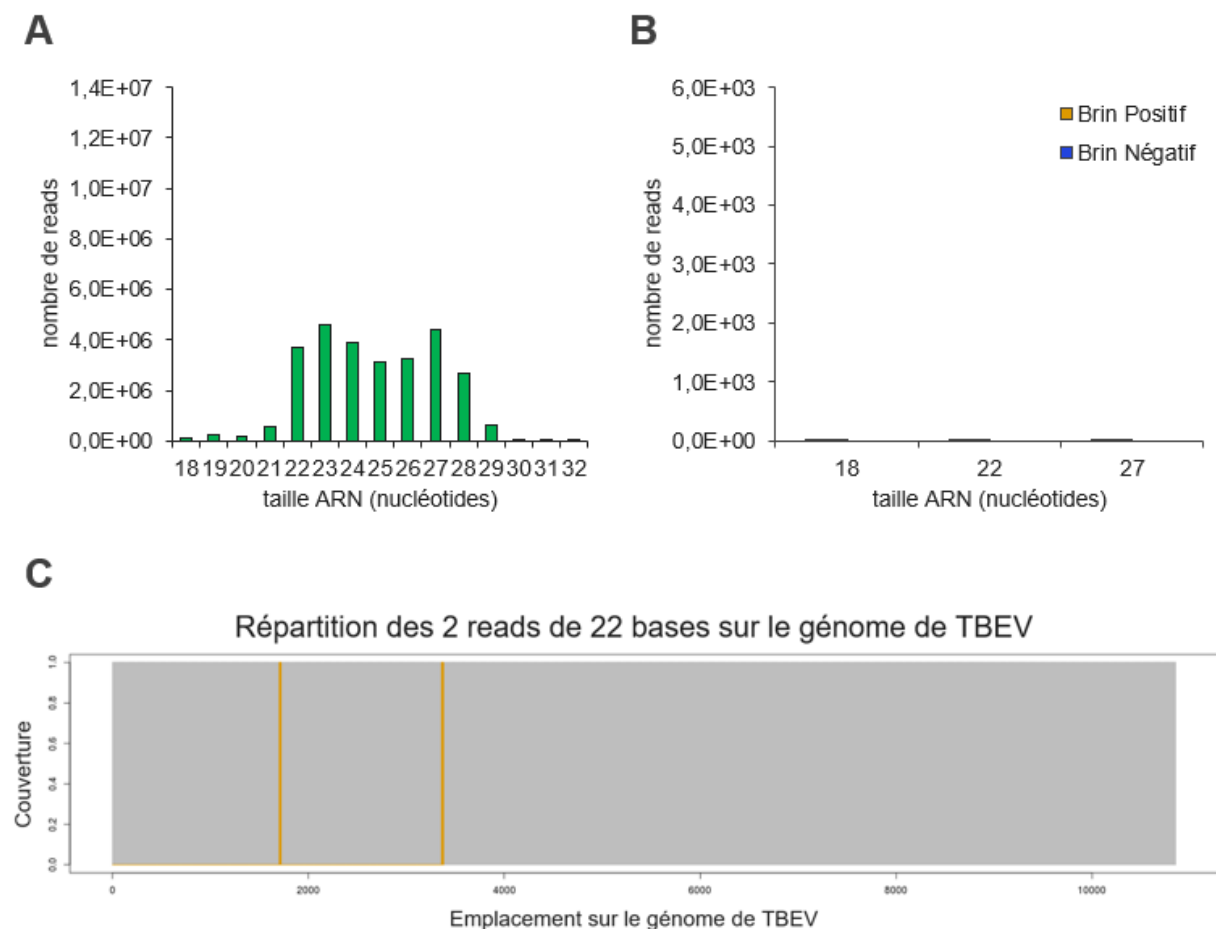


Figure 42. Résultats du séquençage des petits ARN issus du groupe de tiques *I. ricinus* non infectées

Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir du pool de tiques S1 et S4 non infectées. Répartition sur le génome de TBEV (**C**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

Ainsi, plus de 93% des viARNs produits se situent dans l'intervalle de 21 à 26 nucléotides pour les 2 groupes de tiques infectées. La totalité de ces reads de 22 nucléotides couvrent la totalité du génome de TBEV et sont réparties sur la quasi-totalité du génome (**Figure 43C et 44C**) bien que le faible nombre de reads de 22 nucléotides (470) obtenu pour le pool T3/T4 laisse percevoir des zones de non-couverture (**Figure 44C**).

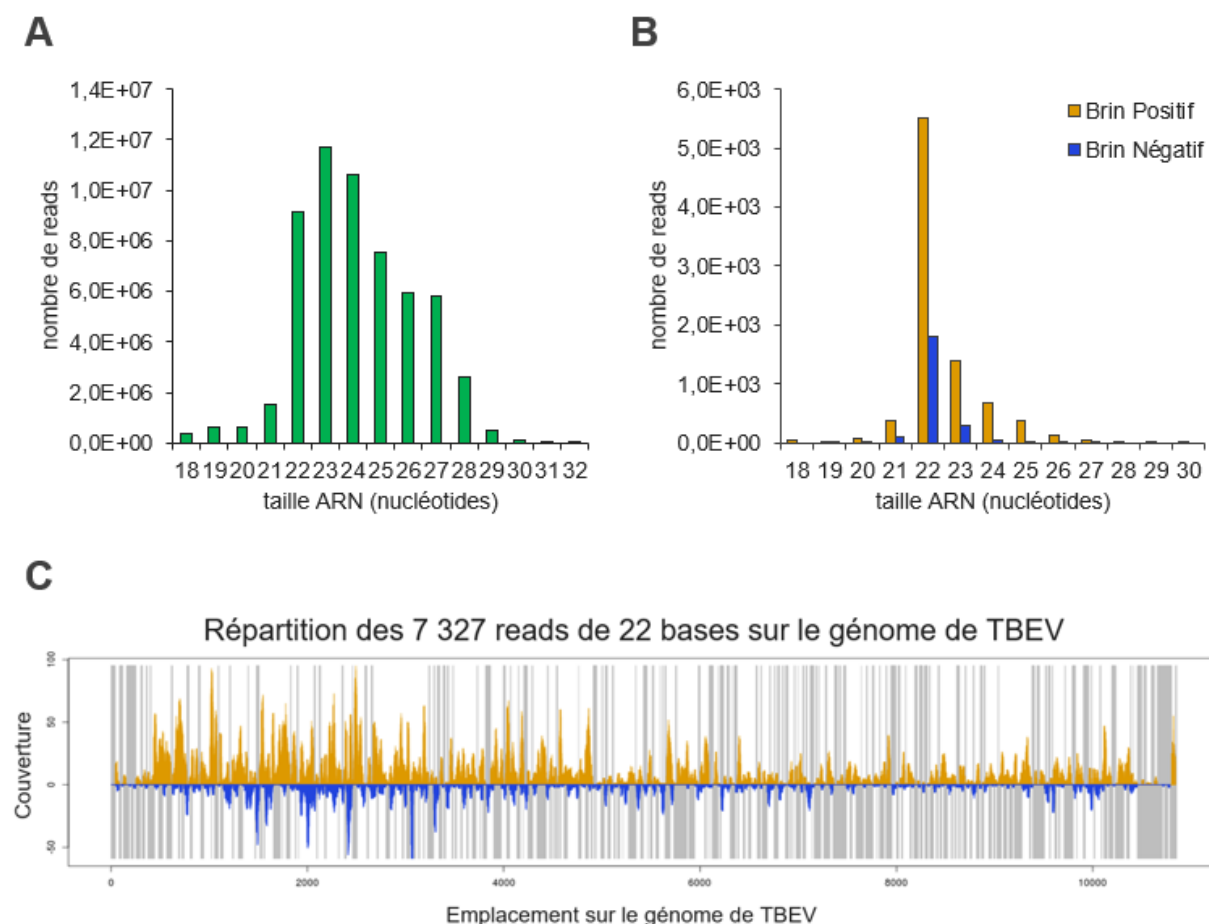


Figure 43. Résultats du séquençage des petits ARN issus du groupe de tiques *I. ricinus* T1/T2 infectées par TBEV
 Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir du pool de tiques T1 et T2 infectées par TBEV. Répartition sur le génome de TBEV (**C**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

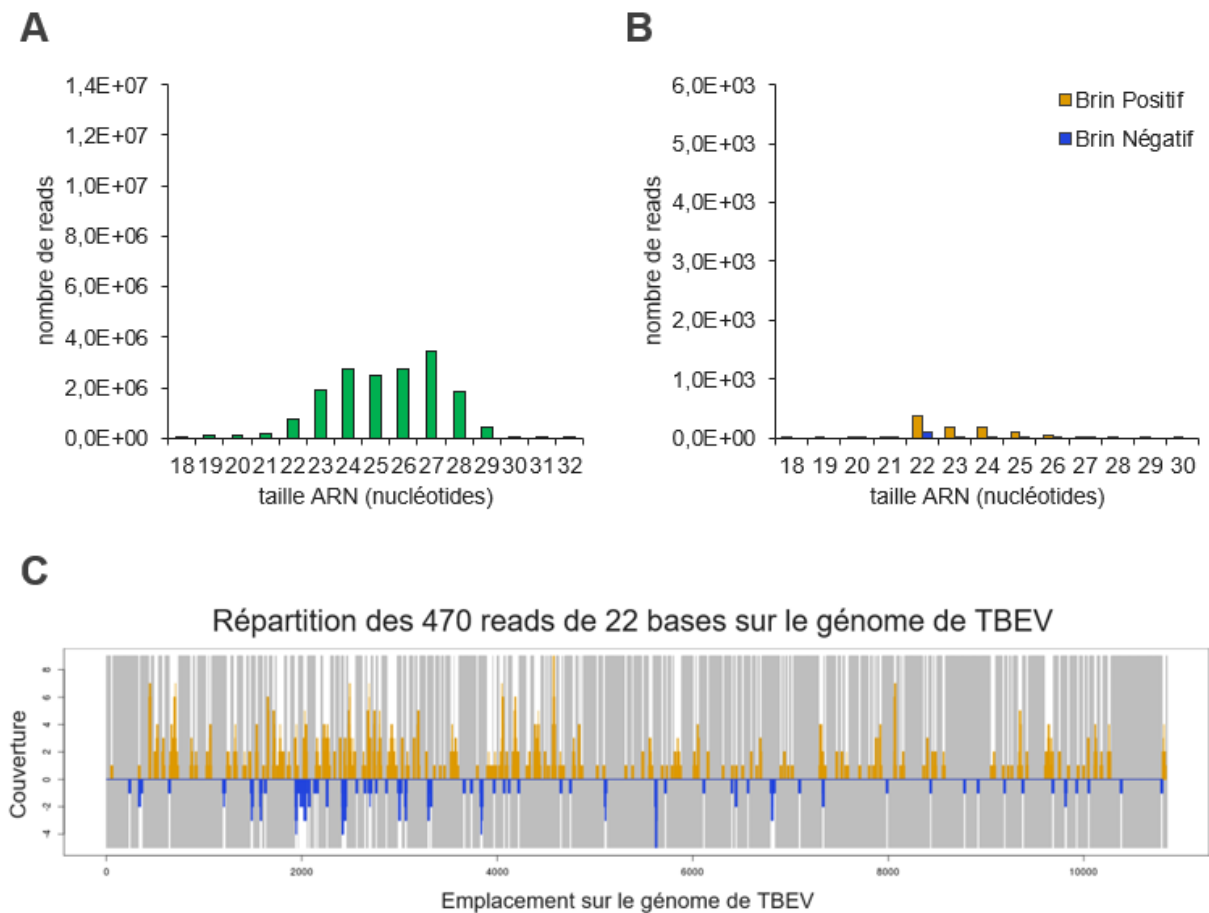


Figure 44. Résultats du séquençage des petits ARN issus du groupe de tiques *I. ricinus* T3/T4 infectées par TBEV
 Histogrammes représentant la distribution de tailles de la totalité des petits ARNs (**A**) et de la totalité des viARNs (**B**) obtenus à partir du pool de tiques T3 et T4 infectées par TBEV. Répartition sur le génome de TBEV (**C**) des reads de 22 nucléotides obtenus. Les reads de fréquence positive sont indiquées en jaune et les reads avec une fréquence négative sont indiquées en bleu. Les zones grisées indiquent une absence de couverture.

Parallèlement au séquençage des petits ARNs chez les tiques vivantes, la quantité de génome viral et le nombre de particules virales infectieuses ont été évalués respectivement par RT-qPCR et par TCID50 chez ces mêmes tiques infectées.

Ainsi, le nombre de copies d'ARN viral/ μL a été déterminé pour les 4 tiques infectées (**Figure 45A**) et varie entre $5,6 \cdot 10^3$ copies/ μL (tique T3) au plus bas et $1,4 \cdot 10^4$ copies/ μL au plus haut (tique T2). Les tiques ont été infectées avec 250nL de TBEV (inoculum) dont le nombre de copies d'ARN/ μL s'élève à $1,9 \cdot 10^3$. Ainsi, 3 fois plus de copies d'ARN viral ont été mesurées chez la tique T3, presque 4 fois plus chez la tique T1, et près de 7 fois plus chez les tiques T2 et T4. Cette augmentation du nombre de copies d'ARN viral/ μL traduit l'existence d'une répllication virale au sein de la tique.

La quantité de particules virales produites a été déterminée pour les 4 tiques infectées (**Figure 45B**). Ainsi, la charge virale s'est élevée à $2,9 \cdot 10^3$ TCID₅₀/mL pour la tique T1 et T3, à $6,3 \cdot 10^2$ TCID₅₀/mL pour la tique T2 et à $7,7 \cdot 10^3$ TCID₅₀/mL pour la tique T4.

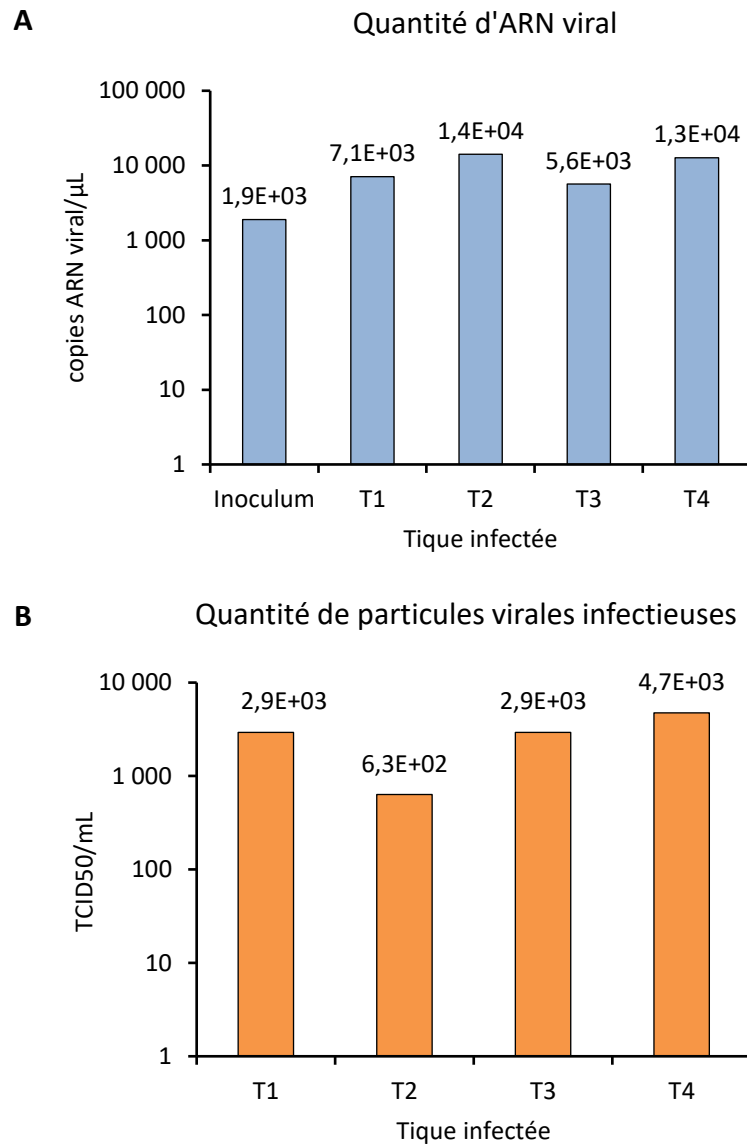


Figure 45. Quantité d'ARN viral et de particules infectieuses de TBEV dans les tiques infectées

(A) Histogramme représentant la quantité relative d'ARN viral de TBEV exprimée en nombre de copies/μL dans l'inoculum et dans les 4 tiques infectées. (B) Histogramme indiquant la quantité de particules virales infectieuses exprimé en TCID₅₀/mL présentes chez les 4 tiques infectées.

En résumé, suite à l'infection par TBEV, la tique produit des viARNs de 22 nucléotides comme ce qui a été observé *in vitro*.

3.5. Inactivation de l'expression d'acteurs de l'ARNi

DCR2 et AGO2 sont les acteurs clés de la réponse des siARNs. Les gènes d'*I. scapularis* codant ces protéines ont été identifiées précédemment par Schnettler et al. [325] : un gène pour DCR2 (DCR-89=ISCW000889) et 4 gènes codant des protéines de la famille AGO2 : Ago-68 (ISCW011768), Ago-30 (ISCW0021130) Ago-96 (ISCW022696), Ago-16 (ISCW015916).

Les séquences de DCR2 (GANP01011232.1) et de 3 des 4 différentes protéines AGO2 (AGO16 = GBIH01002619.1 ; AGO30 = GBIH01002618.1 ; AGO96 = GANP01000655.1) ont été identifiées chez *I. ricinus* par recherche d'orthologue chez *I. scapularis*. Nous présentons ici les premiers résultats concernant AGO2 = AGO30 = GBIH01002618.1.

En vue d'évaluer le rôle de ces petits ARN viraux produits suite à l'infection et afin de mieux comprendre ce processus d'ARNi chez la tique, l'expression de 2 acteurs majeurs de la voie de synthèse des petits ARN viraux a été inactivée par transfection d'ARNdb. Ces 2 acteurs sont l'endoribonucléase Dicer2 (DCR2) et la protéine Argonaute2 (AGO2). Ainsi, 2 ARNdb ont été établis pour cibler DCR2 et 1 ARNdb pour cibler AGO2. Les cellules de tiques IRE/CTVM19 ont été transfectées avec des concentrations croissantes (15ng, 150ng et 1 500ng) d'ARNdb et l'inactivation de l'expression a été évaluée par RT-PCR à différents temps post-transfection (24h, 48h, 72h et 96h) et visualisée sur gel d'agarose par électrophorèse (**Figure 46A, 46B et 46C**). La β -actine d'*I. ricinus* a servi de contrôle interne et de contrôle positif pour la RT-PCR.

En utilisant le premier ARNdb ciblant DCR2, une diminution la quantité d'ARNm de DCR2 est observée à partir de 24h post-transfection avec 150ng d'ARNdb. Toutefois, cette diminution ne semble pas perdurer puisqu'une expression basale de transcrit de DCR2 est observée à 48h post-transfection. Néanmoins, absence de transcrit de DCR2 est observée dès 24h post-transfection avec 1 500ng d'ARNdb et persiste jusqu'à 96h post-transfection (**Figure 46A**).

En ayant recours au deuxième ARNdb ciblant l'ARNm de DCR2, une diminution de la quantité de transcrits DCR2 est observée à partir de 24h post-transfection en utilisant 1 500ng d'ARNdb, mais l'inactivation totale de l'expression apparaît 72h post-transfection avec 1 500ng d'ARNdb (**Figure 46B**).

En transfectant l'ARNdb ciblant l'ARNm d'AGO2, une diminution de la quantité de transcrits d'AGO2 est observée avec 150ng d'ARNdb dès 24h post-transfection et à partir de 72h post-transfection, les transcrits de DCR2 ne sont plus détectés avec cette même quantité d'ARNdb. Toutefois, cette diminution de transcrits d'AGO2 est obtenue à 24h post-transfection avec 1 500ng d'ARNdb et cette inactivation persiste jusqu'à 96h post transfection (**Figure 46C**).

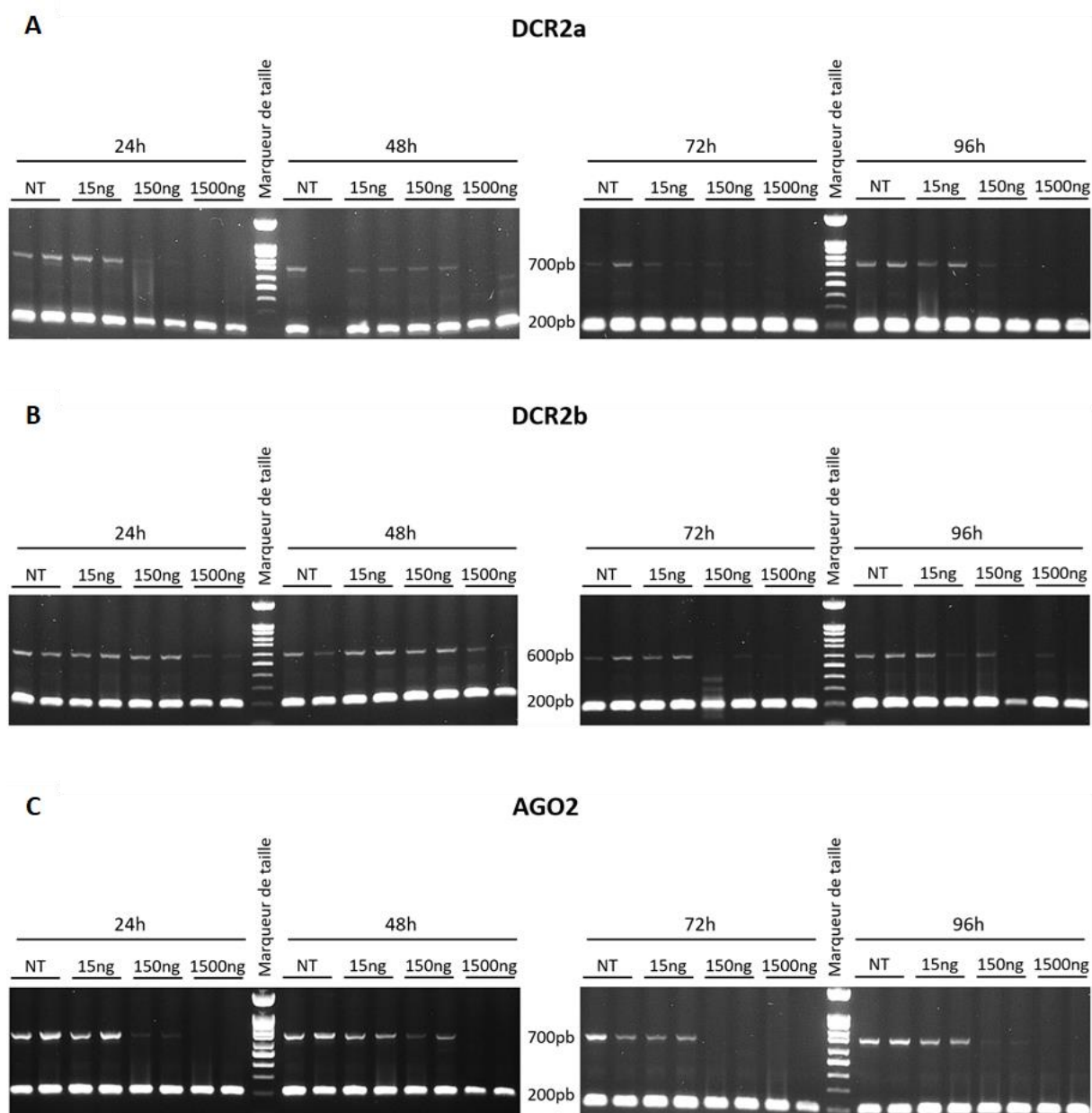


Figure 46. Inactivation de l'expression de DCR2 et AGO2 dans les cellules IRE/CTVM19 au cours du temps en fonction de la quantité d'ARNdb utilisées

Gel d'agarose présentant le niveau d'expression de DCR2 (A & B) et d'AGO2 (C) en cellules IRE/CTVM19 24h, 48h, 72h et 96h après transfection de différentes quantités d'ARNdb (0ng, 15ng, 150ng, 1500ng). L'actine a servi de contrôle interne et le marque de taille 100 pb (Ozyme, St Quentin en Yvelines, France) a été utilisée pour déterminer la taille des fragments amplifiés.

En conclusion, une diminution des transcrits de DCR2 et d'AGO2 est obtenue dès 24h suivant la transfection de 1 500ng d'ARNdb ciblant le produit de l'expression des gènes d'intérêt.

4. Discussion

Réponse antivirale et compétence vectorielle

L'infection virale de la tique *I. ricinus* par TBEV et LIV induit la mise en place d'une réponse immunitaire antivirale partiellement caractérisée à ce jour. L'infection de la tique prend place au cours du repas sanguin de la tique sur un hôte virémique. Le virus gagne alors l'intestin avant de se propager dans l'organisme. L'intestin de la tique est la première barrière que le virus rencontre. Du succès du franchissement de cette première barrière dépendra la dissémination du virus dans tout l'organisme de la tique pour atteindre les organes qui lui assureront sa transmission, soit à un autre hôte vertébré via les glandes salivaires, soit à la descendance de la tique en gagnant les organes reproducteurs. L'importance de l'intestin dans la définition de la compétence vectorielle d'une tique pour un virus a été montrée dès 1989 par les travaux de Jones et al. [482]. L'infection des tiques *Rhipicephalus appendiculatus* et *Amblyomma variegatum* par gorgement expérimental sur hamsters virémiques avec les virus Thogotho (THOV) et Dhori (DHOV) a montré la capacité de transmission de THOV par ces 2 espèces de tiques mais pas celle de DHOV. En revanche, l'inoculation par voie intracœlomique (mode d'inoculation s'affranchissant de la barrière intestinale) de ce dernier virus dans chacune des espèces de tiques a permis à ces 2 espèces de tiques de transmettre DHOV, soulignant le rôle incontournable de l'intestin dans la définition de la compétence vectorielle de la tique.

L'épithélium intestinal est décrit chez le moustique comme étant le siège de la réponse antivirale par siARNs [483]. Tout du moins, c'est ce qui est admis chez les moustiques du genre *Aedes* car il semblerait que le rôle de l'intestin dans la voie des siARNs chez les moustiques du genre *Anophèles* ne soit pas aussi important, bien que la voie des siARNs dans l'immunité antivirale l'est tout autant chez les 2 genres de moustiques [484].

L'intestin comme haut lieu de la réponse antivirale par les siARNs chez la tique expliquerait la faible proportion de viARNs obtenus suite à l'infection d'*I. ricinus* par TBEV. En effet, nous avons inoculé le virus aux tiques par voie intracœlomique, c'est-à-dire que nous nous sommes affranchis de la barrière intestinale. Les proportions de viARNs obtenues *in vivo* sont largement inférieures à celles obtenues *in vitro* (0,019% au maximum *in vivo* contre 0,3% au minimum *in vitro*) et nous suggèrent que nos conditions expérimentales n'étaient pas optimales.

Nous admettons avoir appliqué le protocole de travaux publiés par Mirko et al. [485] qui ont établi la cinétique d'infection d'*I. ricinus* par TBEV en inoculant le virus par voie intracœlomique. L'inoculation par voie intracœlomique présente l'avantage de pouvoir contrôler la quantité de virus administrée, ce que ne permet pas l'infection par gorgement. Toutefois, cette expérimentation devra être renouvelée, par gorgement à l'aide de gorgeurs artificiels disponibles au laboratoire et avec un nombre de tiques

suffisant pour en sacrifier à intervalles réguliers dans l'objectif d'établir le pic de l'infection et surtout le pic de production des viARNs.

Voies de l'interférence ARN

Le séquençage des petits ARNs issus de cellules de tiques, mais également de tiques *I. ricinus* infectées par TBEV et LIV a montré la production de viARNs de 22 nucléotides de long s'alignant le long des génomes viraux. La production de tels viARNs *in vivo* par des tiques femelles *I. ricinus* est, à notre connaissance, démontrée pour la première fois.

Quant à la différence de taille entre les viARNs produits par les insectes tels que la drosophile ou le moustique et ceux produits par la tique, cela avait déjà été montré sur des cellules d'*I. scapularis* infectées par le virus langat [325].

La voie des miARN ayant une origine virale ne semble jamais avoir fait l'objet d'investigations. Cela s'entend du fait que les virus d'arthropodes sont des virus à ARN dont le cycle de réplication n'implique pas d'étapes dans le noyau de la cellule. Or, la machinerie des miARNs débute justement dans le noyau de la cellule. Aussi, le virus n'a a priori pas accès à la machinerie des miARNs. Néanmoins, des études réalisées sur des moustiques ont montré une réponse antivirale efficace de la part des miARNs [355], [386], [484], [486]. Les miARNs ne nécessitant pas une complémentarité parfaite pour venir s'hybrider sur sa cible, il ne nous est pas possible de conclure sur la présence de miARNs viraux dans le cadre de notre étude.

La voie des piARNs est la dernière des voies de l'ARN interférence. Cette voie est initialement décrite pour intervenir dans le maintien de l'intégrité du génome par la régulation des transposons mais a été proposée dernièrement comme ayant une activité antivirale chez les moustiques [377]. Nos résultats suggèrent ici que cette population de petits ARNs existe effectivement mais qu'elle ne serait pas impliquée dans la réponse antivirale contre TBEV. A notre connaissance, les piARNs n'ont jamais fait l'objet d'attention chez les tiques, que ce soit pour leur rôle antiviral ou leur rôle de régulation des transposons dans le maintien de l'intégrité du génome.

A notre connaissance, une seule étude a rapporté un rôle antiviral des piARNs chez *I. scapularis* mais pas chez *R. microplus* [487]. Ces piARNs auraient pour origine des éléments viraux de Bunya- et Orthomixoviridae intégrés dans le génome d'*I. scapularis*.

Rôle de la voie des siARNs

L'identification de la production de viARNs *in vitro* et *in vivo* suite à une infection virale ne permet pas de conclure quant au rôle antiviral de ces viARNs. Cette conclusion pourra être apportée une fois que l'impact de ces viARNs sur la réplication virale aura été déterminée. La stratégie communément employée aujourd'hui pour déterminer le rôle d'un facteur sur une voie de signalisation est d'éteindre l'expression de ce facteur et d'en évaluer l'impact sur le système étudié.

Nous avons donc opté pour la stratégie d'éteindre l'expression des acteurs de la voie des siRNAs afin d'en évaluer l'impact sur la réplication virale. Le choix entre les petits et les longs ARNs db a rapidement été fait basé sur les travaux de Barry et al. [488].

Nous avons alors rencontré quelques difficultés dans l'établissement des conditions d'extinction de l'expression des ARNm de DCR2 et AGO2 mais nous avons finalement réussi à établir des protocoles de synthèse *in vitro* des ARNdb et de transfection des cellules de tiques avec ces ARNs db permettant une diminution importante de l'expression des ARNm des différents acteurs de la voie des siARNs. L'impact de l'extinction de l'expression de ces acteurs sur la réplication virale sera évalué très prochainement.

Modélisation de l'infection des 3 lignées cellulaires d'*I. ricinus* par TBEV et LIV

Les 3 lignées cellulaires aujourd'hui disponibles pour *I. ricinus* ont été utilisées dans une même expérience pour modéliser les premières étapes de l'infection par TBEV et LIV. Les résultats suggèrent que la multiplication des génomes viraux en question a bien lieu dans les 3 lignées cellulaires et qu'un seuil de réplication maximale est atteint plusieurs jours après l'infection. Ce niveau optimal de réplication varie selon la lignée infectée, il est observé plus précocement chez les IRE11 et les IRE/CTVM20 (entre le 1^{er} et le 2^e jour suivant l'infection) que chez les IRE/CTVM19 (après le 3^e jour). Ce décalage temporel entre les lignées, et notamment entre les IRE/CTVM19 et les IRE/CTVM20 qui sont issues d'œufs d'une même tique, pourrait avoir plusieurs hypothèses. Une hypothèse avancée pourrait être que les 3 lignées cellulaires sont génétiquement différentes et donc que les protéines exprimées divergent. Il faut également évoquer la possibilité que les lignées aient divergé en culture. Ainsi, certains récepteurs, nécessaires à l'entrée des virus dans les cellules, pourraient être exprimés chez les IRE/CTVM20 et pas chez les IRE/CTVM19 ou les IRE11. De plus, certains facteurs, favorisant ou limitant l'infection virale, pourraient être davantage exprimés dans une lignée plutôt qu'une autre ou à l'inverse, sous-exprimés. En ce sens, une étude transcriptionnelle conduite dans ces lignées en conditions infectées pourrait permettre d'identifier des éléments clés de l'infection virale.

Infection persistante

Une réponse antivirale est initiée lors de l'infection d'un arthropode par un virus. Cette réponse antivirale ne conduira pas pour autant à l'élimination totale des virus. A la place, une infection persistante va s'installer, sans avoir d'impact a priori sur les traits d'histoire de vie de l'arthropode.

Cette infection persistante a pu être modélisée sur chacune des lignées d'*I. ricinus* avec TBEV. A notre connaissance, c'est la première fois que les 3 lignées disponibles d'*I. ricinus* sont utilisées dans la même expérimentation pour modéliser une infection virale. L'infection des IRE/CTVM19 par TBEV a montré des niveaux de répliquions virales équivalentes à celles publiées par Belova et al. [489].

Nous remarquons que les niveaux de répliquion virale d'une lignée à une autre peuvent être très différents. Est-ce que la polyclonalité de chacune des lignées pourrait expliquer de telles différences ? Certaines lignées comprendraient-elles plus de cellules permissives au virus que d'autres ?

Les mécanismes par lesquels les virus maintiennent une infection persistante chez les arthropodes ne sont pas encore élucidés. Deux études réalisées chez les moustiques ont montré que la production d'ADNs viraux générés par l'activité de transcriptase inverse de la cellule à partir de l'ARN viral induisait le maintien de la stimulation de la machinerie des siARNs par la cellule tout en permettant au virus de continuer à se répliquer [481], [490].

Maintenant que nous disposons de modèles d'infection persistante chez la tique, nous pouvons envisager l'étude des mécanismes du maintien des virus à bas bruit chez la tique et notamment d'étudier si de tels ADNs viraux sont également générés chez la tique lors d'une infection virale.

DISCUSSION GENERALE

1. Le risque des maladies vectorielles

Depuis plusieurs années, les maladies vectorielles se sont considérablement propagées à travers le monde en exposant les populations humaines et animales à un nombre d'infections plus important. Cette propagation est due à différents facteurs : changement climatique, mondialisation des échanges commerciaux et touristiques, urbanisation, augmentation de la densité de population et des surfaces agricoles occupées [491]. Ces différents facteurs bouleversent les écosystèmes et donc les niches écologiques existantes conduisant à l'introduction de nouveaux vecteurs arthropodes dans certaines régions géographiques et avec eux à l'émergence de certains arbovirus [492]–[494] et notamment de virus transmis par les tiques [6]. Dans ce contexte, l'OMS a développé d'une action mondiale pour lutter contre les vecteurs sur la période 2017-2030 [495]. Cette action préconise notamment l'élaboration et/ou le suivi des progrès des programmes nationaux de recherche fondamentale et appliquée dans le domaine de l'entomologie médicale et de la lutte antivectorielle.

2. Les objectifs du projet de thèse

L'impact des flavivirus transmis par les tiques sur la santé globale est élevé. Appréhender ces flavivirus et l'écologie des maladies dont ils sont responsables implique de mieux comprendre la compétence vectorielle des tiques qui les transmettent, et notamment les interactions moléculaires existantes entre le virus et le vecteur dont elles dépendent. Parmi elles figurent les interactions entre protéines cellulaires et protéines virales. Ces dernières s'infiltrent dans des réseaux protéiques préétablis au sein des cellules de l'arthropode. Les protéines de tique ciblées par les protéines virales quant à elles, régissent une pléiade de processus biologiques, dont la réponse immunitaire innée de l'hôte vecteur. De fait, ces interactions entre les protéines du virus et celles de la tique sont déterminantes pour la compétence vectorielle de la tique.

En ce sens, le premier objectif de ma thèse était d'identifier de potentielles interactions protéiques impliqués dans la compétence vectorielle d'*I. ricinus* pour TBEV et LIV.

Alors que le virus détourne la machinerie cellulaire du vecteur afin de se répliquer, la tique quant à elle, met en place des moyens de lutte en vue de limiter l'impact du virus sur ses traits de vie. Cette lutte se traduit en partie par le développement et le maintien d'une réponse immunitaire.

Aussi, le second objectif de ma thèse était d'explorer la compétence vectorielle sous le prisme de la réponse immunitaire antivirale mise en place par *I. ricinus* lors de son infection par TBEV et LIV.

3. La tique : un modèle d'étude complexe

Mon projet de thèse s'est inscrit dans une nouvelle thématique d'équipe, qui a débuté il y a 4 ans au sein de l'UMR Virologie. L'équipe mène ainsi différents projets qui visent notamment à mieux comprendre les mécanismes de détournement des voies cellulaires par les flavivirus transmis par les tiques et d'échappement aux défenses antivirales. L'un de ses objectifs phares est d'identifier des marqueurs moléculaires de différents aspects de la pathobiologie des infections concernées, y compris la virulence, le pouvoir zoonotique et la compétence vectorielle. Prendre part à cette nouvelle thématique sur un organisme peu étudié comme la tique a représenté un défi motivant puisqu'un grand nombre de connaissances reste à découvrir, bien que cela s'accompagne aussi d'inconvénients. A cet égard, mon projet de thèse s'est heurté à plusieurs difficultés inhérentes à l'étude de la tique *I. ricinus* et à l'utilisation de lignées cellulaires en dérivant. En effet, l'absence de disponibilité du génome d'*I. ricinus* a compliqué l'identification des interacteurs cellulaires obtenus en double-hybride ainsi que l'analyse de leur fonction. Cette absence de séquences du vecteur a également ralenti et rendu fastidieux la synthèse d'ARNdb fonctionnels. Ce délai m'a malheureusement empêché d'explorer la fonction des interacteurs cellulaires (comme étant facteurs de restriction ou de dépendance) et des différents acteurs de l'immunité antivirale par ARNi dans le temps imparti de la thèse.

Néanmoins, au terme du projet de thèse les premiers ARNdb fonctionnels ont été obtenus et la mise au point de leur synthèse et condition de transfection ont été établies permettant l'utilisation de l'ARNi dans la caractérisation future des protéines d'intérêt.

4. Les interactions virus-vecteur dans le cycle de vie du virus et de la tique

L'étude d'interactomique réalisée a permis de générer, d'après nos connaissances, le premier réseau d'interactions protéine-protéine virus-tique. Ce réseau, établi entre 2 arbovirus (TBEV et LIV) avec leur vecteur *I. ricinus* a révélé l'existence de 22 protéines d'*I. ricinus* impliquées dans des interactions binaires, sans distinction, avec TBEV et LIV. Une seconde étude, relevant du deuxième objectif de la thèse, a révélé que TBEV et LIV induisaient une réponse immunitaire antivirale chez *I. ricinus*, sous forme d'une production de viARN de 22 nucléotides.

Au cours du cycle viral au sein du vecteur, TBEV et LIV vont interagir avec un ensemble de protéines cellulaires de tique. Celles que nous avons pu identifier sont communes aux deux virus. La surreprésentation de certains GO terms tels que « la réponse aux cytokines », « la régulation de la cascade MAPK », « la régulation des processus métaboliques impliquant le phosphate », « la régulation d'activités catalytiques », « la réponse à des substances organiques », « la régulation de la

communication cellulaire » et « la régulation de la signalisation » a permis d'identifier un nombre de processus biologiques qui sont probablement affectés par les interactions protéine-protéines. Toutefois, l'analyse de l'impact des interactions sur la réplication virale n'étant pas encore réalisée, leur rôle fonctionnel dans le cycle viral, et notamment en tant que facteurs de dépendance ou de restriction, ne peut pas être attribué avec certitude.

La compétence vectorielle dépend notamment de la capacité des virus à contrecarrer la réponse antivirale. De fait, l'interaction avec des composants des voies de l'immunité innée était prévisible. Ainsi, 4 orthologues de protéines TRAF ont été identifiés (Ir4, Ir9, Ir11 et Ir19). Ces facteurs associés aux récepteurs de facteurs de nécrose tumorale (TNF) seraient impliqués, chez les moustiques du genre *Culex*, dans l'expression de VAGO (peptide au rôle antiviral) suite à la reconnaissance de l'ARN viral par DCR2. Les protéines TRAF activeraient la protéine REL2 (orthologue de NFκB) qui posséderait un site de liaison en amont du promoteur de Vago [344]. Cette cascade d'activation est encore mal caractérisée chez *I. ricinus* mais nos résultats suggèrent que les protéines TRAF joueraient un rôle important dans le cycle de réplication de TBEV et LIV. Une hypothèse serait que ces TRAF constitueraient des facteurs de restriction à l'infection par TBEV et LIV bien qu'*a priori* leur expression au sein des lignées cellulaires ne coïncide pas avec la susceptibilité et la résistance de ces lignées.

Par ailleurs, d'autres interactions protéiques identifiées pourraient jouer un rôle dans l'immunité antivirale. C'est le cas de l'orthologue du facteur de transcription AP-1 (Ir3) qui est impliqué, chez les mammifères, dans l'expression de gènes régulant des fonctions multiples telles que l'apoptose ou l'inflammation. Ainsi, son rôle dans l'immunité antivirale, ainsi que ceux des autres protéines cellulaires d'*I. ricinus*, est peut-être plus subtile et reste à déterminer. D'autre part, la variation de l'expression des 22 protéines cellulaires de tique pourrait coïncider avec la susceptibilité ou la résistance à l'infection par TBEV et LIV des différentes lignées cellulaires d'*I. ricinus* considérées.

En dépit de leur proximité génétique, TBEV et LIV sont divergents d'un point de vue écologique puisqu'ils n'occupent pas les mêmes zones géographiques ni les mêmes niches écologiques. Ces différences peuvent reposer sur des interactions protéine-protéine distinctes avec leur vecteur arthropodes et/ou avec leurs hôtes réservoirs.

Le réseau d'interactions protéiques établi au cours de cette thèse n'a pas permis de mettre en évidence des différences d'interaction protéiques entre TBEV et LIV avec leur vecteur *I. ricinus*. Toutefois, ce réseau n'est pas exhaustif, en raison de la technique utilisée, et demande à être complété.

Par ailleurs, plusieurs observations suggèrent que TBEV et LIV interagissent distinctement avec leur vecteur. En effet, TBEV semble mieux se répliquer que LIV au sein des 3 lignées cellulaires. Même si nous ne pouvons pas exclure que la souche Hypr du TBEV soit intrinsèquement plus répliatif que la souche LI3/1 du LIV, il est possible que la différence observée reflète pour le TBEV une meilleure

capacité à échapper au système immunitaire ou à exploiter les processus biologiques de la tique. De plus, la réponse transcriptionnelle déclenchée par les deux virus dans la lignée IRE/CTVM20 est différente, éventuellement en lien avec des interactions différentielles avec les voies antivirales. Les gènes en question sont impliqués dans le stress cellulaire, l'immunité, la synthèse de peptides antimicrobiens et molécules anti-pathogènes ainsi que dans l'apoptose et sa régulation. L'apoptose serait ainsi un mécanisme utilisé par *I. ricinus* pour restreindre les dommages cellulaires causés par l'infection à TBEV et LIV [423].

Ces différences peuvent s'expliquer par des interactions protéine-protéine uniques à chaque virus que nous n'avons pas identifiées, mais elles peuvent aussi relever à d'autres types d'interaction virus-cellules, telle que les interactions entre protéines cellulaires et ARN viral. Ainsi, l'ARN subgénomique viral pourrait entrer en jeu [496]–[498], tout comme les régions non traduites en 5' et en 3' du génome des flavivirus [499], [500].

Ainsi, les différences écologiques observées entre TBEV et LIV encouragent à élargir l'investigation des interactions, et notamment chez les espèces réservoirs, d'autant plus qu'elles sont réputées différents pour TBEV et LIV [208], [220].

5. Les perspectives et impacts du projet

En comparaison avec d'autres vecteurs arthropodes comme le moustique, la tique est peu étudiée et les ressources les concernant restent limitées. Toutefois, un nombre croissant d'études s'attachant à mieux comprendre la compétence vectorielle des tiques dans le cycle de transmission des pathogènes concernés voient le jour [21], [501]–[504], et ma thèse s'inscrit dans cette démarche.

Plusieurs pistes restent à investiguer dans l'identification d'acteurs moléculaires de la compétence vectorielle d'*I. ricinus*. Ainsi, les interactions protéine-protéine identifiées seront caractérisées dans l'infection des flavivirus par extinction de l'expression de chaque gène codant les 22 protéines de tique. L'impact de chaque protéine sur la réplication pourra ainsi être mesuré permettant alors d'identifier le rôle de ces protéines dans le cycle viral.

Cette caractérisation sera effectuée en cellule de tique pour tous les interacteurs dans un premier temps puis poursuivie *in vivo* pour des interactants sélectionnés. Ainsi, l'extinction de l'expression de ces derniers sera effectuée par micro-injection d'ARNdb chez la tique vivante. Puis cette tique sera infectée par TBEV ou LIV à l'aide d'un gorgéur artificiel avant d'évaluer le titre viral des glandes salivaires. Toujours en utilisant la technique de l'ARNi *in vitro*, le rôle d'acteurs de l'immunité antivirale connus (DCR2, AGO2) et suspectés (Irr3, Irr9, Irr11) sera évalué par transfection séquentielle lors d'infections persistantes. Par ailleurs, la conception de lignée knock-out pour les gènes d'intérêt (Irr3, Irr9, Irr11) serait un outil bénéfique à la caractérisation de ces acteurs cellulaires.

Une des perspectives du projet d'un point de vu plus global serait d'étendre le réseau d'interactions d'*I. ricinus* établi à d'autres arbovirus de tique (UUKV, THOV, KEMV) dans un premier temps mais aussi de moustiques et à des flavivirus aux vecteurs inconnus [505]. La comparaison de tels réseaux, ainsi que ceux établis pour d'autres arthropodes vecteurs (tiques, moustiques), pourrait permettre d'identifier des facteurs de virulence chez la tique mais aussi des acteurs clés de la compétence vectorielle. A très large échelle, l'identification de modules cellulaires ciblés par les arbovirus permettrait d'établir un schéma des infections aux arbovirus et ce, quel que soit le virus ou le vecteur considéré.

La poursuite de ce projet de thèse serait facilitée par le fait que les ressources et les connaissances relatives aux vecteurs tiques de manière générale s'enrichissent. Grabowski et Hill [506] ont proposé un plan d'action ambitieux sur 10 ans dans différents domaines « omiques » qui permettrait théoriquement un meilleur contrôle des flavivirus transmis par les tiques à l'horizon 2030. Ce plan d'action s'articule en 3 axes : un 1^{er} pan s'attachant à la recherche sur ces flavivirus transmis par les tiques, un 2^e axe portant sur l'identification de nouveaux vaccins, antiviraux et acaricides, et un 3^e volet se concentrant sur les tiques transmettant ces nombreux flavivirus. Concernant ce dernier axe, les recherches avancent puisque des premières données sur le génome d'*I. ricinus* ont été publiées [473] et les génomes de 6 espèces de tiques ont été séquencés afin de caractériser leur diversité génétique, comprendre la structure des populations ainsi que la distribution des pathogènes qu'elles transmettent [507].

L'accumulation de nouvelles données enrichit les bases de données qui vont alimenter les modèles décrivant la circulation et l'émergence d'arbovirus en Europe et dans le monde. Ces modèles prédictifs permettraient d'identifier de nouveaux risques mais aussi d'en écarter. Les nouvelles connaissances portant sur la compétence vectorielle instruisent l'analyse de risque d'émergence et de ce fait l'anticipation et la prévention de ces phénomènes d'émergence, avec l'ultime ambition de limiter l'impact de maladies vectorielles en santé globale.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] World Health Organization, "Vector-borne diseases," 2020. [Online]. Available: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/vector-borne-diseases>. [Accessed: 26-Mar-2020].
- [2] H. Cholleti, M. Berg, J. Hayer, and A.-L. Blomström, "Vector-borne viruses and their detection by viral metagenomics," *Infect. Ecol. Epidemiol.*, vol. 8, no. 1, p. 1553465, Jan. 2018, doi: 10.1080/20008686.2018.1553465.
- [3] S. C. Weaver and W. K. Reisen, "Present and future arboviral threats," *Antiviral Research*, vol. 85, no. 2. Elsevier, pp. 328–345, 01-Feb-2010, doi: 10.1016/j.antiviral.2009.10.008.
- [4] "WHO | World Health Organization," *WHO*, 2016.
- [5] F. Jongejans and G. Uilenberg, "The global importance of ticks," *Parasitology*, vol. 129, no. SUPPL. pp. S3–S14, 19-Oct-2004, doi: 10.1017/S0031182004005967.
- [6] K. L. Mansfield, L. Jizhou, L. P. Phipps, and N. Johnson, "Emerging Tick-Borne Viruses in the Twenty-First Century," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. July, 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00298.
- [7] R. Rosenberg *et al.*, "Vital Signs : Trends in Reported Vectorborne Disease Cases — United States and Territories, 2004–2016," *MMWR. Morb. Mortal. Wkly. Rep.*, vol. 67, no. 17, pp. 496–501, May 2018, doi: 10.15585/mmwr.mm6717e1.
- [8] J. Shi, Z. Hu, F. Deng, and S. Shen, "Tick-Borne Viruses," *Viol. Sin.*, vol. 33, no. 1, pp. 21–43, 2018, doi: 10.1007/s12250-018-0019-0.
- [9] D. A. Bente, N. L. Forrester, D. M. Watts, A. J. McAuley, C. A. Whitehouse, and M. Bray, "Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity," *Antiviral Research*, vol. 100, no. 1. Antiviral Res, pp. 159–189, 2013, doi: 10.1016/j.antiviral.2013.07.006.
- [10] R. Vorou, I. N. Pierroutsakos, and H. C. Maltezou, "Crimean-Congo hemorrhagic fever," *Curr. Opin. Infect. Dis.*, vol. 20, no. 5, pp. 495–500, Oct. 2007, doi: 10.1097/QCO.0b013e3282a56a0a.
- [11] H. Hoogstraal, "Review Article: The Epidemiology of Tick-Borne Crimean-Congo Hemorrhagic Fever in Asia, Europe, and Africa," *J. Med. Entomol.*, vol. 15, no. 4, pp. 307–417, May 1979, doi: 10.1093/jmedent/15.4.307.
- [12] J. Casals, "Antigenic Similarity between the Virus Causing Crimean Hemorrhagic Fever and Congo Virus," *Exp. Biol. Med.*, vol. 131, no. 1, pp. 233–236, May 1969, doi: 10.3181/00379727-131-33847.
- [13] Ö. Ergönül, "Crimean-Congo haemorrhagic fever," *Lancet Infectious Diseases*, vol. 6, no. 4. Elsevier, pp. 203–214, 01-Apr-2006, doi: 10.1016/S1473-3099(06)70435-2.
- [14] R. N. Charrel *et al.*, "Tick-borne virus diseases of human interest in Europe," *Clin. Microbiol. Infect.*, vol. 10, no. 12, pp. 1040–1055, 2004, doi: 10.1111/j.1469-0691.2004.01022.x.
- [15] X. Y. Lei, M. M. Liu, and X. J. Yu, "Severe fever with thrombocytopenia syndrome and its pathogen SFTSV," *Microbes Infect.*, vol. 17, no. 2, pp. 149–154, Feb. 2015, doi: 10.1016/j.micinf.2014.12.002.
- [16] A. C. Brault, H. M. Savage, N. K. Duggal, R. J. Eisen, and J. E. Staples, "Heartland virus epidemiology, vector association, and disease potential," *Viruses*, vol. 10, no. 9. MDPI AG, 14-Sep-2018, doi: 10.3390/v10090498.

- [17] M. Mazelier, R. N. Rouxel, M. Zumstein, R. Mancini, L. Bell-Sakyi, and P.-Y. Lozach, "Uukuniemi Virus as a Tick-Borne Virus Model," *J. Virol.*, vol. 90, no. 15, pp. 6784–6798, Aug. 2016, doi: 10.1128/jvi.00095-16.
- [18] I. V. Kuzmin, I. S. Novella, R. G. Dietzgen, A. Padhi, and C. E. Rupprecht, "The rhabdoviruses: Biodiversity, phylogenetics, and evolution," *Infect. Genet. Evol.*, vol. 9, no. 4, pp. 541–553, Jul. 2009, doi: 10.1016/j.meegid.2009.02.005.
- [19] International Committee on Taxonomy of Viruses, "Virus Taxonomy," 2018. [Online]. Available: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/>. [Accessed: 01-Apr-2020].
- [20] A. Miteva *et al.*, "Epidemiological analyses of African swine fever in the European Union (November 2018 to October 2019)," *EFSA J.*, vol. 18, no. 1, Jan. 2020, doi: 10.2903/j.efsa.2020.5996.
- [21] R. Pereira de Oliveira *et al.*, "Comparative vector competence of the Afrotropical soft tick *Ornithodoros moubata* and Palearctic species, *O. erraticus* and *O. verrucosus*, for African swine fever virus strains circulating in Eurasia," *PLoS One*, vol. 14, no. 11, p. e0225657, Nov. 2019, doi: 10.1371/journal.pone.0225657.
- [22] C. Chastel *et al.*, "Isolation of Eyach virus (Reoviridae, Colorado tick fever group) from *Ixodes ricinus* and *I. ventralloii* ticks in France," *Arch. Virol.*, vol. 82, no. 3–4, pp. 161–171, Sep. 1984, doi: 10.1007/BF01311160.
- [23] S. Moutailler, I. Popovici, E. Devillers, M. Vayssier-Taussat, and M. Eloit, "Diversity of viruses in *Ixodes ricinus*, and characterization of a neurotropic strain of Eyach virus," *New Microbes New Infect.*, vol. 11, pp. 71–81, May 2016, doi: 10.1016/j.nmni.2016.02.012.
- [24] H. Attoui *et al.*, "Complete sequence characterization of the genome of the St Croix River virus, a new orbivirus isolated from cells of *Ixodes scapularis*," *J. Gen. Virol.*, vol. 82, no. 4, pp. 795–804, Apr. 2001, doi: 10.1099/0022-1317-82-4-795.
- [25] U. G. Munderloh, Y. Liu, M. Wang, C. Chen, and T. J. Kurtti, "Establishment, maintenance and description of cell lines from the tick *Ixodes scapularis*," *J. Parasitol.*, vol. 80, no. 4, pp. 533–543, 1994, doi: 10.2307/3283188.
- [26] L. Bell-Sakyi and H. Attoui, "Endogenous tick viruses and modulation of tick-borne pathogen growth," *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, vol. 4, no. JUL. Frontiers Media SA, 2013, doi: 10.3389/fcimb.2013.00025.
- [27] H. Libíková, F. Heinz, D. Ujházyová, and D. Stünzner, "Orbiviruses of the Kemerovo complex and neurological diseases," *Med. Microbiol. Immunol.*, vol. 166, no. 1–4, pp. 255–263, 1978, doi: 10.1007/BF02121159.
- [28] N. Drăgănescu *et al.*, "Investigations on the presence of antibodies to alphaviruses, flaviviruses, Bunyavirus and Kemerovo virus in humans and some domestic animals - PubMed," *Virologie*, 1978.
- [29] Z. Hubálek and I. Rudolf, "Tick-borne viruses in Europe," *Parasitology Research*, vol. 111, no. 1. Springer, pp. 9–36, 18-Jul-2012, doi: 10.1007/s00436-012-2910-1.
- [30] T. S. Gritsun, V. A. Lashkevich, and E. A. Gould, "Tick-borne encephalitis," *Antiviral Res.*, vol. 57, no. 1–2, pp. 129–146, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0166-3542(02)00206-1.
- [31] G. Grard *et al.*, "Genetic characterization of tick-borne flaviviruses: New insights into evolution, pathogenetic determinants and taxonomy," *Virology*, vol. 361, no. 1, pp. 80–92, 2007, doi: 10.1016/j.virol.2006.09.015.
- [32] C. H. Calisher *et al.*, "Antigenic relationships between flaviviruses as determined by cross-neutralization tests with polyclonal antisera," *J. Gen. Virol.*, vol. 70, no. 1, pp. 37–43, Jan. 1989,

doi: 10.1099/0022-1317-70-1-37.

- [33] M. S. Campbell and A. G. Pletnev, "Infectious cDNA clones of Langat tick-borne flavivirus that differ from their parent in peripheral neurovirulence," *Virology*, vol. 269, no. 1, pp. 225–237, Mar. 2000, doi: 10.1006/viro.2000.0220.
- [34] L. Lindquist and O. Vapalahti, "Tick-borne encephalitis," *The Lancet*, vol. 371, no. 9627. Elsevier, pp. 1861–1871, 31-May-2008, doi: 10.1016/S0140-6736(08)60800-4.
- [35] X. Dai, G. Shang, S. Lu, J. Yang, and J. Xu, "A new subtype of eastern tick-borne encephalitis virus discovered in Qinghai-Tibet Plateau, China article," *Emerg. Microbes Infect.*, vol. 7, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41426-018-0081-6.
- [36] I. V. Kozlova *et al.*, "Characteristics of the baikal subtype of tick-borne encephalitis virus circulating in eastern siberia," *Acta Biomed. Sci.*, vol. 3, no. 4, pp. 53–60, Jul. 2018, doi: 10.29413/abs.2018-3.4.9.
- [37] W. A. Pool, A. Brownlee, and D. R. Wilson, "The etiology of 'louping-ill,'" *J. Comp. Pathol. Ther.*, vol. 43, pp. 253–290, 1930, doi: 10.1016/S0368-1742(30)80026-2.
- [38] K. McGuire, E. C. Holmes, G. F. Gao, H. W. Reid, and E. A. Gould, "Tracing the origins of louping ill virus by molecular phylogenetic analysis," *J. Gen. Virol.*, vol. 79, no. 5, pp. 981–988, 1998, doi: 10.1099/0022-1317-79-5-981.
- [39] C. E. Smith, D. A. McMahon, K. J. O'Reilly, A. L. Wilson, and J. M. Robertson, "The epidemiology of louping ill in Ayrshire: The first year of studies in sheep," *J. Hyg. (Lond.)*, vol. 62, no. 1, pp. 53–68, 1964, doi: 10.1017/S0022172400039772.
- [40] J. Benavides, K. Willoughby, C. Underwood, B. Newman, G. Mitchell, and H. Carty, "Encephalitis and neuronal necrosis in a 3-month-old suckled beef calf," *Vet. Pathol.*, vol. 48, no. 5, pp. E1-4, Sep. 2011, doi: 10.1177/0300985810396515.
- [41] C. C. Bannatyne, R. L. Wilson, H. W. Reid, D. Buxton, and I. Pow, "Louping-ill virus infection of pigs," *Vet. Rec.*, vol. 106, no. 1, p. 13, Jan. 1980, doi: 10.1136/vr.106.1.13.
- [42] H. M. Ross, C. C. Evans, J. A. Spence, H. W. Reid, and N. Krueger, "Louping ill in free-ranging pigs," *Veterinary Record*, vol. 134, no. 4. pp. 99–100, 22-Jan-1994, doi: 10.1136/vr.134.4.99.
- [43] H. Williams, H. Thorburn, and G. S. Ziffo, "Isolation of louping ill virus from the red grouse [45]," *Nature*, vol. 200, no. 4902. pp. 193–194, 12-Oct-1963, doi: 10.1038/200193a0.
- [44] H. W. Reid, J. S. Duncan, J. D. P. Phillips, R. Moss, and A. Watson, "Studies on louping-ill virus (Flavivirus group) in wild red grouse (*Lagopus lagopus scoticus*)," *J. Hyg. (Lond.)*, vol. 81, no. 2, pp. 321–329, 1978, doi: 10.1017/S002217240002516X.
- [45] C. P. MacKenzie, N. D. Lewis, S. T. Smith, and R. W. Muir, "Louping-ill in a working collie.," *Vet. Rec.*, vol. 92, no. 14, pp. 354–356, 1973, doi: 10.1136/vr.92.14.354.
- [46] P. J. Timoney, W. J. Donnelly, L. O. Clements, and M. Fenlon, "Encephalitis caused by louping ill virus in a group of horses in Ireland.," *Equine Vet. J.*, vol. 8, no. 3, pp. 113–7, Jul. 1976, doi: 10.1111/j.2042-3306.1976.tb03311.x.
- [47] H. W. Reid, R. M. Barlow, and J. B. Boyce, "Isolation of louping-ill virus from a roe deer (*Capreolus capreolus*).," *Vet. Rec.*, vol. 98, no. 6, p. 116, Feb. 1976, doi: 10.1136/vr.98.6.116.
- [48] H. W. Reid, R. M. Barlow, and I. Pow, "Isolation of louping-ill virus from red deer (*Cervus elaphus*).," *Vet. Rec.*, vol. 102, no. 21, pp. 463–464, May 1978, doi: 10.1136/vr.102.21.463.
- [49] D. Gray, K. Webster, and J. E. Berry, "Evidence of louping ill and tick-borne fever in goats.," *Vet. Rec.*, vol. 122, no. 3, p. 66, Jan. 1988, doi: 10.1136/vr.122.3.66.
- [50] C. E. Gordon Smith, M. G. R. Varma, and D. McMahon, "Isolation of louping ill virus from small

- mammals in ayrshire, Scotland [35],” *Nature*, vol. 203, no. 4948, pp. 992–993, Aug. 1964, doi: 10.1038/203992a0.
- [51] P. M. Zanotto, E. A. Gould, G. F. Gao, P. H. Harvey, and E. C. Holmes, “Population dynamics of flaviviruses revealed by molecular phylogenies,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 93, no. 2, pp. 548–553, Jan. 1996, doi: 10.1073/PNAS.93.2.548.
 - [52] S. E. Randolph and EDEN-TBD sub-project team, “Human activities predominate in determining changing incidence of tick-borne encephalitis in Europe,” *Euro Surveill.*, vol. 15, no. 27, pp. 24–31, 2010, doi: 10.2807/ese.15.27.19606-en.
 - [53] M. Holding *et al.*, “Tick-borne encephalitis virus, United Kingdom,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 26, no. 1, pp. 90–96, 2020, doi: 10.3201/eid2601.191085.
 - [54] G. Dobler, “Zoonotic tick-borne flaviviruses,” *Veterinary Microbiology*, vol. 140, no. 3–4, Elsevier, pp. 221–228, 27-Jan-2010, doi: 10.1016/j.vetmic.2009.08.024.
 - [55] Santé Publique France, “Foyer de cas d’encéphalite à tiques liés à la consommation de fromage de chèvre au lait cru dans l’Ain. Point au 19 juin 2020,” 2020. [Online]. Available: <https://www.santepubliquefrance.fr/les-actualites/2020/foyer-de-cas-d-encephalite-a-tiques-lies-a-la-consommation-de-fromage-de-chevre-au-lait-cru-dans-l-ain.-point-au-19-juin-2020>. [Accessed: 16-Nov-2020].
 - [56] Beck C *et al.*, “Virus de l’encéphalite à tique (TBEV) : Mise en évidence de cas humains en France liés à une contamination alimentaire, point sur le cycle de transmission de cette maladie et situation en Europe,” *Plateforme Epidémiosurveillance santé animale*, 28-Sep-2020. [Online]. Available: <https://www.plateforme-esa.fr/article/virus-de-l-encephalite-a-tique-tbev-mise-en-evidence-de-cas-humains-en-france-lies-a-une>. [Accessed: 16-Nov-2020].
 - [57] Haut conseil de la Santé Publique, “Avis relatif à l’inscription de l’encéphalite à tiques sur la liste des maladies à déclaration obligatoire,” 2020.
 - [58] ECDC, “Tick-borne encephalitis - Annual Epidemiological Report for 2018,” 2019. [Online]. Available: <https://www.ecdc.europa.eu/en/publications-data/tick-borne-encephalitis-annual-epidemiological-report-2018>. [Accessed: 16-Apr-2020].
 - [59] J. Beauté, G. Spiteri, E. Warns-Petit, and H. Zeller, “Tick-borne encephalitis in europe, 2012 to 2016,” *Eurosurveillance*, vol. 23, no. 45, p. 1, Nov. 2018, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.45.1800201.
 - [60] J. O’Donovan, *The Economic History of Livestock in Ireland*. Cork: Cork University Press, 1940.
 - [61] J. J. Clark *et al.*, “Population genomics of louping ill virus provide new insights into the evolution of tick-borne flaviviruses,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 14, no. 9, p. e0008133, Sep. 2020, doi: 10.1371/journal.pntd.0008133.
 - [62] G. F. Gao, P. M. A. De Zanotto, E. C. Holmes, H. W. Reid, and E. A. Gould, “Molecular variation, evolution and geographical distribution of louping ill virus,” *Acta Virol.*, vol. 41, no. 5, pp. 259–268, 1997, doi: 10.1016/j.reuma.2008.11.011.
 - [63] J. E. Whitby, S. N. Whitby, A. D. Jennings, J. R. Stephenson, and A. D. T. Barrett, “Nucleotide sequence of the envelope protein of a Turkish isolate of tick-borne encephalitis (TBE) virus is distinct from other viruses of the TBE virus complex,” *J. Gen. Virol.*, vol. 74, no. 5, pp. 921–924, May 1993, doi: 10.1099/0022-1317-74-5-921.
 - [64] L. Gonzalez, H. W. Reid, I. Pow, and J. S. Gilmour, “A disease resembling louping-ill in sheep in the Basque region of Spain,” *Vet. Rec.*, vol. 121, no. 1, pp. 12–13, Jul. 1987, doi: 10.1136/vr.121.1.12.
 - [65] A. Balseiro *et al.*, “Louping ILL in goats, Spain, 2011,” *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 18, no. 6, pp. 976–

978, Jun. 2012, doi: 10.3201/eid1806.120220.

- [66] A. Papa, V. Pavlidou, and A. Antoniadis, "Greek goat encephalitis virus strain isolated from *Ixodes ricinus*, Greece," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 14, no. 2, pp. 330–332, 2008, doi: 10.3201/eid1402.070889.
- [67] P. Simmonds *et al.*, "ICTV virus taxonomy profile: Flaviviridae," *J. Gen. Virol.*, vol. 98, no. 1, pp. 2–3, Jan. 2017, doi: 10.1099/jgv.0.000672.
- [68] Y. Bertrand, M. Töpel, A. Elväng, W. Melik, and M. Johansson, "First dating of a recombination event in mammalian tick-borne flaviviruses," *PLoS One*, vol. 7, no. 2, pp. 1–12, 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0031981.
- [69] P. Norberg, A. Roth, and T. Bergström, "Genetic recombination of tick-borne flaviviruses among wild-type strains," *Virology*, vol. 440, no. 2, pp. 105–116, 2013, doi: 10.1016/j.virol.2013.02.017.
- [70] P. M. Jensen, S. Skarphedinsson, and A. Semenov, "Densities of the tick (*Ixodes ricinus*) and coexistence of the Louping ill virus and tick borne encephalitis on the island of Bornholm," *Ugeskr. Laeger*, vol. 166, no. 26–31, pp. 2563–5, Jun. 2004.
- [71] C. L. Jeffries *et al.*, "Louping ill virus: An endemic tick-borne disease of Great Britain," *J. Gen. Virol.*, vol. 95, no. PART 5, pp. 1005–1014, 2014, doi: 10.1099/vir.0.062356-0.
- [72] T. M. Rivers and F. F. Schwenker, "Louping ill in Man," *J. Exp. Med.*, vol. 59, no. 5, pp. 669–85, 1934, doi: 10.1084/jem.59.5.669.
- [73] M. M. Davidson, H. Williams, and J. A. J. Macleod, "Louping ill in man: A forgotten disease," *J. Infect.*, vol. 23, no. 3, pp. 241–249, Nov. 1991, doi: 10.1016/0163-4453(91)92756-U.
- [74] Public Health England, "[ARCHIVED CONTENT] HPA - General Information," 2011. [Online]. Available: <https://webarchive.nationalarchives.gov.uk/20140714090003/http://www.hpa.org.uk/Topics/InfectiousDiseases/InfectionsAZ/LoupingIll/GeneralInformation/>. [Accessed: 08-Apr-2020].
- [75] P. G. E. Kennedy, P. L. Quan, and W. I. Lipkin, "Viral encephalitis of unknown cause: Current perspective and recent advances," *Viruses*, vol. 9, no. 6. MDPI AG, 01-Jun-2017, doi: 10.3390/v9060138.
- [76] E. Dorko *et al.*, "Milk outbreaks of tick-borne encephalitis in Slovakia, 2012–2016," *Cent. Eur. J. Public Health*, vol. 26, pp. S47–S50, Dec. 2018, doi: 10.21101/cejph.a5272.
- [77] S. O. Brockmann *et al.*, "A cluster of two human cases of tick-borne encephalitis (TBE) transmitted by unpasteurised goat milk and cheese in Germany, May 2016," *Eurosurveillance*, vol. 23, no. 15, Apr. 2018, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.15.17-00336.
- [78] M. Labuda *et al.*, "Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission," *Virology*, vol. 219, no. 2, pp. 357–366, May 1996, doi: 10.1006/viro.1996.0261.
- [79] S. J. L. Wu *et al.*, "Human skin Langerhans cells are targets of dengue virus infection," *Nat. Med.*, vol. 6, no. 7, pp. 816–820, Jul. 2000, doi: 10.1038/77553.
- [80] M. Haglund and G. Günther, "Tick-borne encephalitis - Pathogenesis, clinical course and long-term follow-up," *Vaccine*, vol. 21, no. SUPPL. 1. Elsevier BV, pp. S11–S18, 01-Apr-2003, doi: 10.1016/S0264-410X(02)00811-3.
- [81] E. Gelpi, M. Preusser, F. Garzuly, H. Holzmann, F. X. Heinz, and H. Budka, "Visualization of central European tick-borne encephalitis infection in fatal human cases," *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, vol. 64, no. 6, pp. 506–512, 2005, doi: 10.1093/jnen/64.6.506.
- [82] D. Růžek *et al.*, "CD8+ T-cells mediate immunopathology in tick-borne encephalitis," *Virology*,

- vol. 384, no. 1, pp. 1–6, Feb. 2009, doi: 10.1016/j.virol.2008.11.023.
- [83] T. J. Chambers and M. S. Diamond, "Pathogenesis of flavivirus encephalitis," *Adv. Virus Res.*, vol. 60, pp. 273–342, 2003, doi: 10.1016/S0065-3527(03)60008-4.
 - [84] E. Kindberg *et al.*, "A deletion in the chemokine receptor 5 (CCR5) gene is associated with tickborne encephalitis," *J. Infect. Dis.*, vol. 197, no. 2, pp. 266–269, Jan. 2008, doi: 10.1086/524709.
 - [85] M. Holub, Z. Klučková, O. Beran, V. Aster, and A. Lobovská, "Lymphocyte subset numbers in cerebrospinal fluid: Comparison of tick-borne encephalitis and neuroborreliosis," *Acta Neurol. Scand.*, vol. 106, no. 5, pp. 302–308, Nov. 2002, doi: 10.1034/j.1600-0404.2002.01314.x.
 - [86] H. Holzmann, "Diagnosis of tick-borne encephalitis," *Vaccine*, vol. 21, no. SUPPL. 1, pp. S36–S40, Apr. 2003, doi: 10.1016/S0264-410X(02)00819-8.
 - [87] The Center for Food Security & Public Health, "Louping Ill," 2020. [Online]. Available: <http://www.cfsph.iastate.edu/DiseaseInfo/disease.php?name=louping-ill&lang=en>. [Accessed: 22-Oct-2020].
 - [88] Dagleish Mark P., "Louping Ill in Animals," *Merck Vet. Man.*, Apr. 2020.
 - [89] P. Bogovic, "Tick-borne encephalitis: A review of epidemiology, clinical characteristics, and management," *World J. Clin. Cases*, vol. 3, no. 5, p. 430, May 2015, doi: 10.12998/wjcc.v3.i5.430.
 - [90] T. S. Gritsun, P. A. Nuttall, and E. A. Gould, "Tick-Borne Flaviviruses," *Adv. Virus Res.*, vol. 61, pp. 317–371, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0065-3527(03)61008-0.
 - [91] S. Du Four, R. Mertens, W. Wiels, J. De Keyser, V. Bissay, and A. Flamez, "Meningoencephaloradiculitis following infection with tick borne encephalitis virus: case report and review of the literature," *Acta Neurol. Belg.*, vol. 118, no. 1, pp. 93–96, Mar. 2018, doi: 10.1007/s13760-017-0873-9.
 - [92] K. L. Mansfield, N. Johnson, L. P. Phipps, J. R. Stephenson, A. R. Fooks, and T. Solomon, "Tick-borne encephalitis virus - A review of an emerging zoonosis," *Journal of General Virology*, vol. 90, no. 8. Microbiology Society, pp. 1781–1794, 01-Aug-2009, doi: 10.1099/vir.0.011437-0.
 - [93] T. S. Gritsun *et al.*, "Characterization of a Siberian Virus Isolated from a Patient with Progressive Chronic Tick-Borne Encephalitis," *J. Virol.*, vol. 77, no. 1, pp. 25–36, Jan. 2003, doi: 10.1128/jvi.77.1.25-36.2003.
 - [94] H. Williams and H. Thorburn, "Serum antibodies to louping-ill virus," *Scott. Med. J.*, vol. 7, pp. 353–355, Aug. 1962, doi: 10.1177/003693306200700803.
 - [95] J. H. Lawson, W. G. Manderson, and E. Weston Hurst, "LOUPING-ILL MENINGO-ENCEPHALITIS A FURTHER CASE AND A SEROLOGICAL SURVEY," *Lancet*, vol. 254, no. 6581, pp. 696–699, Oct. 1949, doi: 10.1016/S0140-6736(49)91328-8.
 - [96] J. Walkington, M. Hulgur, D. Yates, and C. A. Eynon, "A Case of Refractory Seizures Caused by an Unusual Zoonosis," *J. Intensive Care Soc.*, vol. 14, no. 1, pp. 65–66, Jan. 2013, doi: 10.1177/175114371301400113.
 - [97] K. M. Paulsen *et al.*, "Tick-borne encephalitis virus in cows and unpasteurized cow milk from Norway," *Zoonoses Public Health*, vol. 66, no. 2, pp. 216–222, Mar. 2019, doi: 10.1111/zph.12554.
 - [98] E. Cisak, A. Wójcik-Fatla, V. Zając, J. Sroka, A. Buczek, and J. Dutkiewicz, "Prevalence of tick-borne encephalitis virus (TBEV) in samples of raw milk taken randomly from cows, goats and sheep in eastern Poland," *Ann. Agric. Environ. Med.*, vol. 17, pp. 283–286, 2010.

- [99] M. Gresikova and J. Rehacek, "Isolation of the tick encephalitis virus from the blood and milk of domestic animals (sheep and cow) after infection by ticks of the family *Ixodes ricinus*," *Arch. Gesamte Virusforsch.*, vol. 9, pp. 360–4, 1959.
- [100] C. Kiffner, T. Vor, P. Hagedorn, M. Niedrig, and F. Rühe, "Determinants of tick-borne encephalitis virus antibody presence in roe deer (*Capreolus capreolus*) sera," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 26, no. 1, pp. 18–25, Mar. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2915.2011.00961.x.
- [101] J. Nosek, O. Kozuch, E. Ernek, and M. Lichard, "The importance of goats in the maintenance tick-borne encephalitis virus in nature," *Acta Virol.*, vol. 11, no. 5, pp. 470–2, Sep. 1967.
- [102] A. Wallenhammar *et al.*, "Revealing new tick-borne encephalitis virus foci by screening antibodies in sheep milk," *Parasites and Vectors*, vol. 13, no. 1, p. 185, Apr. 2020, doi: 10.1186/s13071-020-04030-4.
- [103] J. Salat, A. D. Mihalca, M. Mihaiu, D. Modrý, and D. Ruzek, "Tick-borne encephalitis in sheep, Romania," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 23, no. 12, pp. 2065–2067, Dec. 2017, doi: 10.3201/eid2312.170166.
- [104] L. Markovinić *et al.*, "An outbreak of tick-borne encephalitis associated with raw goat milk and cheese consumption, Croatia, 2015," *Infection*, vol. 44, no. 5, pp. 661–665, Oct. 2016, doi: 10.1007/s15010-016-0917-8.
- [105] H. Weissenböck, A. Suchy, and H. Holzmann, "Tick-borne encephalitis in dogs: Neuropathological findings and distribution of antigen," *Acta Neuropathol.*, vol. 95, no. 4, pp. 361–366, 1998, doi: 10.1007/s004010050811.
- [106] M. W. Leschnik, G. C. Kirtz, and J. G. Thalhammer, "Tick-borne encephalitis (TBE) in dogs," *International Journal of Medical Microbiology*, vol. 291, pp. 66–69, 2002, doi: 10.1016/S1438-4221(02)80014-5.
- [107] J. O. Rushton, S. Lecollinet, Z. Hubálek, P. Svobodová, H. Lussy, and N. Nowotny, "Tick-borne encephalitis virus in horses, Austria, 2011," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 19, no. 4, pp. 635–637, Apr. 2013, doi: 10.3201/eid1904.121450.
- [108] J. Süss *et al.*, "Tickborne encephalitis in naturally exposed monkey (*Macaca sylvanus*)," *Emerg. Infect. Dis.*, vol. 13, no. 6, pp. 905–907, 2007, doi: 10.3201/eid1306.061173.
- [109] W. Zindel and R. Wyler, "[Tick-borne encephalitis in a goat in lower Prätigau].," *Schweiz. Arch. Tierheilkd.*, vol. 125, no. 6, pp. 383–6, Jun. 1983.
- [110] Z. Bagó, B. Bauder, J. Kolodziejek, N. Nowotny, and H. Weissenböck, "Tickborne encephalitis in a mouflon (*Ovis ammon musimon*).," *Vet. Rec.*, vol. 150, no. 7, pp. 218–20, Feb. 2002, doi: 10.1136/vr.150.7.218.
- [111] B. Böhm *et al.*, "Tick-borne encephalitis in a naturally infected sheep," *BMC Vet. Res.*, vol. 13, no. 1, p. 267, 2017, doi: 10.1186/s12917-017-1192-3.
- [112] H. Reid, "Overview of Louping Ill," Dec-2013. [Online]. Available: <https://www.msddvetmanual.com/nervous-system/louping-ill/overview-of-louping-ill>. [Accessed: 23-Apr-2020].
- [113] K. M. G. Adam, S. J. Beasley, and D. A. Blewett, "The occurrence of antibody to *Babesia* and to the virus of louping-ill in deer in Scotland," *Res. Vet. Sci.*, vol. 23, no. 2, pp. 133–138, Sep. 1977, doi: 10.1016/S0034-5288(18)33144-8.
- [114] D. F. Twomey, M. P. Cranwell, H. W. Reid, and J. F. Tan, "Louping ill on Dartmoor.," *Vet. Rec.*, vol. 149, no. 22, p. 687, Dec. 2001.
- [115] L. Gilbert, L. D. Jones, M. K. Laurenson, E. A. Gould, H. W. Reid, and P. J. Hudson, "Ticks need

- not bite their red grouse hosts to infect them with louping ill virus.," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 271, no. Liv, pp. S202–S205, 2004, doi: 10.1098/rsbl.2003.0147.
- [116] R. Lani, E. Moghaddam, A. Haghani, L.-Y. Chang, S. AbuBakar, and K. Zandi, "Tick-borne viruses: A review from the perspective of therapeutic approaches," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 5, no. 5, pp. 457–465, Sep. 2014, doi: 10.1016/J.TTBDIS.2014.04.001.
 - [117] Duniewicz M and Kulková H, "Corticoids in the therapy of thick- and other type of viral meningoencephalitis," *MMW Munch Med Wochenschr*, vol. 124, no. 3, pp. 69–70, Jan. 1982.
 - [118] R. Bologheanu *et al.*, "Unexpected complete recovery of a patient with severe tick-borne encephalitis treated with favipiravir," *Antiviral Res.*, vol. 184, Dec. 2020, doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104952.
 - [119] D. Růžek, G. Dobler, and H. H. Niller, "May early intervention with high dose intravenous immunoglobulin pose a potentially successful treatment for severe cases of tick-borne encephalitis?," *BMC Infect. Dis.*, vol. 13, no. 1, Jul. 2013, doi: 10.1186/1471-2334-13-306.
 - [120] J. Elsterova, M. Palus, J. Sirmarova, J. Kopecky, H. H. Niller, and D. Ruzek, "Tick-borne encephalitis virus neutralization by high dose intravenous immunoglobulin," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 8, no. 2, pp. 253–258, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.11.007.
 - [121] A. B. Konkova-Reidman and L. I. Ratnikova, "Neuroimmune aspects of the pathogenesis and nitric oxide negative effects modifying the pathogenetic treatment of tick-borne infections," *Zhurnal Nevrol. i Psihiatr. Im. S.S. Korsakova*, vol. 112, no. 2, pp. 40–45, 2012.
 - [122] Y. V. Abramenko, "The assessment of the clinical efficacy, vasoactive and metabolic effects of mexidol in elderly patients with discirculatory encephalopathy," *Zhurnal Nevrol. i Psihiatr. Im. S.S. Korsakova*, vol. 111, no. 11, pp. 35–41, Jan. 2011.
 - [123] Skripchenko NV and Egorova ES, "Cytoflavin in the complex treatment of neuroinfections in children," *Zh Nevrol Psikhiatr Im S S Korsakova*, vol. 111, no. 9, pp. 28–31, 2011.
 - [124] D. I. Osolodkin *et al.*, "Inhibitors of tick-borne flavivirus reproduction from structure-based virtual screening," *ACS Med. Chem. Lett.*, vol. 4, no. 9, pp. 869–874, Sep. 2013, doi: 10.1021/ml400226s.
 - [125] U. Klockmann, K. Křivanec, J. R. Stephenson, and J. Hilfenhaus, "Protection against European isolates of tick-borne encephalitis virus after vaccination with a new tick-borne encephalitis vaccine," *Vaccine*, vol. 9, no. 3, pp. 210–212, 1991, doi: 10.1016/0264-410X(91)90157-2.
 - [126] G. N. Leonova and E. V. Pavlenko, "Characterization of neutralizing antibodies to Far Eastern of tick-borne encephalitis virus subtype and the antibody avidity for four tick-borne encephalitis vaccines in human," *Vaccine*, vol. 27, no. 21, pp. 2899–2904, May 2009, doi: 10.1016/j.vaccine.2009.02.069.
 - [127] K. K. Orlinger *et al.*, "A tick-borne encephalitis virus vaccine based on the European prototype strain induces broadly reactive cross-neutralizing antibodies in humans," *J. Infect. Dis.*, vol. 203, no. 11, pp. 1556–1564, Jun. 2011, doi: 10.1093/infdis/jir122.
 - [128] C. Klaus, U. Ziegler, D. Kalthoff, B. Hoffmann, and M. Beer, "Tick-borne encephalitis virus (TBEV) - findings on cross reactivity and longevity of TBEV antibodies in animal sera," *BMC Vet. Res.*, vol. 10, Apr. 2014, doi: 10.1186/1746-6148-10-78.
 - [129] K. L. Mansfield *et al.*, "Flavivirus-induced antibody cross-reactivity," *J. Gen. Virol.*, vol. 92, no. 12, pp. 2821–2829, Dec. 2011, doi: 10.1099/vir.0.031641-0.
 - [130] F. X. Heinz, H. Holzmann, A. Essl, and M. Kundi, "Field effectiveness of vaccination against tick-borne encephalitis," *Vaccine*, vol. 25, no. 43, pp. 7559–7567, Oct. 2007, doi: 10.1016/j.vaccine.2007.08.024.

- [131] Schwartz B, "Health economics of early summer meningoencephalitis in Austria. Effects of a vaccination campaign 1981 to 1990," *Wien Med Wochenschr*, 1993.
- [132] J. Salat *et al.*, "Tick-Borne Encephalitis Virus Vaccines Contain Non-Structural Protein 1 Antigen and May Elicit NS1-Specific Antibody Responses in Vaccinated Individuals," *Vaccines*, vol. 8, no. 1, p. 81, Feb. 2020, doi: 10.3390/vaccines8010081.
- [133] G. Wengler, G. Wengler, and H. J. Gross, "Studies on virus-specific nucleic acids synthesized in vertebrate and mosquito cells infected with flaviviruses," *Virology*, vol. 89, no. 2, pp. 423–437, 1978, doi: 10.1016/0042-6822(78)90185-X.
- [134] J. M. Smit, B. Moesker, I. Rodenhuis-Zybert, and J. Wilschut, "Flavivirus cell entry and membrane fusion," *Viruses*, vol. 3, no. 2, pp. 160–171, Feb. 2011, doi: 10.3390/v3020160.
- [135] M. Perera-Lecoin, L. Meertens, X. Carnec, and A. Amara, "Flavivirus entry receptors: An update," *Viruses*, vol. 6, no. 1. Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI), pp. 69–88, 30-Dec-2013, doi: 10.3390/v6010069.
- [136] S. J. Robertson, D. N. Mitzel, R. T. Taylor, S. M. Best, and M. E. Bloom, "Tick-borne flaviviruses: Dissecting host immune responses and virus countermeasures," *Immunologic Research*, vol. 43, no. 1–3. NIH Public Access, pp. 172–186, 2009, doi: 10.1007/s12026-008-8065-6.
- [137] G. Cheng *et al.*, "A C-Type Lectin Collaborates with a CD45 Phosphatase Homolog to Facilitate West Nile Virus Infection of Mosquitoes," *Cell*, vol. 142, no. 5, pp. 714–725, Sep. 2010, doi: 10.1016/j.cell.2010.07.038.
- [138] A. Kuadkitkan, N. Wikan, C. Fongsaran, and D. R. Smith, "Identification and characterization of prohibitin as a receptor protein mediating DENV-2 entry into insect cells," *Virology*, vol. 406, no. 1, pp. 149–161, Oct. 2010, doi: 10.1016/j.virol.2010.07.015.
- [139] H. Kroschewski, S. L. Allison, F. X. Heinz, and C. W. Mandl, "Role of heparan sulfate for attachment and entry of tick-borne encephalitis virus," *Virology*, vol. 308, no. 1, pp. 92–100, Mar. 2003, doi: 10.1016/S0042-6822(02)00097-1.
- [140] B. Tassaneetrithep *et al.*, "DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells," *J. Exp. Med.*, vol. 197, no. 7, pp. 823–829, Apr. 2003, doi: 10.1084/jem.20021840.
- [141] P. Sakoonwatanyoo, V. Boonsanay, and D. R. Smith, "Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein," *Intervirology*, vol. 49, no. 3, pp. 161–172, Jan. 2006, doi: 10.1159/000089377.
- [142] L. Meertens *et al.*, "The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry," *Cell Host Microbe*, vol. 12, no. 4, pp. 544–557, Oct. 2012, doi: 10.1016/j.chom.2012.08.009.
- [143] G. Lasso *et al.*, "A Structure-Informed Atlas of Human-Virus Interactions," *Cell*, vol. 178, no. 6, pp. 1526–1541.e16, Sep. 2019, doi: 10.1016/J.CELL.2019.08.005.
- [144] J. Reyes-del Valle, S. Chávez-Salinas, F. Medina, and R. M. del Angel, "Heat Shock Protein 90 and Heat Shock Protein 70 Are Components of Dengue Virus Receptor Complex in Human Cells," *J. Virol.*, vol. 79, no. 8, pp. 4557–4567, Apr. 2005, doi: 10.1128/jvi.79.8.4557-4567.2005.
- [145] R. Fritz, K. Stiasny, and F. X. Heinz, "Identification of specific histidines as pH sensors in flavivirus membrane fusion," *J. Cell Biol.*, vol. 183, no. 2, pp. 353–361, Oct. 2008, doi: 10.1083/jcb.200806081.
- [146] S. L. Allison, J. Schlich, K. Stiasny, C. W. Mandl, C. Kunz, and F. X. Heinz, "Oligomeric rearrangement of tick-borne encephalitis virus envelope proteins induced by an acidic pH.," *J. Virol.*, vol. 69, no. 2, pp. 695–700, 1995, doi: 10.1128/jvi.69.2.695-700.1995.

- [147] B. D. Lindenbach and C. M. Rice, "Molecular biology of flaviviruses," *Adv. Virus Res.*, vol. 59, pp. 23–61, Jan. 2003, doi: 10.1016/S0065-3527(03)59002-9.
- [148] C. W. Mandl, F. X. Heinz, E. Stöckl, and C. Kunz, "Genome sequence of tick-borne encephalitis virus (Western subtype) and comparative analysis of nonstructural proteins with other flaviviruses," *Virology*, vol. 173, no. 1, pp. 291–301, Nov. 1989, doi: 10.1016/0042-6822(89)90246-8.
- [149] I. Ferlenghi *et al.*, "Molecular organization of a recombinant subviral particle from tick-borne encephalitis virus," *Mol. Cell*, vol. 7, no. 3, pp. 593–602, Mar. 2001, doi: 10.1016/S1097-2765(01)00206-4.
- [150] L. Ma, C. T. Jones, T. D. Groesch, R. J. Kuhn, and C. B. Post, "Solution structure of dengue virus capsid protein reveals another fold," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 10, pp. 3414–3419, Mar. 2004, doi: 10.1073/pnas.0305892101.
- [151] T. Dokland, M. Walsh, J. M. Mackenzie, A. A. Khromykh, K. H. Ee, and S. Wang, "West Nile virus core protein: Tetramer structure and ribbon formation," *Structure*, vol. 12, no. 7, pp. 1157–1163, Jul. 2004, doi: 10.1016/j.str.2004.04.024.
- [152] R. M. Kofler, F. X. Heinz, and C. W. Mandl, "Capsid Protein C of Tick-Borne Encephalitis Virus Tolerates Large Internal Deletions and Is a Favorable Target for Attenuation of Virulence," *J. Virol.*, vol. 76, no. 7, pp. 3534–3543, Apr. 2002, doi: 10.1128/jvi.76.7.3534-3543.2002.
- [153] T. Nowak, P. M. Färber, G. Wengler, and G. Wengler, "Analyses of the terminal sequences of west nile virus structural proteins and of the in vitro translation of these proteins allow the proposal of a complete scheme of the proteolytic cleavages involved in their synthesis," *Virology*, vol. 169, no. 2, pp. 365–376, 1989, doi: 10.1016/0042-6822(89)90162-1.
- [154] F. X. Heinz and S. L. Allison, "The machinery for flavivirus fusion with host cell membranes," *Current Opinion in Microbiology*, vol. 4, no. 4. Elsevier Ltd, pp. 450–455, 01-Aug-2001, doi: 10.1016/S1369-5274(00)00234-4.
- [155] K. Stadler, S. L. Allison, J. Schlich, and F. X. Heinz, "Proteolytic activation of tick-borne encephalitis virus by furin," *J. Virol.*, vol. 71, no. 11, pp. 8475–8481, 1997, doi: 10.1128/jvi.71.11.8475-8481.1997.
- [156] S. Bressanelli *et al.*, "Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation," *EMBO J.*, vol. 23, no. 4, pp. 728–738, Feb. 2004, doi: 10.1038/sj.emboj.7600064.
- [157] S. Mukhopadhyay, R. J. Kuhn, and M. G. Rossmann, "A structural perspective of the Flavivirus life cycle," *Nature Reviews Microbiology*, vol. 3, no. 1. pp. 13–22, Jan-2005, doi: 10.1038/nrmicro1067.
- [158] S. Bhardwaj, M. Holbrook, R. E. Shope, A. D. T. Barrett, and S. J. Watowich, "Biophysical Characterization and Vector-Specific Antagonist Activity of Domain III of the Tick-Borne Flavivirus Envelope Protein," *J. Virol.*, vol. 75, no. 8, pp. 4002–4007, Apr. 2001, doi: 10.1128/jvi.75.8.4002-4007.2001.
- [159] F. A. Rey, F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, and S. C. Harrison, "The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution," *Nature*, vol. 375, no. 6529, pp. 291–298, 1995, doi: 10.1038/375291a0.
- [160] Y. Modis, S. Ogata, D. Clements, and S. C. Harrison, "A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 100, no. 12, pp. 6986–6991, Jun. 2003, doi: 10.1073/pnas.0832193100.
- [161] T. J. Chambers, D. W. McCourt, and C. M. Rice, "Production of yellow fever virus proteins in

- infected cells: Identification of discrete polyprotein species and analysis of cleavage kinetics using region-specific polyclonal antisera," *Virology*, vol. 177, no. 1, pp. 159–174, 1990, doi: 10.1016/0042-6822(90)90470-C.
- [162] B. Falgout and L. Markoff, "Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum.," *J. Virol.*, vol. 69, no. 11, pp. 7232–7243, 1995, doi: 10.1128/jvi.69.11.7232-7243.1995.
- [163] P. W. Mason, "Maturation of Japanese encephalitis virus glycoproteins produced by infected mammalian and mosquito cells," *Virology*, vol. 169, no. 2, pp. 354–364, 1989, doi: 10.1016/0042-6822(89)90161-X.
- [164] G. Winkler, V. B. Randolph, G. R. Cleaves, T. E. Ryan, and V. Stollar, "Evidence that the mature form of the flavivirus nonstructural protein NS1 is a dimer," *Virology*, vol. 162, no. 1, pp. 187–196, Jan. 1988, doi: 10.1016/0042-6822(88)90408-4.
- [165] A. J. Crooks, J. M. Lee, A. B. Dowsett, and J. R. Stephenson, "Purification and analysis of infectious virions and native non-structural antigens from cells infected with tick-borne encephalitis virus.," *J. Chromatogr.*, vol. 502, no. 1, pp. 59–68, Feb. 1990, doi: 10.1016/S0021-9673(01)89563-7.
- [166] S. C. Jacobs, J. R. Stephenson, and G. W. Wilkinson, "High-level expression of the tick-borne encephalitis virus NS1 protein by using an adenovirus-based vector: protection elicited in a murine model.," *J. Virol.*, vol. 66, no. 4, pp. 2086–2095, 1992, doi: 10.1128/jvi.66.4.2086-2095.1992.
- [167] J. M. Mackenzie, M. K. Jones, and P. R. Young, "Immunolocalization of the Dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication," *Virology*, vol. 220, no. 1, pp. 232–240, Jun. 1996, doi: 10.1006/viro.1996.0307.
- [168] J. M. MacKenzie, A. A. Khromykh, M. K. Jones, and E. G. Westaway, "Subcellular localization and some biochemical properties of the flavivirus Kunjin nonstructural proteins NS2A and NS4A," *Virology*, vol. 245, no. 2, pp. 203–215, Jun. 1998, doi: 10.1006/viro.1998.9156.
- [169] J. Y. Leung, G. P. Pijlman, N. Kondratieva, J. Hyde, J. M. Mackenzie, and A. A. Khromykh, "Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly," *J. Virol.*, vol. 82, no. 10, pp. 4731–4741, May 2008, doi: 10.1128/jvi.00002-08.
- [170] B. Falgout, M. Pethel, Y. M. Zhang, and C. J. Lai, "Both nonstructural proteins NS2B and NS3 are required for the proteolytic processing of dengue virus nonstructural proteins.," *J. Virol.*, vol. 65, no. 5, pp. 2467–2475, 1991, doi: 10.1128/jvi.65.5.2467-2475.1991.
- [171] T. J. Chambers, A. Nestorowicz, S. M. Amberg, and C. M. Rice, "Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B protein: effects on proteolytic processing, NS2B-NS3 complex formation, and viral replication.," *J. Virol.*, vol. 67, no. 11, pp. 6797–807, Nov. 1993.
- [172] S. Clum, K. E. Ebner, and R. Padmanabhan, "Cotranslational membrane insertion of the serine proteinase precursor NS2B-NS3(Pro) of dengue virus type 2 is required for efficient in vitro processing and is mediated through the hydrophobic regions of NS2B," *J. Biol. Chem.*, vol. 272, no. 49, pp. 30715–30723, Dec. 1997, doi: 10.1074/jbc.272.49.30715.
- [173] G. Wengler and G. Wengler, "The carboxy-terminal part of the NS 3 protein of the West Nile Flavivirus can be isolated as a soluble protein after proteolytic cleavage and represents an RNA-stimulated NTPase," *Virology*, vol. 184, no. 2, pp. 707–715, 1991, doi: 10.1016/0042-6822(91)90440-M.
- [174] G. Wengler and G. Wengler, "The NS 3 nonstructural protein of flaviviruses contains an RNA triphosphatase activity," *Virology*, vol. 197, no. 1, pp. 265–273, Nov. 1993, doi: 10.1006/viro.1993.1587.

- [175] C. G. Patkar and R. J. Kuhn, "Yellow Fever Virus NS3 Plays an Essential Role in Virus Assembly Independent of Its Known Enzymatic Functions," *J. Virol.*, vol. 82, no. 7, pp. 3342–3352, Apr. 2008, doi: 10.1128/jvi.02447-07.
- [176] T. J. Chambers *et al.*, "Evidence that the N-terminal domain of nonstructural protein NS3 from yellow fever virus is a serine protease responsible for site-specific cleavages in the viral polyprotein," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 87, no. 22, pp. 8898–8902, 1990, doi: 10.1073/pnas.87.22.8898.
- [177] S. M. Amberg, A. Nestorowicz, D. W. McCourt, and C. M. Rice, "NS2B-3 proteinase-mediated processing in the yellow fever virus structural region: in vitro and in vivo studies," *J. Virol.*, vol. 68, no. 6, pp. 3794–3802, 1994, doi: 10.1128/jvi.68.6.3794-3802.1994.
- [178] C. Lin, T. J. Chambers, and C. M. Rice, "Mutagenesis of conserved residues at the yellow fever virus 3/4A and 4B/5 dibasic cleavage sites: Effects on cleavage efficiency and polyprotein processing," *Virology*, vol. 192, no. 2, pp. 596–604, Feb. 1993, doi: 10.1006/viro.1993.1076.
- [179] S. Miller, S. Kastner, J. Krijnse-Locker, S. Bühler, and R. Bartenschlager, "The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner," *J. Biol. Chem.*, vol. 282, no. 12, pp. 8873–8882, Mar. 2007, doi: 10.1074/jbc.M609919200.
- [180] J. Roosendaal, E. G. Westaway, A. Khromykh, and J. M. Mackenzie, "Regulated Cleavages at the West Nile Virus NS4A-2K-NS4B Junctions Play a Major Role in Rearranging Cytoplasmic Membranes and Golgi Trafficking of the NS4A Protein," *J. Virol.*, vol. 80, no. 9, pp. 4623–4632, May 2006, doi: 10.1128/jvi.80.9.4623-4632.2006.
- [181] J. E. McLean, A. Wudzinska, E. Datan, D. Quaglino, and Z. Zakeri, "Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication," *J. Biol. Chem.*, vol. 286, no. 25, pp. 22147–22159, Jun. 2011, doi: 10.1074/jbc.M110.192500.
- [182] C. Lin, S. M. Amberg, T. J. Chambers, and C. M. Rice, "Cleavage at a novel site in the NS4A region by the yellow fever virus NS2B-3 proteinase is a prerequisite for processing at the downstream 4A/4B signalase site," *J. Virol.*, vol. 67, no. 4, pp. 2327–2335, 1993, doi: 10.1128/jvi.67.4.2327-2335.1993.
- [183] E. G. Westaway, A. A. Khromykh, M. T. Kenney, J. M. MacKenzie, and M. K. Jones, "Proteins C and NS4B of the flavivirus kunjin translocate independently into the nucleus," *Virology*, vol. 234, no. 1, pp. 31–41, Jul. 1997, doi: 10.1006/viro.1997.8629.
- [184] J. L. Muñoz-Jordán *et al.*, "Inhibition of Alpha/Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses," *J. Virol.*, vol. 79, no. 13, pp. 8004–8013, Jul. 2005, doi: 10.1128/jvi.79.13.8004-8013.2005.
- [185] A. D. Davidson, "Chapter 2 New Insights into Flavivirus Nonstructural Protein 5," *Advances in Virus Research*, vol. 74, pp. 41–101, 2009, doi: 10.1016/S0065-3527(09)74002-3.
- [186] B. Selisko, C. Wang, E. Harris, and B. Canard, "Regulation of Flavivirus RNA synthesis and replication," *Current Opinion in Virology*, vol. 9, Elsevier, pp. 74–83, 2014, doi: 10.1016/j.coviro.2014.09.011.
- [187] L. Miorin, P. Maiuri, V. M. Hoenninger, C. W. Mandl, and A. Marcello, "Spatial and temporal organization of tick-borne encephalitis flavivirus replicated RNA in living cells," *Virology*, vol. 379, no. 1, pp. 64–77, 2008, doi: 10.1016/j.virol.2008.06.025.
- [188] P. Y. Shi, "Unraveling a flavivirus enigma," *Science*, vol. 343, no. 6173, American Association for the Advancement of Science, pp. 849–850, 21-Feb-2014, doi: 10.1126/science.1251249.
- [189] M. A. Garcia-Blanco, S. G. Vasudevan, S. S. Bradrick, and C. Nicchitta, "Flavivirus RNA

- transactions from viral entry to genome replication," *Antiviral Research*, vol. 134. Elsevier B.V., pp. 244–249, 01-Oct-2016, doi: 10.1016/j.antiviral.2016.09.010.
- [190] V. J. Klema, R. Padmanabhan, and K. H. Choi, "Flaviviral replication complex: Coordination between RNA synthesis and 5'-RNA capping," *Viruses*, vol. 7, no. 8. MDPI AG, pp. 4640–4656, 13-Aug-2015, doi: 10.3390/v7082837.
- [191] P. W. G. Chu and E. G. Westaway, "Replication strategy of Kunjin Virus: Evidence for recycling role of replicative form RNA as template in semiconservative and asymmetric replication," *Virology*, vol. 140, no. 1, pp. 68–79, Jan. 1985, doi: 10.1016/0042-6822(85)90446-5.
- [192] S. Elshuber, S. L. Allison, F. X. Heinz, and C. W. Mandl, "Cleavage of protein prM is necessary for infection of BHK-21 cells by tick-borne encephalitis virus," *Journal of General Virology*, vol. 84, no. 1. J Gen Virol, pp. 183–191, 01-Jan-2003, doi: 10.1099/vir.0.18723-0.
- [193] F. Guirakhoo, F. X. Heinz, C. W. Mandl, H. Holzmann, and C. Kunz, "Fusion activity of flaviviruses: Comparison of mature and immature (prM-containing) tick-borne encephalitis virions," *J. Gen. Virol.*, vol. 72, no. 6, pp. 1323–1329, 1991, doi: 10.1099/0022-1317-72-6-1323.
- [194] T. C. Pierson and M. S. Diamond, "Degrees of maturity: The complex structure and biology of flaviviruses," *Current Opinion in Virology*, vol. 2, no. 2. Elsevier B.V., pp. 168–175, 01-Apr-2012, doi: 10.1016/j.coviro.2012.02.011.
- [195] T. J. Chambers, C. S. Hahn, R. Galler, and C. M. Rice, "Flavivirus Genome Organization, Expression, and Replication," *Annu. Rev. Microbiol.*, vol. 44, no. 1, pp. 649–688, Oct. 1990, doi: 10.1146/annurev.mi.44.100190.003245.
- [196] N. Mencke, "Future challenges for parasitology: Vector control and 'One health' in Europe: The veterinary medicinal view on CVBDs such as tick borreliosis, rickettsiosis and canine leishmaniosis," *Vet. Parasitol.*, vol. 195, no. 3–4, pp. 256–271, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.vetpar.2013.04.007.
- [197] F. Dantas-Torres, B. B. Chomel, and D. Otranto, "Ticks and tick-borne diseases: A One Health perspective," *Trends in Parasitology*, vol. 28, no. 10. Elsevier, pp. 437–446, 01-Oct-2012, doi: 10.1016/j.pt.2012.07.003.
- [198] L. Grisi *et al.*, "Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil," *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, vol. 23, no. 2, pp. 150–156, Jun. 2014, doi: 10.1590/S1984-29612014042.
- [199] R. I. Rodríguez-Vivas *et al.*, "Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review," *Revista Mexicana De Ciencias Pecuarias*, vol. 8, no. 1. INIFAP-CENID Parasitologia Veterinaria, pp. 61–74, 01-Jan-2017, doi: 10.22319/rmcp.v8i1.4305.
- [200] R. A. Sykes and P. Makiello, "An estimate of Lyme borreliosis incidence in Western Europe," *J. Public Heal. (United Kingdom)*, vol. 39, no. 1, pp. 74–81, Mar. 2017, doi: 10.1093/pubmed/fdw017.
- [201] H. D. Kamp *et al.*, "Design of a broadly reactive Lyme disease vaccine," *npj Vaccines*, vol. 5, no. 1, Dec. 2020, doi: 10.1038/s41541-020-0183-8.
- [202] E. R. Adrion, J. Aucott, K. W. Lemke, and J. P. Weiner, "Health care costs, utilization and patterns of care following lyme disease," *PLoS One*, vol. 10, no. 2, Feb. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0116767.
- [203] A. A. Guglielmone *et al.*, "The argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: A list of valid species names," *Zootaxa*, vol. 2528, no. 2528, pp. 1–28, Jul. 2010, doi: 10.11646/zootaxa.2528.1.1.
- [204] I. G. Horak, J. L. Camicas, and J. E. Keirans, "The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): A world list of valid tick names," in *Experimental and Applied Acarology*, 2002, vol. 28,

no. 1–4, pp. 27–54, doi: 10.1023/A:1025381712339.

- [205] A. Gargili, A. Estrada-Peña, J. R. Spengler, A. Lukashev, P. A. Nuttall, and D. A. Bente, “The role of ticks in the maintenance and transmission of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus: A review of published field and laboratory studies,” *Antiviral Research*, vol. 144. Elsevier B.V., pp. 93–119, 01-Aug-2017, doi: 10.1016/j.antiviral.2017.05.010.
- [206] O. Kahl, “Hard ticks as vectors—some basic issues,” *Wiener Klinische Wochenschrift*, vol. 130, no. 15–16. Springer-Verlag Wien, pp. 479–483, 01-Aug-2018, doi: 10.1007/s00508-018-1360-x.
- [207] W. Reuben Kaufman, “Tick-host interaction: A synthesis of current concepts,” *Parasitology Today*, vol. 5, no. 2. Elsevier, pp. 47–56, 01-Feb-1989, doi: 10.1016/0169-4758(89)90191-9.
- [208] J. Süss, “Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines,” *Vaccine*, vol. 21, no. SUPPL. 1, 2003, doi: 10.1016/S0264-410X(02)00812-5.
- [209] R. D. Mitchell *et al.*, “Infrared light detection by the haller’s organ of adult american dog ticks, *Dermacentor variabilis* (Ixodida: Ixodidae),” *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 8, no. 5, pp. 764–771, Aug. 2017, doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.06.001.
- [210] S. Leonovich, “Sensory systems of parasitic ticks and mites,” 2005.
- [211] Ebel Gregory D and Kramer Laura D, “Short report: duration of tick attachment required for transmission of powassan virus by deer ticks - PubMed,” *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.*, vol. 71, no. 3, pp. 268–271, Jul. 2004.
- [212] L. Eisen, “Pathogen transmission in relation to duration of attachment by *Ixodes scapularis* ticks,” *Ticks and Tick-borne Diseases*, vol. 9, no. 3. Elsevier GmbH, pp. 535–542, 01-Mar-2018, doi: 10.1016/j.ttbdis.2018.01.002.
- [213] P. A. Nuttall, “Molecular characterization of tick-virus interactions,” *Front. Biosci.*, vol. 14, no. 7, pp. 2466–2483, Jan. 2009, doi: 10.2741/3390.
- [214] F. Dantas-Torres, “Climate change, biodiversity, ticks and tick-borne diseases: The butterfly effect,” *Int. J. Parasitol. Parasites Wildl.*, vol. 4, no. 3, pp. 452–461, 2015, doi: 10.1016/j.ijppaw.2015.07.001.
- [215] M. Ličková, S. Fumačová Havlíková, M. Sláviková, M. Slovák, J. F. Drexler, and B. Klempa, “*Dermacentor reticulatus* is a vector of tick-borne encephalitis virus,” *Ticks Tick. Borne. Dis.*, p. 101414, Mar. 2020, doi: 10.1016/j.ttbdis.2020.101414.
- [216] M. Gulia-Nuss *et al.*, “Genomic insights into the *Ixodes scapularis* tick vector of Lyme disease,” *Nat. Commun.*, vol. 7, no. May 2015, 2016, doi: 10.1038/ncomms10507.
- [217] J. F. Anderson, “Epizootiology of Lyme borreliosis,” in *Scandinavian Journal of Infectious Diseases, Supplement*, 1991, vol. 22, no. 77, pp. 23–34.
- [218] A. Dizij and K. Kurtenbach, “*Clethrionomys glareolus*, but not *Apodemus flavicollis*, acquires resistance to *Ixodes ricinus* L, the main European vector of *Borrelia burgdorferi*,” *Parasite Immunol.*, vol. 17, no. 4, pp. 177–183, Apr. 1995, doi: 10.1111/j.1365-3024.1995.tb00887.x.
- [219] E. Kocianová, O. Kozuch, P. Bakoss, J. Reháček, and E. Kováčová, “The prevalence of small terrestrial mammals infected with tick-borne encephalitis virus and leptospirae in the foothills of the southern Bavarian forest, Germany,” *Appl. Parasitol.*, vol. 34, no. 4, pp. 283–290, 1993.
- [220] L. Gilbert, “Louping ill virus in the UK: a review of the hosts, transmission and ecological consequences of control,” *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 68, no. 3, pp. 363–374, 2016, doi: 10.1007/s10493-015-9952-x.
- [221] M. K. Laurenson, R. A. Norman, L. Gilbert, H. W. Reid, and P. J. Hudson, “Identifying disease reservoirs in complex systems: mountain hares as reservoirs of ticks and louping-ill virus,

- pathogens of red grouse," *J. Anim. Ecol.*, vol. 72, no. 1, pp. 177–185, Jan. 2003, doi: 10.1046/j.1365-2656.2003.00688.x.
- [222] M. Imhoff, P. Hagedorn, Y. Schulze, W. Hellenbrand, M. Pfeffer, and M. Niedrig, "Review: Sentinels of tick-borne encephalitis risk," *Ticks and Tick-borne Diseases*, vol. 6, no. 5. Elsevier GmbH, pp. 592–600, 01-Jul-2015, doi: 10.1016/j.ttbdis.2015.05.001.
- [223] H. J. Gerth, D. Grimshandl, B. Stage, G. Döller, and C. Kunz, "Roe deer as sentinels for endemicity of tick-borne encephalitis virus," *Epidemiol. Infect.*, vol. 115, no. 2, pp. 355–365, 1995, doi: 10.1017/S0950268800058477.
- [224] L. Bournez *et al.*, "Exposure of Wild Ungulates to the Usutu and Tick-Borne Encephalitis Viruses in France in 2009–2014: Evidence of Undetected Flavivirus Circulation a Decade Ago," *Viruses*, vol. 12, no. 1, p. 10, Dec. 2019, doi: 10.3390/v12010010.
- [225] J. Süß, C. Schrader, U. Falk, and N. Wohanka, "Tick-borne encephalitis (TBE) in Germany - Epidemiological data, development of risk areas and virus prevalence in field-collected ticks and in ticks removed from humans," in *International Journal of Medical Microbiology, Supplement*, 2004, vol. 293, no. 37, pp. 69–79, doi: 10.1016/S1433-1128(04)80011-1.
- [226] O. A. Belova, L. A. Burenkova, and G. G. Karganova, "Different tick-borne encephalitis virus (TBEV) prevalences in unfed versus partially engorged ixodid ticks - Evidence of virus replication and changes in tick behavior," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 3, no. 4, pp. 240–246, Sep. 2012, doi: 10.1016/j.ttbdis.2012.05.005.
- [227] L. Gilbert, R. Norman, K. M. Laurenson, H. W. Reid, and P. J. Hudson, "Disease persistence and apparent competition in a three-host community: an empirical and analytical study of large-scale, wild populations," *J. Anim. Ecol.*, vol. 70, no. 6, pp. 1053–1061, Nov. 2001, doi: 10.1046/j.0021-8790.2001.00558.x.
- [228] M. K. Laurenson, I. J. Mckendrick, H. W. Reid, R. Challenor, and G. K. Mathewson, "Prevalence, spatial distribution and the effect of control measures on louping-ill virus in the Forest of Bowland, Lancashire," *Epidemiol. Infect.*, vol. 135, no. 6, pp. 963–973, 2007, doi: 10.1017/S0950268806007692.
- [229] D. Newborn and D. Baines, "Enhanced control of sheep ticks in upland sheep flocks: Repercussions for red grouse co-hosts," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 26, no. 1, pp. 63–69, Mar. 2012, doi: 10.1111/j.1365-2915.2011.00989.x.
- [230] P. A. Nuttall, "Pathogen-tick-host interactions: *Borrelia burgdorferi* and TBE virus," in *Zentralblatt für Bakteriologie*, 1999, vol. 289, no. 5–7, pp. 492–505, doi: 10.1016/S0934-8840(99)80002-4.
- [231] P. A. Nuttall and M. Labuda, "Dynamics of infection in tick vectors and at the tick-host interface," *Adv. Virus Res.*, vol. 60, pp. 233–272, 2003, doi: 10.1016/S0065-3527(03)60007-2.
- [232] S. Havlíková, M. Licková, and B. Klempa, "Non-viraemic transmission of tick-borne viruses," *Acta Virol.*, vol. 57, no. 2, pp. 123–129, 2013, doi: 10.4149/av_2013_02_123.
- [233] V. Danielova, J. Holubova, M. Pejcoch, and M. Daniel, "Potential significance of transovarial transmission in the circulation of tick-borne encephalitis virus," *Folia Parasitol. (Praha)*, vol. 49, no. 4, pp. 323–325, Dec. 2002, doi: 10.14411/fp.2002.060.
- [234] M. Labuda, V. Danielova, L. D. Jones, and P. A. Nuttall, "Amplification of tick-borne encephalitis virus infection during co-feeding of ticks," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 7, no. 4, pp. 339–342, Oct. 1993, doi: 10.1111/j.1365-2915.1993.tb00702.x.
- [235] L. D. Jones, C. R. Davies, G. M. Steele, and P. A. Nuttall, "A novel mode of arbovirus transmission involving a nonviremic host," *Science (80-.)*, vol. 237, no. 4816, pp. 775–777, Aug. 1987, doi:

10.1126/science.3616608.

- [236] M. Labuda, L. D. Jones, T. Williams, V. Danielova, and P. A. Nuttall, "Efficient transmission of tick-borne encephalitis virus between cofeeding ticks.," *J. Med. Entomol.*, vol. 30, no. 1, pp. 295–299, Jan. 1993, doi: 10.1093/jmedent/30.1.295.
- [237] L. D. Jones *et al.*, "Transmission of louping ill virus between infected and uninfected ticks co-feeding on mountain hares," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 11, no. 2, pp. 172–176, 1997, doi: 10.1111/j.1365-2915.1997.tb00309.x.
- [238] M. Labuda, O. Kozuch, E. Zuffová, E. Elecková, R. S. Hails, and P. A. Nuttall, "Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts," *Virology*, vol. 235, no. 1, pp. 138–143, Aug. 1997, doi: 10.1006/viro.1997.8622.
- [239] P. A. Nuttall, L. D. Jones, M. Labuda, and W. R. Kaufman, "Adaptations of Arboviruses to Ticks," *J. Med. Entomol.*, vol. 31, no. 1, pp. 1–9, Jan. 1994, doi: 10.1093/jmedent/31.1.1.
- [240] P. A. Nuttall, "Tick saliva and its role in pathogen transmission," *Wien. Klin. Wochenschr.*, pp. 1–12, May 2019, doi: 10.1007/s00508-019-1500-y.
- [241] M. Hackenberg and M. Kotsyfakis, "Exosome-Mediated Pathogen Transmission by Arthropod Vectors," *Trends in Parasitology*, vol. 34, no. 7. Elsevier Ltd, pp. 549–552, 01-Jul-2018, doi: 10.1016/j.pt.2018.04.001.
- [242] W. Reuben Kaufman, "Ticks: Physiological aspects with implications for pathogen transmission," *Ticks and Tick-borne Diseases*, vol. 1, no. 1. Urban & Fischer, pp. 11–22, 01-Mar-2010, doi: 10.1016/j.ttbdis.2009.12.001.
- [243] P. A. Nuttall and M. Labuda, "Saliva-assisted transmission of tick-borne pathogens," in *Ticks: Biology, Disease and Control*, Cambridge University Press, 2008, pp. 205–219.
- [244] M. J. Conway *et al.*, "Mosquito Saliva Serine Protease Enhances Dissemination of Dengue Virus into the Mammalian Host," *J. Virol.*, vol. 88, no. 1, pp. 164–175, Jan. 2014, doi: 10.1128/jvi.02235-13.
- [245] L. Jin *et al.*, "Salivary factor LTRIN from *Aedes aegypti* facilitates the transmission of Zika virus by interfering with the lymphotoxin- β receptor," *Nat. Immunol.*, vol. 19, no. 4, pp. 342–353, Apr. 2018, doi: 10.1038/s41590-018-0063-9.
- [246] J. M. C. Ribeiro, "Role of Saliva in Blood-Feeding by Arthropods," *Annu. Rev. Entomol.*, vol. 32, no. 1, pp. 463–478, Jan. 1987, doi: 10.1146/annurev.en.32.010187.002335.
- [247] D. Richter, F.-R. Matuschka, A. Spielman, and L. Mahadevan, "How ticks get under your skin: insertion mechanics of the feeding apparatus of *Ixodes ricinus* ticks," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 280, no. 1773, p. 20131758, Dec. 2013, doi: 10.1098/rspb.2013.1758.
- [248] L. Šimo, M. Kazimirova, J. Richardson, and S. I. Bonnet, "The Essential Role of Tick Salivary Glands and Saliva in Tick Feeding and Pathogen Transmission," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. June, pp. 1–23, 2017, doi: 10.5220/0005975201100118.
- [249] S. K. Wikel, "Tick-host-pathogen systems immunobiology: an interactive trio," *Front. Biosci. - Landmark*, vol. 23, no. 2, pp. 265–283, Jan. 2018, doi: 10.2741/4590.
- [250] J. Kotál *et al.*, "Modulation of host immunity by tick saliva," *Journal of Proteomics*, vol. 128. Elsevier B.V., pp. 58–68, 14-Oct-2015, doi: 10.1016/j.jprot.2015.07.005.
- [251] J. Chmelar, E. Calvo, J. H. F. Pedra, I. M. B. Francischetti, and M. Kotsyfakis, "Tick salivary secretion as a source of antihemostatics," *Journal of Proteomics*, vol. 75, no. 13. NIH Public Access, pp. 3842–3854, 16-Jul-2012, doi: 10.1016/j.jprot.2012.04.026.
- [252] J. Perner, S. Kropáčková, P. Kopáček, and J. M. C. Ribeiro, "Sialome diversity of ticks revealed by

- RNAseq of single tick salivary glands," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 12, no. 4, p. e0006410, Apr. 2018, doi: 10.1371/journal.pntd.0006410.
- [253] C. Raileanu *et al.*, "Borrelia diversity and co-infection with other tick borne pathogens in ticks," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. FEB, Feb. 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00036.
 - [254] E. Lejal *et al.*, "A three-years assessment of *Ixodes ricinus*-borne pathogens in a French peri-urban forest," *Parasites and Vectors*, vol. 12, no. 1, 2019, doi: 10.1186/s13071-019-3799-7.
 - [255] L. Michelet *et al.*, "Tick species, tick-borne pathogens and symbionts in an insular environment off the coast of Western France," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 7, no. 6, pp. 1109–1115, 2016, doi: 10.1016/j.ttbdis.2016.08.014.
 - [256] L. Michelet *et al.*, "High-throughput screening of tick-borne pathogens in Europe," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 4, no. JUL, 2014, doi: 10.3389/fcimb.2014.00103.
 - [257] S. Grech-Angelini *et al.*, "Tick-borne pathogens in ticks (Acari: Ixodidae) collected from various domestic and wild hosts in Corsica (France), a Mediterranean island environment," *Transbound. Emerg. Dis.*, vol. 67, no. 2, pp. 745–757, Mar. 2020, doi: 10.1111/tbed.13393.
 - [258] S. Moutailler, I. Popovici, E. Devillers, M. Vayssier-Taussat, and M. Eloit, "Diversity of viruses in *Ixodes ricinus*, and characterization of a neurotropic strain of Eyach virus," *New Microbes New Infect.*, vol. 11, pp. 71–81, May 2016, doi: 10.1016/j.nmni.2016.02.012.
 - [259] O. Duron *et al.*, "Tick-Bacteria Mutualism Depends on B Vitamin Synthesis Pathways," *Curr. Biol.*, vol. 28, no. 12, pp. 1896–1902.e5, Jun. 2018, doi: 10.1016/j.cub.2018.04.038.
 - [260] Y. Kikuchi, M. Hayatsu, T. Hosokawa, A. Nagayama, K. Tago, and T. Fukatsu, "Symbiont-mediated insecticide resistance," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 22, pp. 8618–8622, May 2012, doi: 10.1073/pnas.1200231109.
 - [261] T. Hosokawa, Y. Kikuchi, M. Shimada, and T. Fukatsu, "Obligate symbiont involved in pest status of host insect," *Proc. R. Soc. B Biol. Sci.*, vol. 274, no. 1621, pp. 1979–1984, Aug. 2007, doi: 10.1098/rspb.2007.0620.
 - [262] A. N. Alekseev, J. S. Korotkow, and L. A. Burenkova, "Virus-pesticide interactions in *Ixodes persulcatus* and *Amblyomma hebraeum* ticks (Acarina: Ixodidae)," *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 21, no. 8, pp. 561–568, 1997, doi: 10.1023/A:1018496332548.
 - [263] M. D. Esteve-Gassent *et al.*, "Translating ecology, physiology, biochemistry, and population genetics research to meet the challenge of tick and tick-borne diseases in North America," *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, vol. 92, no. 1, pp. 38–64, May 2016, doi: 10.1002/arch.21327.
 - [264] A. Estrada-Peña, A. Cabezas-Cruz, and D. Obregón, "Resistance of Tick Gut Microbiome to Anti-Tick Vaccines, Pathogen Infection and Antimicrobial Peptides," *Pathogens*, vol. 9, no. 4, p. 309, Apr. 2020, doi: 10.3390/pathogens9040309.
 - [265] T. Aivelo, A. Norberg, and B. Tschirren, "Bacterial microbiota composition of *Ixodes ricinus* ticks: The role of environmental variation, tick characteristics and microbial interactions," *PeerJ*, vol. 2019, no. 12, 2019, doi: 10.7717/peerj.8217.
 - [266] J. Soberon and A. T. Peterson, "Interpretation of Models of Fundamental Ecological Niches and Species' Distributional Areas," *Biodivers. Informatics*, vol. 2, no. 0, Jan. 2005, doi: 10.17161/bi.v2i0.4.
 - [267] H. W. Williams, D. E. Cross, H. L. Crump, C. J. Drost, and C. J. Thomas, "Climate suitability for European ticks: Assessing species distribution models against null models and projection under AR5 climate," *Parasites and Vectors*, vol. 8, no. 1, Aug. 2015, doi: 10.1186/s13071-015-1046-4.
 - [268] K. D. Lafferty, "The ecology of climate change and infectious diseases," *Ecology*, vol. 90, no. 4,

- pp. 888–900, Apr. 2009, doi: 10.1890/08-0079.1.
- [269] A. Greer, V. Ng, and D. Fisman, “Climate change and infectious diseases in North America: The road ahead,” *CMAJ*, vol. 178, no. 6. Canadian Medical Association, pp. 715–722, 11-Mar-2008, doi: 10.1503/cmaj.081325.
 - [270] R. Norval, B. Perry, and A. Young, “The epidemiology of theileriosis in Africa,” 1992.
 - [271] J. E. George, R. B. Davey, and J. M. Pound, “Introduced ticks and tick-borne diseases: the threat and approaches to eradication,” *Veterinary Clinics of North America - Food Animal Practice*, vol. 18, no. 3. Vet Clin North Am Food Anim Pract, pp. 401–416, Nov-2002, doi: 10.1016/S0749-0720(02)00030-0.
 - [272] R. A. Bram and J. E. George, “Introduction of nonindigenous arthropod pests of animals,” *Journal of medical entomology*, vol. 37, no. 1. J Med Entomol, pp. 1–8, 2000, doi: 10.1603/0022-2585-37.1.1.
 - [273] United States Department of Agriculture, “What You Need To Know About Treatments,” 2018.
 - [274] R. G. Pegram, D. D. Wilson, and J. W. Hansen, “Past and Present National Tick Control Programs: Why They Succeed or Fail,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 916, no. 1, pp. 546–554, Jan. 2006, doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05334.x.
 - [275] M. W. enne. Moyer, “The growing global battle against blood-sucking ticks,” *Nature*, vol. 524, no. 7566. pp. 406–408, 27-Aug-2015, doi: 10.1038/524406a.
 - [276] A. L. Eiden, P. E. Kaufman, F. M. Ol, S. A. Allan, and R. J. Miller, “Detection of Permethrin Resistance and Fipronil Tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the United States,” *J. Med. Entomol.*, vol. 52, no. 3, pp. 429–436, May 2015, doi: 10.1093/jme/tjv005.
 - [277] J. E. George, “Present and future technologies for tick control,” in *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000, vol. 916, pp. 583–588, doi: 10.1111/j.1749-6632.2000.tb05340.x.
 - [278] L. G. Costa, “The neurotoxicity of organochlorine and pyrethroid pesticides,” in *Handbook of Clinical Neurology*, vol. 131, Elsevier B.V., 2015, pp. 135–148.
 - [279] J. B. Prullage, H. V. Tran, P. Timmons, J. Harriman, S. T. Chester, and K. Powell, “The combined mode of action of fipronil and amitraz on the motility of *Rhipicephalus sanguineus*,” *Vet. Parasitol.*, vol. 179, no. 4, pp. 302–310, Jul. 2011, doi: 10.1016/j.vetpar.2011.03.041.
 - [280] E. Lupi, C. Hatz, and P. Schlagenhauf, “The efficacy of repellents against *Aedes*, *Anopheles*, *Culex* and *Ixodes* spp. - A literature review,” *Travel Medicine and Infectious Disease*, vol. 11, no. 6. Travel Med Infect Dis, pp. 374–411, Nov-2013, doi: 10.1016/j.tmaid.2013.10.005.
 - [281] D. E. Sonenshine, T. Adams, S. A. Allan, J. McLaughlin, and F. X. Webster, “Chemical Composition of Some Components of the Arrestment Pheromone of the Black-Legged Tick, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) and Their Use in Tick Control,” *J. Med. Entomol.*, vol. 40, no. 6, pp. 849–859, 2003, doi: 10.1603/0022-2585-40.6.849.
 - [282] R. K. Anish, B. R. Latha, G. Ramanathan, U. T. Sivagnanam, C. Sreekumar, and V. Leela, “A novel assembly pheromone trap for tick control in dog kennels,” *Vet. Parasitol.*, vol. 235, pp. 57–63, Feb. 2017, doi: 10.1016/j.vetpar.2017.01.005.
 - [283] B. Dhivya, B. R. Latha, M. D. Raja, C. Sreekumar, and V. Leela, “Control of brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* using assembly pheromone encapsulated in natural polymer, chitosan,” *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 63, no. 1, pp. 85–92, Dec. 2014, doi: 10.1007/s10493-013-9764-9.
 - [284] A. R. Walker, “Eradication and control of livestock ticks: Biological, economic and social perspectives,” *Parasitology*, vol. 138, no. 8. Cambridge University Press, pp. 945–959, Jul-2011,

doi: 10.1017/S0031182011000709.

- [285] J. F. Graf *et al.*, "Tick control: An industry point of view," *Parasitology*, vol. 129, no. SUPPL. Cambridge University Press, pp. S427–S442, 2004, doi: 10.1017/S0031182004006079.
- [286] M. Kazimírová *et al.*, "Tick-borne viruses and biological processes at the tick-host-virus interface," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. JUL, Jul. 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00339.
- [287] P. A. Nuttall, A. R. Trimnell, M. Kazimirova, and M. Labuda, "Exposed and concealed antigens as vaccine targets for controlling ticks and tick-borne diseases," *Parasite Immunology*, vol. 28, no. 4. John Wiley & Sons, Ltd, pp. 155–163, 01-Apr-2006, doi: 10.1111/j.1365-3024.2006.00806.x.
- [288] P. Willadsen, R. V. McKenna, and G. A. Riding, "Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host," *Int. J. Parasitol.*, vol. 18, no. 2, pp. 183–189, Mar. 1988, doi: 10.1016/0020-7519(88)90059-8.
- [289] J. de la Fuente, C. Almazán, M. Canales, J. M. Pérez de la Lastra, K. M. Kocan, and P. Willadsen, "A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle," *Animal health research reviews / Conference of Research Workers in Animal Diseases*, vol. 8, no. 1. Anim Health Res Rev, pp. 23–28, 2007, doi: 10.1017/S1466252307001193.
- [290] M. Canales *et al.*, "Large-scale production in *Pichia pastoris* of the recombinant vaccine Gavac(TM) against cattle tick," *Vaccine*, vol. 15, no. 4, pp. 414–422, Mar. 1997, doi: 10.1016/S0264-410X(96)00192-2.
- [291] P. Willadsen, "Novel vaccines for ectoparasites," in *Veterinary Parasitology*, 1997, vol. 71, no. 2–3, pp. 209–222, doi: 10.1016/S0304-4017(97)00028-9.
- [292] X. Y. Liu and S. I. Bonnet, "Hard Tick Factors Implicated in Pathogen Transmission," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, no. 1, p. 5, 2014, doi: 10.1371/journal.pntd.0002566.
- [293] O. Hajdusek *et al.*, "Knockdown of proteins involved in iron metabolism limits tick reproduction and development," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 4, pp. 1033–1038, Jan. 2009, doi: 10.1073/pnas.0807961106.
- [294] O. Hajdusek *et al.*, "Characterization of ferritin 2 for the control of tick infestations," *Vaccine*, vol. 28, no. 17, pp. 2993–2998, Apr. 2010, doi: 10.1016/j.vaccine.2010.02.008.
- [295] M. Labuda *et al.*, "An antivektor vaccine protects against a lethal vector-borne pathogen," *PLoS Pathog.*, vol. 2, no. 4, pp. 251–259, Apr. 2006, doi: 10.1371/journal.ppat.0020027.
- [296] C. Ndawula and A. E. Tabor, "Cocktail anti-tick vaccines: The unforeseen constraints and approaches toward enhanced efficacies," *Vaccines*, vol. 8, no. 3. MDPI AG, pp. 1–23, 2020, doi: 10.3390/vaccines8030457.
- [297] E. N. Mwangi, S. M. Hassan, G. P. Kaaya, and S. Essuman, "The impact of *Ixodiphagus hookeri*, a tick parasitoid, on *Amblyomma variegatum* (Acari: Ixodidae) in a field trial in Kenya," *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 21, no. 2, pp. 117–126, 1997, doi: 10.1023/B:APPA.0000031790.30821.57.
- [298] M. Samish, H. Ginsberg, and I. Glazer, "Biological control of ticks," *Parasitology*, vol. 129, no. SUPPL. Parasitology, 2004, doi: 10.1017/S0031182004005219.
- [299] M. Sun *et al.*, "Effectiveness of *Beauveria bassiana* sensu lato strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China," *Parasitol. Int.*, vol. 62, no. 5, pp. 412–415, Oct. 2013, doi: 10.1016/j.parint.2013.04.008.
- [300] E. A. Suleiman, M. T. Shigidi, and S. M. Hassan, "Metarhizium anisopliae as a biological control agent against *Hyalomma anatolicum* (Acari: Ixodidae)," *Pakistan J. Biol. Sci.*, vol. 16, no. 24, pp.

1943–1949, 2013, doi: 10.3923/pjbs.2013.1943.1949.

- [301] G. A. Scoles, T. F. McElwain, F. R. Rurangirwa, D. P. Knowles, and T. J. Lysyk, "A Canadian bison isolate of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) is not transmissible by *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae), whereas ticks from two Canadian *D. andersoni* populations are competent vectors of a U.S.," *J. Med. Entomol.*, vol. 43, no. 5, pp. 971–5, Sep. 2006, doi: 10.1603/0022-2585(2006)43[971:acbioa]2.0.co;2.
- [302] J. Moraes-Filho, F. S. Krawczak, F. B. Costa, J. F. Soares, and M. B. Labruna, "Comparative evaluation of the vector competence of four South American populations of the *Rhipicephalus sanguineus* group for the bacterium *Ehrlichia canis*, the agent of canine monocytic ehrlichiosis," *PLoS One*, vol. 10, no. 9, Sep. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0139386.
- [303] I. M. Arsnoe, G. J. Hickling, H. S. Ginsberg, R. McElreath, and J. I. Tsao, "Different populations of blacklegged tick nymphs exhibit differences in questing behavior that have implications for human lyme disease risk," *PLoS One*, vol. 10, no. 5, May 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0127450.
- [304] R. C. Galindo *et al.*, "Tick subolesin is an ortholog of the akirins described in insects and vertebrates," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 33, no. 4, pp. 612–617, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.dci.2008.11.002.
- [305] J. de la Fuente, C. Almazán, V. Naranjo, E. F. Blouin, J. M. Meyer, and K. M. Kocan, "Autocidal control of ticks by silencing of a single gene by RNA interference," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 344, no. 1, pp. 332–338, May 2006, doi: 10.1016/j.bbrc.2006.03.109.
- [306] J. Quintin, S. C. Cheng, J. W. M. van der Meer, and M. G. Netea, "Innate immune memory: Towards a better understanding of host defense mechanisms," *Current Opinion in Immunology*, vol. 29, no. 1. Elsevier Ltd, pp. 1–7, 2014, doi: 10.1016/j.coi.2014.02.006.
- [307] T. J. Little and A. R. Kraaijeveld, "Ecological and evolutionary implications of immunological priming in invertebrates," *Trends in Ecology and Evolution*, vol. 19, no. 2. Elsevier Ltd, pp. 58–60, 2004, doi: 10.1016/j.tree.2003.11.011.
- [308] M. Tassetto, M. Kunitomi, and R. Andino, "Circulating Immune Cells Mediate a Systemic RNAi-Based Adaptive Antiviral Response in *Drosophila*," *Cell*, vol. 169, no. 2, pp. 314–325.e13, Apr. 2017, doi: 10.1016/j.cell.2017.03.033.
- [309] A. Flemming, "Insect Immunity: Mechanism of adaptive immunity found in the fruitfly," *Nature Reviews Immunology*, vol. 17, no. 5. Nature Publishing Group, pp. 278–279, 01-May-2017, doi: 10.1038/nri.2017.44.
- [310] P. Wu, X. Yu, P. Wang, and G. Cheng, "Arbovirus lifecycle in mosquito: Acquisition, propagation and transmission," *Expert Reviews in Molecular Medicine*, vol. 21. Cambridge University Press, 2019, doi: 10.1017/erm.2018.6.
- [311] R. Andreotti, A. A. P. De León, S. E. Dowd, F. D. Guerrero, K. G. Bendele, and G. A. Scoles, "Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* through tag-encoded pyrosequencing," *BMC Microbiol.*, vol. 11, no. 1, 2011, doi: 10.1186/1471-2180-11-6.
- [312] P. A. W. Martin and E. T. Schmidtman, "Isolation of Aerobic Microbes from *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae), the Vector of Lyme Disease in the Eastern United States," *J. Econ. Entomol.*, vol. 91, no. 4, pp. 864–868, 1998, doi: 10.1093/jee/91.4.864.
- [313] B. Weiss and S. Aksoy, "Microbiome influences on insect host vector competence," *Trends in Parasitology*, vol. 27, no. 11. NIH Public Access, pp. 514–522, Nov-2011, doi: 10.1016/j.pt.2011.05.001.

- [314] S. Narasimhan *et al.*, "Gut microbiota of the tick vector *Ixodes scapularis* modulate colonization of the Lyme disease spirochete," *Cell Host Microbe*, vol. 15, no. 1, pp. 58–71, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.chom.2013.12.001.
- [315] A. S. O. Chávez, D. K. Shaw, U. G. Munderloh, and J. H. F. Pedra, "Tick humoral responses: Marching to the beat of a different drummer," *Frontiers in Microbiology*, vol. 8, no. FEB. Frontiers Media S.A., 14-Feb-2017, doi: 10.3389/fmicb.2017.00223.
- [316] N. Johnson, "Tick-Virus Interactions: Toll Sensing," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. June, pp. 10–13, 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00293.
- [317] O. Hajdušek *et al.*, "Interaction of the tick immune system with transmitted pathogens," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 3, no. July, pp. 1–15, 2013, doi: 10.3389/fcimb.2013.00026.
- [318] R. Fragkoudis, G. Attarzadeh-Yazdi, A. A. Nash, J. K. Fazakerley, and A. Kohl, "Advances in dissecting mosquito innate immune responses to arbovirus infection," *Journal of General Virology*, vol. 90, no. 9. J Gen Virol, pp. 2061–2072, 2009, doi: 10.1099/vir.0.013201-0.
- [319] A. Fullaondo and S. Y. Lee, "Regulation of *Drosophila*-virus interaction," *Developmental and Comparative Immunology*, vol. 36, no. 2. Dev Comp Immunol, pp. 262–266, Feb-2012, doi: 10.1016/j.dci.2011.08.007.
- [320] C. Kemp and J. L. Imler, "Antiviral immunity in drosophila," *Current Opinion in Immunology*, vol. 21, no. 1. Curr Opin Immunol, pp. 3–9, Feb-2009, doi: 10.1016/j.coi.2009.01.007.
- [321] S. H. Merklings and R. P. van Rij, "Beyond RNAi: Antiviral defense strategies in *Drosophila* and mosquito," *J. Insect Physiol.*, vol. 59, no. 2, pp. 159–170, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.jinsphys.2012.07.004.
- [322] M. B. Kingsolver, Z. Huang, and R. W. Hardy, "Insect antiviral innate immunity: Pathways, effectors, and connections," *J. Mol. Biol.*, vol. 425, no. 24, pp. 4921–4936, 2013, doi: 10.1016/j.jmb.2013.10.006.
- [323] J. Robalino *et al.*, "Induction of Antiviral Immunity by Double-Stranded RNA in a Marine Invertebrate," *J. Virol.*, vol. 78, no. 19, pp. 10442–10448, Oct. 2004, doi: 10.1128/jvi.78.19.10442-10448.2004.
- [324] H. Liu, K. Söderhäll, and P. Jiravanichpaisal, "Antiviral immunity in crustaceans," *Fish and Shellfish Immunology*, vol. 27, no. 2. Academic Press, pp. 79–88, 2009, doi: 10.1016/j.fsi.2009.02.009.
- [325] E. Schnettler *et al.*, "Induction and suppression of tick cell antiviral RNAi responses by tick-borne flaviviruses," *Nucleic Acids Res.*, vol. 42, no. 14, pp. 9436–9446, 2014, doi: 10.1093/nar/gku657.
- [326] M. R. Talactac *et al.*, "Characterization and antiviral activity of a newly identified defensin-like peptide, HEdefensin, in the hard tick *Haemaphysalis longicornis*," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 68, pp. 98–107, Mar. 2017, doi: 10.1016/j.dci.2016.11.013.
- [327] C. Rückert, L. Bell-Sakyi, J. K. Fazakerley, and R. Fragkoudis, "Antiviral responses of arthropod vectors: an update on recent advances," *VirusDisease*, vol. 25, no. 3, pp. 249–260, 2014, doi: 10.1007/s13337-014-0217-9.
- [328] S. Kurscheid *et al.*, "Evidence of a tick RNAi pathway by comparative genomics and reverse genetics screen of targets with known loss-of-function phenotypes in *Drosophila*," *BMC Mol. Biol.*, vol. 10, 2009, doi: 10.1186/1471-2199-10-26.
- [329] S. W. Ding and O. Voinnet, "Antiviral Immunity Directed by Small RNAs," *Cell*, vol. 130, no. 3. Cell, pp. 413–426, 10-Aug-2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.07.039.
- [330] D. Galiana-Arnoux, C. Dostert, A. Schneemann, J. A. Hoffmann, and J. L. Imler, "Essential

- function *in vivo* for Dicer-2 in host defense against RNA viruses in drosophila,” *Nat. Immunol.*, vol. 7, no. 6, pp. 590–597, 2006, doi: 10.1038/ni1335.
- [331] R. A. Zambon, V. N. Vakharia, and L. P. Wu, “RNAi is an antiviral immune response against a dsRNA virus in *Drosophila melanogaster*,” *Cell. Microbiol.*, vol. 8, no. 5, pp. 880–889, May 2006, doi: 10.1111/j.1462-5822.2006.00688.x.
 - [332] R. P. Van Rij *et al.*, “The RNA silencing endonuclease Argonaute 2 mediates specific antiviral immunity in *Drosophila melanogaster*,” *Genes Dev.*, vol. 20, no. 21, pp. 2985–2995, Nov. 2006, doi: 10.1101/gad.1482006.
 - [333] S. W. Ding, “RNA-based antiviral immunity,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 10, no. 9. Nat Rev Immunol, pp. 632–644, Sep-2010, doi: 10.1038/nri2824.
 - [334] C. D. Blair, “Mosquito RNAi is the major innate immune pathway controlling arbovirus infection and transmission,” *Future Microbiology*, vol. 6, no. 3. Future Microbiol, pp. 265–277, Mar-2011, doi: 10.2217/fmb.11.11.
 - [335] C. L. Donald, A. Kohl, and E. Schnettler, “New Insights into Control of Arbovirus Replication and Spread by Insect RNA Interference Pathways,” *Insects*, vol. 3, no. 2, pp. 511–531, May 2012, doi: 10.3390/insects3020511.
 - [336] D. Vijayendran, P. M. Airs, K. Dolezal, and B. C. Bonning, “Arthropod viruses and small RNAs,” *J. Invertebr. Pathol.*, vol. 114, no. 2, pp. 186–195, 2013, doi: 10.1016/j.jip.2013.07.006.
 - [337] Q. Liu *et al.*, “R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the *Drosophila* RNAi pathway,” *Science (80-.)*, vol. 301, no. 5641, pp. 1921–1925, Sep. 2003, doi: 10.1126/science.1088710.
 - [338] E. Bernstein, A. M. Denli, and G. J. Hannon, “The rest is silence,” *RNA*, vol. 7, no. 11. Cold Spring Harbor Laboratory Press, pp. 1509–1521, 2001, doi: 10.1088/2058-7058/27/06/25.
 - [339] K. Okamura, A. Ishizuka, H. Siomi, and M. C. Siomi, “Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways,” *Genes Dev.*, vol. 18, no. 14, pp. 1655–1666, Jul. 2004, doi: 10.1101/gad.1210204.
 - [340] Y. Liu *et al.*, “C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation,” *Science (80-.)*, vol. 325, no. 5941, pp. 750–753, 2009, doi: 10.1126/science.1176325.
 - [341] T. A. Rand, K. Ginalski, N. V. Grishin, and X. Wang, “Biochemical identification of Argonaute 2 as the protein required for RNA-induced silencing complex activity,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 101, no. 40, pp. 14385–14389, Oct. 2004, doi: 10.1073/pnas.0405913101.
 - [342] K. M. Myles, M. R. Wiley, E. M. Morazzani, and Z. N. Adelman, “Alphavirus-derived small RNAs modulate pathogenesis in disease vector mosquitoes,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 50, pp. 19938–19943, Dec. 2008, doi: 10.1073/pnas.0803408105.
 - [343] S. Iwasaki *et al.*, “Hsc70/Hsp90 chaperone machinery mediates ATP-dependent RISC loading of small RNA duplexes,” *Mol. Cell*, vol. 39, no. 2, pp. 292–299, Jul. 2010, doi: 10.1016/j.molcel.2010.05.015.
 - [344] P. N. Paradkar, J.-B. Duchemin, R. Voysey, and P. J. Walker, “Dicer-2-Dependent Activation of *Culex Vago* Occurs via the TRAF-Rel2 Signaling Pathway,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, no. 4, p. e2823, Apr. 2014, doi: 10.1371/journal.pntd.0002823.
 - [345] M. McFarlane *et al.*, “The *Aedes aegypti* Domino Ortholog p400 Regulates Antiviral Exogenous Small Interfering RNA Pathway Activity and ago-2 Expression,” *mSphere*, vol. 5, no. 2, Apr. 2020, doi: 10.1128/msphere.00081-20.
 - [346] M. R. Joga, M. J. Zotti, G. Smagghe, and O. Christiaens, “RNAi efficiency, systemic properties,

- and novel delivery methods for pest insect control: What we know so far," *Frontiers in Physiology*, vol. 7, no. NOV. Frontiers Media S.A., p. 553, 17-Nov-2016, doi: 10.3389/fphys.2016.00553.
- [347] O. Voinnet, "Non-cell autonomous RNA silencing," *FEBS Letters*, vol. 579, no. 26. FEBS Lett, pp. 5858–5871, 31-Oct-2005, doi: 10.1016/j.febslet.2005.09.039.
 - [348] M. Karlikow, B. Goic, and M. C. Saleh, "RNAi and antiviral defense in *Drosophila*: Setting up a systemic immune response," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 42, no. 1, pp. 85–92, 2014, doi: 10.1016/j.dci.2013.05.004.
 - [349] B. Goic *et al.*, "RNA-mediated interference and reverse transcription control the persistence of RNA viruses in the insect model *Drosophila*," *Nat. Immunol.*, vol. 14, no. 4, pp. 396–403, 2013, doi: 10.1038/ni.2542.
 - [350] K. M. Aung *et al.*, "Scavenger receptor mediates systemic RNA interference in ticks," *PLoS One*, vol. 6, no. 12, Dec. 2011, doi: 10.1371/journal.pone.0028407.
 - [351] T. Blevins *et al.*, "Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing," *Nucleic Acids Res.*, vol. 34, no. 21, pp. 6233–6246, 2006, doi: 10.1093/nar/gkl886.
 - [352] D. P. Bartel, "Metazoan MicroRNAs," *Cell*, vol. 173, no. 1. Cell Press, pp. 20–51, 22-Mar-2018, doi: 10.1016/j.cell.2018.03.006.
 - [353] K. Lucas and A. S. Raikhel, "Insect MicroRNAs: Biogenesis, expression profiling and biological functions," *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, vol. 43, no. 1. Insect Biochem Mol Biol, pp. 24–38, Jan-2013, doi: 10.1016/j.ibmb.2012.10.009.
 - [354] N. D. Mendes, A. T. Freitas, A. T. Vasconcelos, and M. F. Sagot, "Combination of measures distinguishes pre-miRNAs from other stem-loops in the genome of the newly sequenced *Anopheles darlingi*," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, Sep. 2010, doi: 10.1186/1471-2164-11-529.
 - [355] R. L. Skalsky, D. L. Vanlandingham, F. Scholle, S. Higgs, and B. R. Cullen, "Identification of microRNAs expressed in two mosquito vectors, *Aedes albopictus* and *Culex quinquefasciatus*," *BMC Genomics*, vol. 11, no. 1, Feb. 2010, doi: 10.1186/1471-2164-11-119.
 - [356] R. A. Barrero *et al.*, "Evolutionary conserved microRNAs are ubiquitously expressed compared to tick-specific miRNAs in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*," *BMC Genomics*, vol. 12, Jun. 2011, doi: 10.1186/1471-2164-12-328.
 - [357] J. Zhou, Y. Zhou, J. Cao, H. Zhang, and Y. Yu, "Distinctive microRNA profiles in the salivary glands of *Haemaphysalis longicornis* related to tick blood-feeding," *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 59, no. 3, pp. 339–349, 2013, doi: 10.1007/s10493-012-9604-3.
 - [358] J. Luo *et al.*, "Identification and characterization of microRNAs by deep-sequencing in *Hyalomma anatolicum anatolicum* (Acari: Ixodidae) ticks," *Gene*, vol. 564, no. 2, pp. 125–133, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.gene.2015.01.019.
 - [359] F. Wang, H. Gong, H. Zhang, Y. Zhou, J. Cao, and J. Zhou, "Lipopolysaccharide-induced differential expression of miRNAs in male and female *Rhipicephalus haemaphysaloides* ticks," *PLoS One*, vol. 10, no. 10, Oct. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0139241.
 - [360] C. C. Shao, M. J. Xu, Y. Z. Chen, J. P. Tao, and X. Q. Zhu, "Comparative Profiling of MicroRNAs in Male and Female *Rhipicephalus sanguineus*," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 176, no. 7, pp. 1928–1936, Aug. 2015, doi: 10.1007/s12010-015-1688-x.
 - [361] M. Hackenberg, D. Langenberger, A. Schwarz, J. Erhart, and M. Kotsyfakis, "In silico target network analysis of de novo-discovered, tick saliva-specific microRNAs reveals important combinatorial effects in their interference with vertebrate host physiology," *RNA*, vol. 23, no. 8, pp. 1259–1269, Aug. 2017, doi: 10.1261/rna.061168.117.

- [362] S. Artigas-Jerónimo *et al.*, “*Anaplasma phagocytophilum* modifies tick cell microRNA expression and upregulates isc-mir-79 to facilitate infection by targeting the Roundabout protein 2 pathway,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-45658-2.
- [363] M. E. Hermance, S. G. Widen, T. G. Wood, and S. Thangamani, “*Ixodes scapularis* salivary gland microRNAs are differentially expressed during Powassan virus transmission,” *Sci. Rep.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2019, doi: 10.1038/s41598-019-49572-5.
- [364] M. Hussain, T. Walker, S. L. O’Neill, and S. Asgari, “Blood meal induced microRNA regulates development and immune associated genes in the Dengue mosquito vector, *Aedes aegypti*,” *Insect Biochem. Mol. Biol.*, vol. 43, no. 2, pp. 146–152, Feb. 2013, doi: 10.1016/j.ibmb.2012.11.005.
- [365] K. Thirugnanasambantham, V. I. Hairul-Islam, S. Saravanan, S. Subasri, and A. Subastri, “Computational approach for identification of *Anopheles gambiae* miRNA involved in modulation of host immune response,” *Appl. Biochem. Biotechnol.*, vol. 170, no. 2, pp. 281–291, May 2013, doi: 10.1007/s12010-013-0183-5.
- [366] V. V. Vagin, A. Sigova, C. Li, H. Seitz, V. Gvozdev, and P. D. Zamore, “A distinct small RNA pathway silences selfish genetic elements in the germline,” *Science (80-.)*, vol. 313, no. 5785, pp. 320–324, Jul. 2006, doi: 10.1126/science.1129333.
- [367] S. Houwing *et al.*, “A Role for Piwi and piRNAs in Germ Cell Maintenance and Transposon Silencing in Zebrafish,” *Cell*, vol. 129, no. 1, pp. 69–82, Apr. 2007, doi: 10.1016/j.cell.2007.03.026.
- [368] D. Handler *et al.*, “The genetic makeup of the *Drosophila* piRNA pathway,” *Mol. Cell*, vol. 50, no. 5, pp. 762–777, Jun. 2013, doi: 10.1016/j.molcel.2013.04.031.
- [369] C. L. Donald, A. Kohl, and E. Schnettler, “New insights into control of arbovirus replication and spread by insect RNA interference pathways,” *Insects*, vol. 3, no. 2, pp. 511–531, 2012, doi: 10.3390/insects3020511.
- [370] A. Kolliopoulou *et al.*, “PIWI pathway against viruses in insects,” *Wiley Interdiscip. Rev. RNA*, vol. 10, no. 6, Nov. 2019, doi: 10.1002/wrna.1555.
- [371] H. Ishizu, H. Siomi, and M. C. Siomi, “Biology of Piwi-interacting RNAs: New insights into biogenesis and function inside and outside of germlines,” *Genes and Development*, vol. 26, no. 21, pp. 2361–2373, 01-Nov-2012, doi: 10.1101/gad.203786.112.
- [372] M. C. Siomi, K. Sato, D. Pezic, and A. A. Aravin, “PIWI-interacting small RNAs: The vanguard of genome defence,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 12, no. 4, Nature Publishing Group, pp. 246–258, 23-Apr-2011, doi: 10.1038/nrm3089.
- [373] K. A. Senti and J. Brennecke, “The piRNA pathway: A fly’s perspective on the guardian of the genome,” *Trends in Genetics*, vol. 26, no. 12, Trends Genet, pp. 499–509, Dec-2010, doi: 10.1016/j.tig.2010.08.007.
- [374] M. Petit, V. Mongelli, L. Frangeul, H. Blanc, F. Jiggins, and M. C. Saleh, “PiRNA pathway is not required for antiviral defense in *Drosophila melanogaster*,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 29, pp. E4218–E4227, Jul. 2016, doi: 10.1073/pnas.1607952113.
- [375] E. Schnettler, V. B. Sreenu, T. Mottram, and M. McFarlane, “*Wolbachia* restricts insect-specific flavivirus infection in *Aedes aegypti* cells,” *J. Gen. Virol.*, vol. 97, no. 11, pp. 3024–3029, Nov. 2016, doi: 10.1099/jgv.0.000617.
- [376] E. Schnettler *et al.*, “RNA Interference Targets Arbovirus Replication in Culicoides Cells,” *J. Virol.*, vol. 87, no. 5, pp. 2441–2454, Mar. 2013, doi: 10.1128/jvi.02848-12.
- [377] E. Schnettler *et al.*, “Knockdown of piRNA pathway proteins results in enhanced semliki forest

- virus production in mosquito cells," *J. Gen. Virol.*, vol. 94, no. PART7, pp. 1680–1689, Jul. 2013, doi: 10.1099/vir.0.053850-0.
- [378] I. Dietrich *et al.*, "The Antiviral RNAi Response in Vector and Non-vector Cells against Orthobunyaviruses," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1371/journal.pntd.0005272.
 - [379] I. Dietrich *et al.*, "RNA Interference Restricts Rift Valley Fever Virus in Multiple Insect Systems," *mSphere*, vol. 2, no. 3, Jun. 2017, doi: 10.1128/msphere.00090-17.
 - [380] P. Miesen, E. Girardi, and R. P. Van Rij, "Distinct sets of PIWI proteins produce arbovirus and transposon-derived piRNAs in *Aedes aegypti* mosquito cells," *Nucleic Acids Res.*, vol. 43, no. 13, pp. 6545–6556, May 2015, doi: 10.1093/nar/gkv590.
 - [381] M. Varjak *et al.*, "Characterization of the Zika virus induced small RNA response in *Aedes aegypti* cells," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 10, Oct. 2017, doi: 10.1371/journal.pntd.0006010.
 - [382] N. Vodovar *et al.*, "Arbovirus-derived piRNAs exhibit a ping-pong signature in mosquito cells," *PLoS One*, vol. 7, no. 1, Jan. 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0030861.
 - [383] A. M. Hess *et al.*, "Small RNA profiling of Dengue virus-mosquito interactions implicates the PIWI RNA pathway in anti-viral defense," *BMC Microbiol.*, vol. 11, 2011, doi: 10.1186/1471-2180-11-45.
 - [384] J. C. Scott *et al.*, "Comparison of dengue virus type 2-specific small RNAs from RNA interference-competent and -incompetent mosquito cells," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 4, no. 10, Oct. 2010, doi: 10.1371/journal.pntd.0000848.
 - [385] M. Lee *et al.*, "Understanding the role of microRNAs in the interaction of *Aedes aegypti* mosquitoes with an insect-specific flavivirus," *J. Gen. Virol.*, vol. 98, no. 7, pp. 1892–1903, Jul. 2017, doi: 10.1099/jgv.0.000832.
 - [386] M. A. Saldaña *et al.*, "Zika virus alters the microRNA expression profile and elicits an RNAi response in *Aedes aegypti* mosquitoes," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 7, Jul. 2017, doi: 10.1371/journal.pntd.0005760.
 - [387] P. Miesen, A. Ivens, A. H. Buck, and R. P. van Rij, "Small RNA Profiling in Dengue Virus 2-Infected *Aedes* Mosquito Cells Reveals Viral piRNAs and Novel Host miRNAs," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 10, no. 2, Feb. 2016, doi: 10.1371/journal.pntd.0004452.
 - [388] G. P. Göertz, P. Miesen, G. J. Overheul, R. P. Van Rij, M. M. Van Oers, and G. P. Pijlman, "Mosquito small RNA responses to West Nile and insect-specific virus infections in *Aedes* and *Culex* mosquito cells," *Viruses*, vol. 11, no. 3, Mar. 2019, doi: 10.3390/v11030271.
 - [389] G. P. Göertz *et al.*, "Noncoding Subgenomic Flavivirus RNA Is Processed by the Mosquito RNA Interference Machinery and Determines West Nile Virus Transmission by *Culex pipiens* Mosquitoes," *J. Virol.*, vol. 90, no. 22, pp. 10145–10159, Nov. 2016, doi: 10.1128/jvi.00930-16.
 - [390] J. J. Fros *et al.*, "Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe," *One Heal.*, vol. 1, pp. 31–36, Dec. 2015, doi: 10.1016/j.onehlt.2015.08.002.
 - [391] M. Varjak *et al.*, "*Aedes aegypti* Piwi4 Is a Noncanonical PIWI Protein Involved in Antiviral Responses," *mSphere*, vol. 2, no. 3, Jun. 2017, doi: 10.1128/msphere.00144-17.
 - [392] R. M. Waterhouse *et al.*, "Evolutionary dynamics of immune-related genes and pathways in disease-vector mosquitoes," *Science (80-.)*, vol. 316, no. 5832, pp. 1738–1743, Jun. 2007, doi: 10.1126/science.1139862.
 - [393] D. K. Shaw *et al.*, "Vector Immunity and Evolutionary Ecology: The Harmonious Dissonance,"

- Trends in Immunology*, vol. 39, no. 11. Elsevier Ltd, pp. 862–873, 01-Nov-2018, doi: 10.1016/j.it.2018.09.003.
- [394] J. A. Souza-Neto, S. Sim, and G. Dimopoulos, “An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 42, pp. 17841–17846, Oct. 2009, doi: 10.1073/pnas.0905006106.
 - [395] P. N. Paradkar, L. Trinidad, R. Voysey, J. B. Duchemin, and P. J. Walker, “Secreted Vago restricts West Nile virus infection in *Culex* mosquito cells by activating the Jak-STAT pathway,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 109, no. 46, pp. 18915–18920, Nov. 2012, doi: 10.1073/pnas.1205231109.
 - [396] S. Deddouche *et al.*, “The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila,” *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 12, pp. 1425–1432, 2008, doi: 10.1038/ni.1664.
 - [397] S. Deddouche *et al.*, “The DExD/H-box helicase Dicer-2 mediates the induction of antiviral activity in drosophila,” *Nat. Immunol.*, vol. 9, no. 12, pp. 1425–1432, 2008, doi: 10.1038/ni.1664.
 - [398] P. N. Paradkar, J. B. Duchemin, R. Voysey, and P. J. Walker, “Dicer-2-Dependent Activation of *Culex* Vago Occurs via the TRAF-Rel2 Signaling Pathway,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, no. 4, 2014, doi: 10.1371/journal.pntd.0002823.
 - [399] L. ke Liu, X. xiao Chen, R. lin Gao, K. jian Wang, W. yun Zheng, and H. peng Liu, “A cytokine receptor domeless promotes white spot syndrome virus infection via JAK/STAT signaling pathway in red claw crayfish *Cherax quadricarinatus*,” *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 111, Oct. 2020, doi: 10.1016/j.dci.2020.103749.
 - [400] M. Yan *et al.*, “Identification of a JAK/STAT pathway receptor domeless from Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*,” *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 44, no. 1, pp. 26–32, May 2015, doi: 10.1016/j.fsi.2015.01.023.
 - [401] H. Y. Yi, M. Chowdhury, Y. D. Huang, and X. Q. Yu, “Insect antimicrobial peptides and their applications,” *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 98, no. 13. Springer Verlag, pp. 5807–5822, 2014, doi: 10.1007/s00253-014-5792-6.
 - [402] J. A. Souza-Neto, S. Sim, and G. Dimopoulos, “An evolutionary conserved function of the JAK-STAT pathway in anti-dengue defense,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 42, pp. 17841–17846, Oct. 2009, doi: 10.1073/pnas.0905006106.
 - [403] N. Jupatanakul *et al.*, “Engineered *Aedes aegypti* JAK/STAT Pathway-Mediated Immunity to Dengue Virus,” *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 11, no. 1, Jan. 2017, doi: 10.1371/journal.pntd.0005187.
 - [404] Z. Huang, M. B. Kingsolver, V. Avadhanula, and R. W. Hardy, “An Antiviral Role for Antimicrobial Peptides during the Arthropod Response to Alphavirus Replication,” *J. Virol.*, vol. 87, no. 8, pp. 4272–4280, Apr. 2013, doi: 10.1128/jvi.03360-12.
 - [405] W. Y. Chen *et al.*, “WSSV infection activates STAT in shrimp,” *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 32, no. 10, pp. 1142–1150, 2008, doi: 10.1016/j.dci.2008.03.003.
 - [406] W.-J. Liu, Y.-S. Chang, A. H.-J. Wang, G.-H. Kou, and C.-F. Lo, “White Spot Syndrome Virus Annexes a Shrimp STAT To Enhance Expression of the Immediate-Early Gene *ie1*,” *J. Virol.*, vol. 81, no. 3, pp. 1461–1471, Feb. 2007, doi: 10.1128/jvi.01880-06.
 - [407] B. T. Kile and W. S. Alexander, “The suppressors of cytokine signalling (SOCS),” *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 58, no. 11. Birkhauser Verlag Basel, pp. 1627–1635, 2001, doi: 10.1007/PL00000801.

- [408] X. Song *et al.*, "A Janus Kinase in the JAK/STAT signaling pathway from *Litopenaeus vannamei* is involved in antiviral immune response," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 44, no. 2, pp. 662–673, Jun. 2015, doi: 10.1016/j.fsi.2015.03.031.
- [409] R. Xi, J. R. McGregor, and D. A. Harrison, "A gradient of JAK pathway activity patterns the anterior-posterior axis of the follicular epithelium," *Dev. Cell*, vol. 4, no. 2, pp. 167–177, Feb. 2003, doi: 10.1016/S1534-5807(02)00412-4.
- [410] Liu L *et al.*, "*Ixodes scapularis* JAK-STAT pathway regulates tick antimicrobial peptides, thereby controlling the agent of human granulocytic anaplasmosis. - Abstract - Europe PMC," *J. Infect. Dis.*, vol. 206, no. 8, pp. 1233–1241, Aug. 2012, doi: 10.1093/infdis/jis484.
- [411] K. Buchmann, "Evolution of Innate Immunity: Clues from Invertebrates via Fish to Mammals," *Front. Immunol.*, vol. 5, no. SEP, p. 459, Sep. 2014, doi: 10.3389/fimmu.2014.00459.
- [412] K. Mukherjee, B. Korithoski, and B. Kolaczowski, "Ancient Origins of Vertebrate-Specific Innate Antiviral Immunity," in *Molecular Biology and Evolution*, 2014, pp. 140–153.
- [413] K. V. Anderson, G. Jürgens, and C. Nüsslein-Volhard, "Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: Genetic studies on the role of the *Toll* gene product," *Cell*, vol. 42, no. 3, pp. 779–789, Oct. 1985, doi: 10.1016/0092-8674(85)90274-0.
- [414] Á. G. Ferreira, H. Naylor, S. S. Esteves, I. S. Pais, N. E. Martins, and L. Teixeira, "The Toll-Dorsal Pathway Is Required for Resistance to Viral Oral Infection in *Drosophila*," *PLoS Pathog.*, vol. 10, no. 12, p. e1004507, Dec. 2014, doi: 10.1371/journal.ppat.1004507.
- [415] F. Li and J. Xiang, "Signaling pathways regulating innate immune responses in shrimp," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 34, no. 4, pp. 973–980, 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2012.08.023.
- [416] S. Kurata, S. Ariki, and S. ichiro Kawabata, "Recognition of pathogens and activation of immune responses in *Drosophila* and horseshoe crab innate immunity," *Immunobiology*, vol. 211, no. 4. Elsevier GmbH, pp. 237–249, 02-Jun-2006, doi: 10.1016/j.imbio.2005.10.016.
- [417] M. Gangloff, A. N. R. Weber, R. J. Gibbard, and N. J. Gay, "Evolutionary relationships, but functional differences, between the *Drosophila* and human Toll-like receptor families," in *Biochemical Society Transactions*, 2003, vol. 31, no. 3, pp. 659–663, doi: 10.1042/BST0310659.
- [418] A. N. R. Weber *et al.*, "Binding of the *Drosophila* cytokine Spätzle to Toll is direct and establishes signaling," *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 8, pp. 794–800, Aug. 2003, doi: 10.1038/ni955.
- [419] C. J. Arnot, N. J. Gay, and M. Gangloff, "Molecular mechanism that induces activation of Spätzle, the ligand for the *Drosophila* toll receptor," *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 25, pp. 19502–19509, Jun. 2010, doi: 10.1074/jbc.M109.098186.
- [420] Z. Xi, J. L. Ramirez, and G. Dimopoulos, "The *Aedes aegypti* toll pathway controls dengue virus infection," *PLoS Pathog.*, vol. 4, no. 7, Jul. 2008, doi: 10.1371/journal.ppat.1000098.
- [421] J. L. Ramirez and G. Dimopoulos, "The Toll immune signaling pathway control conserved anti-dengue defenses across diverse *Ae. aegypti* strains and against multiple dengue virus serotypes," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 34, no. 6, pp. 625–629, Jun. 2010, doi: 10.1016/j.dci.2010.01.006.
- [422] A. A. Smith and U. Pal, "Immunity-related genes in *Ixodes scapularis*-perspectives from genome information," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 4, no. AUG, 2014, doi: 10.3389/fcimb.2014.00116.
- [423] K. L. Mansfield *et al.*, "Tick-borne pathogens induce differential expression of genes promoting cell survival and host resistance in *Ixodes ricinus* cells," *Parasites and Vectors*, vol. 10, no. 1, pp. 1–12, 2017, doi: 10.1186/s13071-017-2011-1.

- [424] C. S. McKimmie, N. Johnson, A. R. Fooks, and J. K. Fazakerley, "Viruses selectively upregulate Toll-like receptors in the central nervous system," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 336, no. 3, pp. 925–933, Oct. 2005, doi: 10.1016/j.bbrc.2005.08.209.
- [425] R. Fragkoudis *et al.*, "Semliki Forest virus strongly reduces mosquito host defence signaling," *Insect Mol. Biol.*, vol. 17, no. 6, pp. 647–656, Dec. 2008, doi: 10.1111/j.1365-2583.2008.00834.x.
- [426] V. Avadhanula, B. P. Weasner, G. G. Hardy, J. P. Kumar, and R. W. Hardy, "A Novel System for the Launch of Alphavirus RNA Synthesis Reveals a Role for the Imd Pathway in Arthropod Antiviral Response," *PLoS Pathog.*, vol. 5, no. 9, p. e1000582, Sep. 2009, doi: 10.1371/journal.ppat.1000582.
- [427] J. Waldock, K. E. Olson, and G. K. Christophides, "*Anopheles gambiae* antiviral immune response to systemic O'nyong-nyong infection," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 6, no. 3, Mar. 2012, doi: 10.1371/journal.pntd.0001565.
- [428] D. A. Galbraith, X. Yang, E. L. Niño, S. Yi, and C. Grozinger, "Parallel Epigenomic and Transcriptomic Responses to Viral Infection in Honey Bees (*Apis mellifera*)," *PLoS Pathog.*, vol. 11, no. 3, pp. 1–24, Mar. 2015, doi: 10.1371/journal.ppat.1004713.
- [429] C. Li, S. Wang, and J. He, "The Two NF- κ B Pathways Regulating Bacterial and WSSV Infection of Shrimp," *Frontiers in immunology*, vol. 10. NLM (Medline), p. 1785, 2019, doi: 10.3389/fimmu.2019.01785.
- [430] P. H. Wang *et al.*, "Molecular cloning, characterization and expression analysis of two novel Tolls (LvToll2 and LvToll3) and three putative Spätzle-like Toll ligands (LvSpz1-3) from *Litopenaeus vannamei*," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 36, no. 2, pp. 359–371, Feb. 2012, doi: 10.1016/j.dci.2011.07.007.
- [431] A. Kleino and N. Silverman, "The *Drosophila* IMD pathway in the activation of the humoral immune response," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 42, no. 1, pp. 25–35, Jan. 2014, doi: 10.1016/j.dci.2013.05.014.
- [432] S. W. Shin, V. Kokoza, A. Ahmed, and A. S. Raikhel, "Characterization of three alternatively spliced isoforms of the Rel/NF- κ B transcription factor relish from the mosquito *Aedes aegypti*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 99, no. 15, pp. 9978–9983, Jul. 2002, doi: 10.1073/pnas.162345999.
- [433] J. Bechsgaard *et al.*, "Comparative genomic study of arachnid immune systems indicates loss of beta-1,3-glucanase-related proteins and the immune deficiency pathway," *J. Evol. Biol.*, vol. 29, no. 2, pp. 277–291, Feb. 2016, doi: 10.1111/jeb.12780.
- [434] P. Kopáček, O. Hajdušek, V. Burešová, and S. Daffre, "Tick innate immunity," *Adv. Exp. Med. Biol.*, vol. 708, pp. 137–162, 2010, doi: 10.1007/978-1-4419-8059-5-8.
- [435] V. Naranjo *et al.*, "Reciprocal Regulation of NF- κ B (Relish) and Subolesin in the Tick Vector, *Ixodes scapularis*," *PLoS One*, vol. 8, no. 6, Jun. 2013, doi: 10.1371/journal.pone.0065915.
- [436] J. Capelli-Peixoto *et al.*, "The transcription factor Relish controls *Anaplasma marginale* infection in the bovine tick *Rhipicephalus microplus*," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 74, pp. 32–39, Sep. 2017, doi: 10.1016/j.dci.2017.04.005.
- [437] Maiara S. Severo *et al.*, "The E3 Ubiquitin Ligase XIAP Restricts *Anaplasma phagocytophilum* Colonization of *Ixodes scapularis* Ticks," *J. Infect. Dis.*, vol. 208, no. 11, Dec. 2013, doi: 10.1093/infdis/jit380.
- [438] E. J. Cordes, K. D. Licking-Murray, and K. A. Carlson, "Differential gene expression related to Nora virus infection of *Drosophila melanogaster*," *Virus Res.*, vol. 175, no. 2, pp. 95–100, Aug. 2013, doi: 10.1016/j.virusres.2013.03.021.

- [439] A. Costa, E. Jan, P. Sarnow, and D. Schneider, "The Imd Pathway Is Involved in Antiviral Immune Responses in *Drosophila*," *PLoS One*, vol. 4, no. 10, p. e7436, Oct. 2009, doi: 10.1371/journal.pone.0007436.
- [440] A. B. F. Barletta *et al.*, "Microbiota activates IMD pathway and limits Sindbis infection in *Aedes aegypti*," *Parasites and Vectors*, vol. 10, no. 1, Feb. 2017, doi: 10.1186/s13071-017-2040-9.
- [441] O. Lamiable *et al.*, "Cytokine Dieldel and a viral homologue suppress the IMD pathway in *Drosophila*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 113, no. 3, pp. 698–703, Jan. 2016, doi: 10.1073/pnas.1516122113.
- [442] A. B. F. Barletta *et al.*, "Emerging role of lipid droplets in *Aedes aegypti* immune response against bacteria and Dengue virus," *Sci. Rep.*, vol. 6, Feb. 2016, doi: 10.1038/srep19928.
- [443] K. Jasik and A. Buczek, "Structural changes in the salivary glands of *Ixodes ricinus* larvae," *Parassitologia*, vol. 49, no. 1–2, pp. 59–64, 2007.
- [444] D. K. Shaw *et al.*, "Infection-derived lipids elicit an immune deficiency circuit in arthropods," *Nat. Commun.*, vol. 8, no. May 2016, p. 14401, Apr. 2017, doi: 10.1038/ncomms14401.
- [445] X. De Huang *et al.*, "Identification and functional study of a shrimp Relish homologue," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 27, no. 2, pp. 230–238, 2009, doi: 10.1016/j.fsi.2009.05.003.
- [446] P. H. Wang *et al.*, "An immune deficiency homolog from the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, activates antimicrobial peptide genes," *Mol. Immunol.*, vol. 46, no. 8–9, pp. 1897–1904, May 2009, doi: 10.1016/j.molimm.2009.01.005.
- [447] F. Li *et al.*, "Molecular cloning and expression of a Relish gene in Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*," *Int. J. Immunogenet.*, vol. 37, no. 6, pp. 499–508, Dec. 2010, doi: 10.1111/j.1744-313X.2010.00954.x.
- [448] S. Weisheit, "Transcriptomic and proteomic analysis of arbovirus-infected tick cells," 2014.
- [449] B. M. Christensen, J. Li, C. C. Chen, and A. J. Nappi, "Melanization immune responses in mosquito vectors," *Trends in Parasitology*, vol. 21, no. 4. Elsevier Ltd, pp. 192–199, 2005, doi: 10.1016/j.pt.2005.02.007.
- [450] P. Amparyup, W. Charoensapsri, and A. Tassanakajon, "Prophenoloxidase system and its role in shrimp immune responses against major pathogens," *Fish Shellfish Immunol.*, vol. 34, no. 4, pp. 990–1001, 2013, doi: 10.1016/j.fsi.2012.08.019.
- [451] D. Tamang *et al.*, "The use of a double subgenomic Sindbis virus expression system to study mosquito gene function: Effects of antisense nucleotide number and duration of viral infection on gene silencing efficiency," *Insect Mol. Biol.*, vol. 13, no. 6, pp. 595–602, Dec. 2004, doi: 10.1111/j.0962-1075.2004.00516.x.
- [452] J. Rodriguez-Andres *et al.*, "Phenoloxidase Activity Acts as a Mosquito Innate Immune Response against Infection with Semliki Forest Virus," *PLoS Pathog.*, vol. 8, no. 11, Nov. 2012, doi: 10.1371/journal.ppat.1002977.
- [453] Q. Wang *et al.*, "Identification of a Conserved Prophenoloxidase Activation Pathway in Cotton Bollworm *Helicoverpa armigera*," *Front. Immunol.*, vol. 11, May 2020, doi: 10.3389/fimmu.2020.00785.
- [454] P. Sangsuriya *et al.*, "A novel white spot syndrome virus protein WSSV164 controls prophenoloxidases, PmpPOs in shrimp melanization cascade," *Dev. Comp. Immunol.*, vol. 86, pp. 109–117, Sep. 2018, doi: 10.1016/j.dci.2018.05.005.
- [455] C. Yuan *et al.*, "Inhibition of melanization by serpin-5 and serpin-9 promotes baculovirus infection in cotton bollworm *Helicoverpa armigera*," *PLoS Pathog.*, vol. 13, no. 9, Sep. 2017, doi:

10.1371/journal.ppat.1006645.

- [456] X. Chen, J. Yu, W. Wang, H. Lu, L. Kang, and F. Cui, "A plant virus ensures viral stability in the hemolymph of vector insects through suppressing prophenoloxidase activation," *MBio*, vol. 11, no. 4, pp. 1–16, 2020, doi: 10.1128/mBio.01453-20.
- [457] J. Sutthangkul, P. Amparyup, W. Charoensapsri, S. Senapin, K. Phiwsaiya, and A. Tassanakajon, "Suppression of shrimp melanization during white spot syndrome virus infection," *J. Biol. Chem.*, vol. 290, no. 10, pp. 6470–6481, Mar. 2015, doi: 10.1074/jbc.M114.605568.
- [458] K. Nellaiappan and M. Sugumaran, "On the presence of prophenoloxidase in the hemolymph of the horseshoe crab, *Limulus*," *Comp. Biochem. Physiol. - B Biochem. Mol. Biol.*, vol. 113, no. 1, pp. 163–168, 1996, doi: 10.1016/0305-0491(95)02047-0.
- [459] K. Kadota *et al.*, "Existence of phenol oxidase in the argasid tick *Ornithodoros moubata*," *Parasitol. Res.*, vol. 88, no. 8, pp. 781–784, 2002, doi: 10.1007/s00436-002-0664-x.
- [460] P. Ravanan, I. F. Srikumar, and P. Talwar, "Autophagy: The spotlight for cellular stress responses," *Life Sciences*, vol. 188. Elsevier Inc., pp. 53–67, 01-Nov-2017, doi: 10.1016/j.lfs.2017.08.029.
- [461] S. Shelly, N. Lukinova, S. Bambina, A. Berman, and S. Cherry, "Autophagy Is an Essential Component of *Drosophila* Immunity against Vesicular Stomatitis Virus," *Immunity*, vol. 30, no. 4, pp. 588–598, Apr. 2009, doi: 10.1016/j.immuni.2009.02.009.
- [462] R. K. Patel and R. W. Hardy, "Role for the Phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt-TOR Pathway during Sindbis Virus Replication in Arthropods," *J. Virol.*, vol. 86, no. 7, pp. 3595–3604, Apr. 2012, doi: 10.1128/jvi.06625-11.
- [463] M. J. Li *et al.*, "Transcriptome analysis of *Aedes aegypti* Aag2 cells in response to dengue virus-2 infection," *Parasites and Vectors*, vol. 13, no. 1, Aug. 2020, doi: 10.1186/s13071-020-04294-w.
- [464] S. Weisheit *et al.*, "*Ixodes scapularis* and *Ixodes ricinus* tick cell lines respond to infection with tick-borne encephalitis virus: Transcriptomic and proteomic analysis," *Parasites and Vectors*, vol. 8, no. 1, pp. 1–26, 2015, doi: 10.1186/s13071-015-1210-x.
- [465] A. MacFadden *et al.*, "Mechanism and structural diversity of exoribonuclease-resistant RNA structures in flaviviral RNAs," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41467-017-02604-y.
- [466] E. Schnettler *et al.*, "Noncoding Flavivirus RNA Displays RNA Interference Suppressor Activity in Insect and Mammalian Cells," *J. Virol.*, vol. 86, no. 24, pp. 13486–13500, Dec. 2012, doi: 10.1128/jvi.01104-12.
- [467] S. L. Moon, B. J. T. Dodd, D. E. Brackney, C. J. Wilusz, G. D. Ebel, and J. Wilusz, "Flavivirus sfRNA suppresses antiviral RNA interference in cultured cells and mosquitoes and directly interacts with the RNAi machinery," *Virology*, vol. 485, pp. 322–329, Nov. 2015, doi: 10.1016/j.virol.2015.08.009.
- [468] L. Swevers, J. Vanden Broeck, and G. Smagghe, "The possible impact of persistent virus infection on the function of the RNAi machinery in insects: A hypothesis," *Front. Physiol.*, vol. 4 NOV, p. 319, Nov. 2013, doi: 10.3389/fphys.2013.00319.
- [469] O. Voinnet, "Induction and suppression of RNA silencing: Insights from viral infections," *Nature Reviews Genetics*, vol. 6, no. 3. Nature Publishing Group, pp. 206–220, 10-Mar-2005, doi: 10.1038/nrg1555.
- [470] P. K. Kakumani *et al.*, "Role of RNA Interference (RNAi) in Dengue Virus Replication and Identification of NS4B as an RNAi Suppressor," *J. Virol.*, vol. 87, no. 16, pp. 8870–8883, Aug.

2013, doi: 10.1128/jvi.02774-12.

- [471] K. Mathur, A. Anand, S. K. Dubey, N. Sanan-Mishra, R. K. Bhatnagar, and S. Sunil, "Analysis of chikungunya virus proteins reveals that non-structural proteins nsP2 and nsP3 exhibit RNA interference (RNAi) suppressor activity," *Sci. Rep.*, vol. 6, Nov. 2016, doi: 10.1038/srep38065.
- [472] K. E. Jones *et al.*, "Global trends in emerging infectious diseases," *Nature*, vol. 451, no. 7181, pp. 990–993, Feb. 2008, doi: 10.1038/nature06536.
- [473] W. J. Cramaro, O. E. Hunewald, L. Bell-Sakyi, and C. P. Muller, "Genome scaffolding and annotation for the pathogen vector *Ixodes ricinus* by ultra-long single molecule sequencing," *Parasites and Vectors*, vol. 10, no. 1, Feb. 2017, doi: 10.1186/s13071-017-2008-9.
- [474] U. G. Munderloh and T. J. Kurtti, "Formulation of medium for tick cell culture," *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 7, no. 3, pp. 219–229, Aug. 1989, doi: 10.1007/BF01194061.
- [475] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, 2001, doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- [476] J. A. Simser, A. T. Palmer, V. Fingerle, B. Wilske, T. J. Kurtti, and U. G. Munderloh, "*Rickettsia monacensis* sp. nov., a spotted fever group rickettsia, from ticks (*Ixodes ricinus*) collected in a European city park," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 68, no. 9, pp. 4559–4566, Sep. 2002, doi: 10.1128/AEM.68.9.4559-4566.2002.
- [477] L. Bell-Sakyi, E. Zweggarth, E. F. Blouin, E. A. Gould, and F. Jongejan, "Tick cell lines: tools for tick and tick-borne disease research," *Trends Parasitol.*, vol. 23, no. 9, pp. 450–457, 2007, doi: 10.1016/j.pt.2007.07.009.
- [478] U. G. Munderloh and T. J. Kurtti, "Formulation of medium for tick cell culture," *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 7, no. 3, pp. 219–29, Aug. 1989.
- [479] L. J. Reed and H. Muench, "A simple method of estimating fifty per cent endpoints," *Am. J. Epidemiol.*, vol. 27, no. 3, pp. 493–497, May 1938, doi: 10.1093/oxfordjournals.aje.a118408.
- [480] V. Gausson and M. C. Saleh, "Viral small RNA cloning and sequencing," *Methods Mol. Biol.*, vol. 721, pp. 107–122, 2011, doi: 10.1007/978-1-61779-037-9_6.
- [481] E. Z. Poirier *et al.*, "Dicer-2-Dependent Generation of Viral DNA from Defective Genomes of RNA Viruses Modulates Antiviral Immunity in Insects," *Cell Host Microbe*, vol. 23, no. 3, pp. 353–365.e8, 2018, doi: 10.1016/j.chom.2018.02.001.
- [482] L. D. Jones, C. R. Davies, G. M. Steel, and P. A. Nuttall, "Vector capacity of *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum* for Thogoto and Dhori viruses," *Med. Vet. Entomol.*, vol. 3, no. 2, pp. 195–202, Apr. 1989, doi: 10.1111/j.1365-2915.1989.tb00498.x.
- [483] G. Cheng, Y. Liu, P. Wang, and X. Xiao, "Mosquito Defense Strategies against Viral Infection," *Trends in Parasitology*, vol. 32, no. 3. Elsevier Ltd, pp. 177–186, 01-Mar-2016, doi: 10.1016/j.pt.2015.09.009.
- [484] G. Carissimo *et al.*, "Antiviral immunity of *Anopheles gambiae* is highly compartmentalized, with distinct roles for RNA interference and gut microbiota," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 112, no. 2, pp. E176–E185, Jan. 2015, doi: 10.1073/pnas.1412984112.
- [485] M. Slovák *et al.*, "Survival dynamics of tick-borne encephalitis virus in *Ixodes ricinus* ticks," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 5, no. 6, pp. 962–969, Oct. 2014, doi: 10.1016/J.TTBDIS.2014.07.019.
- [486] C. L. Campbell, T. Harrison, A. M. Hess, and G. D. Ebel, "MicroRNA levels are modulated in *Aedes aegypti* after exposure to Dengue-2," *Insect Mol. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 132–139, Feb. 2014, doi: 10.1111/imb.12070.

- [487] A. G. Russo, A. G. Kelly, D. Enosi Tuipulotu, M. M. Tanaka, and P. A. White, "Novel insights into endogenous RNA viral elements in *Ixodes scapularis* and other arbovirus vector genomes," *Virus Evol.*, vol. 5, no. 1, Jan. 2019, doi: 10.1093/VE/VEZ010.
- [488] G. Barry *et al.*, "Gene silencing in tick cell lines using small interfering or long double-stranded RNA," *Exp. Appl. Acarol.*, vol. 59, no. 3, pp. 319–338, 2013, doi: 10.1007/s10493-012-9598-x.
- [489] O. A. Belova *et al.*, "Properties of the tick-borne encephalitis virus population during persistent infection of ixodid ticks and tick cell lines," *Ticks Tick. Borne. Dis.*, vol. 8, no. 6, pp. 895–906, 2017, doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.07.008.
- [490] B. Goic *et al.*, "Virus-derived DNA drives mosquito vector tolerance to arboviral infection," *Nat. Commun.*, vol. 7, pp. 1–10, 2016, doi: 10.1038/ncomms12410.
- [491] L. Barzon, *Ongoing and emerging arbovirus threats in Europe*, vol. 107. 2018, pp. 38–47.
- [492] G. Spiteri, B. Sudre, A. Septfons, and J. Beauté, "Surveillance of Zika virus infection in the EU/EEA, June 2015 to January 2017," *Eurosurveillance*, vol. 22, no. 41, pp. 17–00254, Oct. 2017, doi: 10.2807/1560-7917.ES.2017.22.41.17-00254.
- [493] M. C. Paty *et al.*, "Large number of imported chikungunya cases in Mainland France, 2014: A challenge for surveillance and response," *Eurosurveillance*, vol. 19, no. 28, p. 20856, Jul. 2014, doi: 10.2807/1560-7917.es2014.19.28.20856.
- [494] J. C. Semenza *et al.*, "International Dispersal of Dengue through Air Travel: Importation Risk for Europe," *PLoS Negl. Trop. Dis.*, vol. 8, no. 12, p. e3278, Dec. 2014, doi: 10.1371/journal.pntd.0003278.
- [495] World Health Organisation, "Document de base pour éclairer les délibérations lors de la 70 e session de l'Assemblée mondiale de la Santé," 2017.
- [496] L. Bavia, A. L. P. Mosimann, M. N. Aoki, and C. N. Duarte Dos Santos, "A glance at subgenomic flavivirus RNAs and microRNAs in flavivirus infections," *Viol. J.*, vol. 13, no. 1, Jan. 2016, doi: 10.1186/s12985-016-0541-3.
- [497] G. P. Göertz *et al.*, "Subgenomic flavivirus RNA binds the mosquito DEAD/H-box helicase ME31B and determines Zika virus transmission by *Aedes aegypti*," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 116, no. 38, pp. 19136–19144, Sep. 2019, doi: 10.1073/pnas.1905617116.
- [498] A. Slonchak and A. A. Khromykh, "Subgenomic flaviviral RNAs: What do we know after the first decade of research," *Antiviral Research*, vol. 159. Elsevier B.V., pp. 13–25, 01-Nov-2018, doi: 10.1016/j.antiviral.2018.09.006.
- [499] V. A. Ternovoi *et al.*, "Variability in the 3' untranslated regions of the genomes of the different tick-borne encephalitis virus subtypes," *Virus Genes*, vol. 55, no. 4, pp. 448–457, Aug. 2019, doi: 10.1007/s11262-019-01672-0.
- [500] M. Sakai, M. Muto, M. Hirano, H. Kariwa, and K. Yoshii, "Virulence of tick-borne encephalitis virus is associated with intact conformational viral RNA structures in the variable region of the 3'-UTR," *Virus Res.*, vol. 203, pp. 36–40, May 2015, doi: 10.1016/j.virusres.2015.03.006.
- [501] J. de la Fuente *et al.*, "Tick-Pathogen Interactions and Vector Competence: Identification of Molecular Drivers for Tick-Borne Diseases," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, no. April, pp. 1–13, 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00114.
- [502] M. R. Talactac *et al.*, "Vector competence of *Haemaphysalis longicornis* ticks for a Japanese isolate of the Thogoto virus," *Sci. Rep.*, vol. 8, no. 1, Dec. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-27483-1.
- [503] F. S. Flores, C. Zanluca, A. A. Guglielmone, C. N. Duarte dos Santos, M. B. Labruna, and A. Diaz,

- "Vector competence for West Nile virus and St. Louis encephalitis virus (*Flavivirus*) of three tick species of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae)," *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, vol. 100, no. 5, pp. 1230–1235, 2019, doi: 10.4269/ajtmh.18-0134.
- [504] A. Krishnavajhala, B. A. Armstrong, and J. E. Lopez, "Vector competence of geographical populations of *Ornithodoros turicata* for the tick-borne relapsing fever spirochete *Borrelia turicatae*," *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 84, no. 21, Nov. 2018, doi: 10.1128/AEM.01505-18.
- [505] B. J. Blitvich and A. E. Firth, "A review of flaviviruses that have no known arthropod vector," *Viruses*, vol. 9, no. 6. MDPI AG, 21-Jun-2017, doi: 10.3390/v9060154.
- [506] J. M. Grabowski and C. A. Hill, "A Roadmap for Tick-Borne Flavivirus Research in the 'Omics' Era," *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, vol. 7, p. 519, Dec. 2017, doi: 10.3389/fcimb.2017.00519.
- [507] N. Jia *et al.*, "Large-Scale Comparative Analyses of Tick Genomes Elucidate Their Genetic Diversity and Vector Capacities," *Cell*, vol. 182, no. 5, pp. 1328-1340.e13, Aug. 2020, doi: 10.1016/j.cell.2020.07.023.

ANNEXES

Tableau 1. Caractéristiques principales des cellules utilisées lors de l'étude

lignée cellulaire/ souche virale	Caractéristiques majeures	Milieu de culture	Référence/ Source
Vero	<i>Cercopithecus aethiops</i> ; épithéliales; adhérentes; rénales	DMEM (5%SVF; 1% pen/strep; 1% Sodium Pyruvate)	ATCC
IRE11	<i>I. ricinus</i> ; embryonnaires	L-15B300	Tick Cell Biobank
IRE/CTVM19	<i>I. ricinus</i> ; embryonnaires	L-15	Tick Cell Biobank
IRE/CTVM20	<i>I. ricinus</i> ; embryonnaires	L-15/L-15B	Tick Cell Biobank
<i>E. coli</i> DH10B	Δ (ara-leu) 7697 araD139 fhuA Δ lacX74 galK16 galE15 e14- ϕ 80dlacZ Δ M15 recA1 relA1 endA1 nupG rpsL (StrR) rph spoT1 Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC)	LB - LB agar	NEB
TBEV	Souche TBEV Hypr; U39292.1; <i>Flaviviridae, Flavivirus</i> , ARNsb(+)		S. Moutailler (ANSES, France)
LIV	Souche LI3/1; KP144331.1; <i>Flaviviridae, Flavivirus</i> , ARNsb(+)		N. Johnson (APHA, UK)

Tableau 2. Caractéristiques du vecteur pGEM-T utilisé pour la synthèse des ARNdb

Vecteur	Caractéristiques majeurs	Insert	Application	Référence
pGEM-T	derived from pGEM®-5Zf(+) Vector (GenBank® Accession No. X65308), pUC ori, β -lactamase, LacZ, Amp ^R , NotI, pUC/M13 primer binding sites, T7 RNA polymerase promoter and transcription initiation sites	ADNc <i>d'I. ricinus</i>	Synthèse d'ARNdb	Promega

Tableau 3. Amorces et sondes utilisées pour quantifier la réplication virale de TBEV et LIV ainsi que les amorces utilisées pour le clonage en pGEM-T

Amorces	Séquence	Tm (°C)
DCR2a_pGEM_F	CTACCTGGTGACACGCTACC	59,83
DCR2a_pGEM_R	ACGTTCTGGCTGAAGGACTC	59,68
DCR2b_pGEM_F	CGCTATAGACTGGCCCTTCG	60,04
DCR2b_pGEM_R	AGCTTTGACGGTCTGTAGCC	60,04
AGO2_pGEM_F	CGCCATCCAGTTTGTAAGCG	59,9
AGO2_pGEM_R	CTTGAAATACGCGGCGACTG	59,97
TBE_E_F	TCCTTGAGCTTGACAAGACAG	57,9
TBE_E_R	TGTTTCCATGGCAGAGCCAG	59,4
TBE_Euro_Sonde	[FAM] TGGAACACCTTCCAACGGCTTGGCA[BHQ1]	66,3
louping_E_F	GCTGTCAAGATGGATGTGTACAA	58,9
louping_E_R	CCACTCTTCAGGTGATACTTGT	58,4
louping_Sonde	[FAM] CTTGGAGATCAGACTGGAGTGCTGCT[BHQ1]	66,4
Actine_ <i>I. ricinus</i> _For	AAGGACCTGTACGCCAACAC	59,4
Actine_ <i>I. ricinus</i> _Rev	ACATCTGCTGGAAGGTGGAC	59,4
Actine_ <i>I. ricinus</i> _Sonde	[HEX] CGTCCTGTCCGGTGGTACCACGA [BHQ1]	67,8

RESUME

Dialogue moléculaire des virus de l'encéphalite à tique et louping ill avec leur vecteur tique *Ixodes ricinus*

A l'échelle mondiale, l'émergence de maladies virales transmises par les tiques est en nette augmentation depuis le début du XXI^e siècle. En Europe, la tique est le premier arthropode capable de transmettre la plus large variété de pathogènes à l'homme et à l'animal. *Ixodes ricinus*, espèce de tique majoritairement représentée en Europe, transmet notamment les virus de l'encéphalite à tique (TBEV) et louping ill (LIV), responsables de méningo-encéphalites respectivement chez l'homme et les moutons. Bien que la transmission de ces virus par la tique soit connue depuis près d'une centaine d'années, les mécanismes permettant à la tique de répliquer et transmettre les virus à un hôte sont encore méconnus. Aussi, une meilleure compréhension du dialogue moléculaire entre le virus et son vecteur est un prérequis majeur dans la lutte contre les maladies vectorielles.

Le premier objectif de ce projet de thèse a été d'identifier les interactions protéiques établies par TBEV et LIV avec leur vecteur *I. ricinus*. En ce sens, une cartographie des interactions entre les protéines de TBEV, de LIV et celles d'*I. ricinus* a été établie et a révélé que les protéines de TBEV et LIV interagissaient avec différents modules protéiques des cellules de tique tels que des voies de signalisation contrôlant la transduction de signaux, la transcription, la dégradation protéique et des fonctions du cytosquelette. La tique, quant à elle, met en place des moyens de lutte afin de limiter l'impact du virus sur ses traits de vie. Cette lutte se traduit notamment par l'initiation et le maintien d'une réponse immunitaire. Le second objectif était ainsi d'explorer la réponse ARN interférence (voie antivirale décrite comme majeure des arthropodes) d'*I. ricinus* lors de l'infection à TBEV et à LIV. Le séquençage des petits ARNs issus de cellules de tique infectées par TBEV et LIV et de tiques vivantes infectées par TBEV a montré qu'*I. ricinus* produisaient des petits ARNs de 22 nucléotides à partir des ARNs viraux.

Le rôle des protéines de tiques interagissant avec TBEV et LIV, ainsi que celui d'acteurs de l'immunité antivirale, dans le cycle viral sera appréhendé par l'inactivation de leur expression.

Ce sujet de thèse initie un programme de recherche qui vise à élucider les mécanismes moléculaires de la compétence vectorielle d'*I. ricinus* pour les virus qu'elle transmet, dans le but de prédire la transmission d'autres arbovirus par cette même tique afin d'anticiper leurs émergences en Europe.

Mots clés : TBEV, LIV, *Ixodes ricinus*, interactions protéine – protéine, ARNi